

T.D. 265

B

UNIVERSIDAD DE VALENCIA (FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS)

CARACTERIZACION DE CEPAS AMBIENTALES DE Vibrio cholerae no O1:
FACTORES RELACIONADOS CON SU SUPERVIVENCIA Y VIRULENCIA

Carmen Amaro González
1987

BIBLIOTECA
FACULTAT DE C. BIOLÒGQUES
VALÈNCIA

UMI Number: U607642

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607642

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

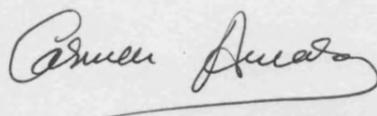
All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

Tesis presentada para optar al grado de Doctor
en la Facultad de Ciencias Biológicas de la
Universidad de Valencia

El doctorando



Fmdo: Carmen Amaro González

Tesis dirigida por Esperanza Garay Aubán
Dra. en Ciencias Biológicas y profesora
titular del Dpto. de Microbiología de la
Universidad de Valencia



Fmdo: Esperanza Garay Aubán

Ri. 18805437.

R. 6097



Departament de Microbiologia
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

AGRADECIMIENTOS

FEDERICO URUBURU FERNANDEZ DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA

CERTIFICA que Carmen Amaro González ha realizado en la sección departamental de Ciencias Biológicas el trabajo titulado "Caracterización de cepas ambientales de Vibrio cholerae no O1: factores relacionados con su supervivencia y virulencia", que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos extendiendo el presente certificado en Burjasot, 4 de Noviembre de 1987.

Fdo. Dr. Federico Uruburu Fernández

Mención especial merece a las colaboradoras del Depto. de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela. En primer lugar los doctores Alicia Toranzo y Juan María, por darme todo clase de facilidades y ayudas durante mi estancia en su Facultad, así como también por sus siempre interesantes e inteligentes sugerencias y por haber determinado personalmente la virulencia de las cepas, sin

AGRADECIMIENTOS

Quiero dejar constancia de mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han hecho posible que el presente trabajo llegara a buen término. En primer lugar he de mencionar a la directora del mismo, la Dra. Esperanza Garay por su competencia como investigadora y por su acertada orientación y ayuda. A la Dra. María Jesús Pujalte y a Amilcar Arnau, con los que inicialmente formé un equipo de trabajo. A María Jesús por sus enseñanzas en el laboratorio y por su efectivo asesoramiento, y a Amilcar por la labor conjunta que llevamos a cabo y que constituye el capítulo 2 de esta tesis y su Tesina de licenciatura. Asimismo he de expresar mi reconocimiento al Dr. Enrique Herrero, por contribuir a mi formación y por su colaboración y valiosas sugerencias acerca del análisis de las proteínas de membrana. A la Dra. Elena Alcaide por su dedicación cuando hube de determinar el contenido plasmídico de las cepas y por la confianza en mí que demostró en todo momento. A mi amiga y compañera de fatigas Rosa Aznar, con quien he tenido, y espero seguir teniendo, el placer de trabajar en fructífera colaboración. Al Dr Manuel Serra por poner a mi alcance sus programas de análisis estadístico y por sus lúcidas críticas y consejos. A Luis Torres, quien me inició en la investigación sobre los sistemas de captación de hierro de alta afinidad. A Fernando Calatayud y Angeles Mengual por su eficiente asistencia técnica durante el último año de trabajo experimental, a Margarita y Paloma, alumnas colaboradoras del departamento, y a todos aquellos que de un modo u otro han contribuido a mi labor diaria.

Mención especial merecen mis compañeros del Dpto. de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela. En primer lugar los doctores Alicia Toranzo y Juan Barja, no sólo por darme toda clase de facilidades y ayudas durante mi estancia en su Facultad, sino también por sus siempre interesantes e inteligentes sugerencias y por haber determinado personalmente la citotoxicidad de las cepas, sin

la cual no se hubiera podido finalizar este trabajo. Asimismo he de mencionar al Dr. Manuel Lemos por permitirme el uso de su laboratorio, por enseñarme y orientarme durante la determinación de la producción de sideróforos y sobre todo por prestarse, junto con Rosa, a la formación de un equipo de trabajo que espero siga dando frutos en el futuro. Agradezco, además, a Jorge, Jesús, Ysabel, Aurora, Carlos y al resto de compañeros su amable y grata asistencia durante mi estancia en su departamento.

Debo agradecer, en suma, al Dpto. de Microbiología de la Universidad de Valencia y a su director la autorización para la realización de la presente tesis y al Dpto. de Bioquímica el haber puesto a mi disposición parte de sus aparatos y material de laboratorio. Por último he de mencionar al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca concedida para la realización de este estudio, al Exmo. Ayuntamiento de Valencia por la beca que disfruté durante el último año de trabajo y al C.A.Y.C.I.T. por la financiación del trabajo de investigación.

A mi familia y a mis amigos

INDICE

1. Introducción general: objetivos y planificación, 1.
2. Aislamiento de Vibrio spp. y Vibrio cholerae de ecosistemas acuáticos, 7.
 - 2.1. Introducción, 5.
 - 2.2. Material y Métodos, 12.

(Descripción del área de estudio y selección de los puntos de muestreo, 12. Muestras, 15. Parámetros ambientales, 16. Parámetros bacteriológicos: cuantificación e identificación de Vibrio spp y Vibrio cholerae, 16. Pruebas complementarias, 21. Análisis estadístico, 21. Selección y conservación de las cepas, 22. Observaciones microscópicas, 23. Composición de los medios de cultivo y reactivos, 26)
 - 2.3. Resultados, 29.

(Parámetros ambientales, 29. Parámetros bacteriológicos: NMP de Vibrio spp. y Vibrio cholerae en agua y plancton, 31. Pruebas complementarias, 42)
 - 2.4. Discusión, 43.
3. Propiedades relacionadas con la adhesión: actividad hemaglutinante e hidrofobicidad de superficie, 53.
 - 3.1. Introducción, 53.
 - 3.2. Material y Métodos, 61.

(Cepas bacterianas y condiciones de cultivo, 61. Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación, 63. Obtención de membranas libres de células, 64. Detección de la hemaglutinina/s soluble, 65. Test de agregación de sales, 66. Tratamiento por calor, 67. Microscopía electrónica, 67. Medios de cultivo, reactivos y productos, 67).
 - 3.3. Resultados, 69.

(Hemaglutininas asociadas a células, 69. Hidrofobicidad de superficie, 78. Hemaglutinina/s soluble, 81)

- 3.4. Discusión, 82.
4. Análisis de las proteínas de la envoltura celular, 97.
- 4.1. Introducción, 97.
- 4.2. Material y Métodos, 102.
(Cepas bacterianas y condiciones de cultivo, 102. Preparación de las envolturas celulares totales, 106. Separación de las proteínas de membrana interna y externa, 107. Procedimientos analíticos, 108. Tratamiento con calor, (termomodificabilidad) y efecto del 2-mercaptoetanol, 109. Electroforesis en geles SDS-acrilamida, 109. Análisis densitométrico de los geles, 110. Análisis clúster, 111. Medios de cultivo, reactivos, productos y soluciones, 113).
- 4.3. Resultados, 115.
(Preparación de las envolturas celulares totales, 115. Análisis de las proteínas de la envoltura celular total, 119. Separación de las proteínas de membrana externa e interna, 126. Análisis de las proteínas de membrana externa, 130. Proteínas termomodificables y efecto del 2-mercaptoetanol, 137. Efecto del medio de crecimiento y la edad del cultivo, 138).
- 4.4. Discusión, 146.
5. Sistema de captación de hierro de alta afinidad: sideróforos y proteínas de membrana relacionadas, 165.
- 5.1. Introducción, 165.
- 5.2. Material y Métodos, 174.
(Cepas bacterianas y condiciones de cultivo, 174. Crecimiento en condiciones de limitación en hierro: determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de EDDA, 175. Detección de sideróforos, 176. Espectros de absorción y detección de sideróforos de tipo hidroxamato, 179. Bioensayos, 179. Análisis de las proteínas de membrana, 182. Medios de cultivo, reactivos, productos y procedimientos, 182).
- 5.3. Resultados, 186.

(Crecimiento en condiciones de limitación en hierro: CMI de EDDA, 186. Detección de sideróforos, 189. Espectros de absorción y detección de sideróforos de tipo hidroxamato, 200. Bioensayos, 201. Inducción de proteínas de membrana en condiciones de limitación en hierro, 209).

5.4. Discusión, 210.

6. Estudio de los factores R y de su capacidad de transferencia, 225.

6.1. Introducción, 225.

6.2. Material y Métodos, 232.

(Cepas bacterianas, 232. Determinación de la resistencia a antibióticos, 232. Transferencia de los determinantes de resistencia, 233. Aislamiento del DNA plasmídico, 240. Electroforesis en geles de agarosa, 244. Estimación del peso molecular de los plásmidos, 245. Medios de cultivo, productos, reactivos y procedimiento, 246.)

6.3. Resultados, 248.

(Determinación de la resistencia a antibióticos, 248. Transferencia de los determinantes de resistencia, 249. Aislamiento y caracterización de los plásmidos R, 256).

6.4. Discusión, 265.

7. Propiedades relacionadas con la virulencia: Actividad enzimática, hemolítica y citotóxica, 275.

7.1. Introducción, 275.

7.2. Material y Métodos, 277.

(Cepas bacterianas y condiciones de cultivo, 277. Actividades enzimáticas, 277. Actividad hemolítica, 278. Análisis estadístico, 278. Actividad citotóxica de los sobrenadantes de cultivo, 279. Medios de cultivo y reactivos, 281. Condiciones de cultivo de las líneas celulares: individualización y conservación celular, 284).

7.3. Resultados y Discusión, 285.

(Actividades enzimáticas y hemolíticas, 285. Actividad citotóxica de los productos extracelulares sobre líneas

celulares de homeotermos y poiquilotermos, 295)

8. Conclusiones y consideraciones finales, 305.

Bibliografía, 313.

1. INTRODUCCION GENERAL: OBJETIVOS Y PLANIFICACION

Los estudios sobre bacterias patógenas del hombre y animales han ocupado tradicionalmente un lugar preeminente dentro del campo de la Microbiología, tanto bajo la óptica de la patogeneidad, como por su contribución al conocimiento de procesos biológicos básicos que han abierto el campo a numerosísimas aplicaciones. Así, Escherichia coli ha sido la bacteria más exhaustivamente estudiada, no sólo por microbiólogos, sino también por bioquímicos y genéticos debido a las indudables ventajas que supone el trabajo con células procarióticas. La mayor parte de los estudios se han realizado con cepas procedentes de aislamientos clínicos y han sido enfocados al conocimiento de las características de la bacteria relacionadas con el organismo humano o animal, donde determinadas serovariedades pueden causar trastornos gastrointestinales más o menos graves. No obstante, muchas cepas no son patógenas y pueden encontrarse en una gran variedad de nichos ecológicos. Lógicamente, para obtener una visión del conjunto de posibilidades de la especie, hay que ampliar el estudio a todos aquellos aislamientos que proceden de hábitats menos restringidos que el intestino del hombre y animales. De hecho, en los últimos años se está asistiendo a un resurgimiento del interés por el conocimiento de la variabilidad intraespecífica que presenta este microorganismo, lo que le convierte en una herramienta idónea para trabajos de biología de poblaciones (Caugant y cols., 1981, 1984; Hartl y Dykhuizen, 1984; Routman y cols., 1985; Achtman y cols., 1986).

Existen microorganismos distintos de las enterobacterias que comparten con Escherichia coli su capacidad para producir enteropatías, presentando la particularidad de no ser de hábitat preferentemente intestinal. Tal es el caso de la especie Vibrio cholerae, perteneciente a la familia Vibrionaceae, integrada por bacterias de hábitat fundamentalmente acuático que cubren amplios márgenes de salinidad y con algunas especies patógenas para el hombre y animales. Vibrio cholerae de serotipo O1 es el agente causal del cólera y ha sido la especie del grupo más estudiada, aunque casi siempre bajo un enfoque clínico. Este tipo de trabajos ha permitido el conocimiento de la naturaleza de la toxina colérica y de su modo de acción (Burrows y Kaur, 1974) quedando, sin embargo, por esclarecer otros factores relacionados con la patogeneidad, como son la producción de adhesinas, proteasas, lipasas, hemolisinas, citotoxinas, sideróforos etc., entre otros. Dentro de la especie existen diferentes serovariedades en relación a los antígenos somáticos O. El serotipo O1 corresponde al patógeno clásico, responsable de las grandes pandemias que se han sucedido a lo largo de la historia. Las cepas que no pertenecen a la serovariedad O1 se han denominado clásicamente NCV ("non cholera vibrios"), NAG ("non agglutinable"), o, más recientemente, no O1. Aparte de compartir un mismo perfil fenotípico, algunos autores han demostrado la existencia de homología genética a nivel de especie entre el serotipo O1 y los restantes grupos serológicos (Demarchelier y Reichelt, 1982). Los vibrios NAG fueron aislados por Dunbar en las aguas del Elba ya en 1893, y sus mecanismos de patogeneidad han permanecido sin dilucidar hasta hace pocos años, debido a que en principio se les consideró inocuos para el hombre. La

principal diferencia que manifiestan con respecto al serotipo O1 es su incapacidad de extenderse dando lugar a grandes pandemias (Sakazaki y Balows, 1981), aunque algunas cepas son capaces de producir una toxina idéntica o similar a la colérica (Craig y cols., 1981; Yamamoto y cols., 1983), causante de enteropatías (McIntyre y cols., 1965). Otras cepas, aisladas de fuentes humanas distintas de las heces, e incluso de diferentes especies de animales, pueden desarrollar mecanismos de patogeneidad distintos de la enterotoxina (Yamanoi y cols., 1981), aún poco estudiados. Sin embargo, el hábitat de Vibrio cholerae no O1 es fundamentalmente acuático, encontrándose en ríos, lagos, estuarios, aguas residuales y aguas costeras tanto en forma libre como asociada epi o endobióticamente a las distintas especies animales que forman parte de la fauna propia de estos ecosistemas. Su abundancia en ambientes extracorpóreos, unida a su posible patogeneidad, hacen de este microorganismo una herramienta incluso más idónea que E. coli para estudios de variabilidad intraespecífica.

El presente trabajo se incluye dentro de la línea de investigación sobre bacterias heterótrofas de ecosistemas acuáticos que se desarrolla en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Valencia (Facultad de Ciencias Biológicas), y que se centra en la familia Vibrionaceae. A lo largo del mismo se ha realizado un estudio sobre la variabilidad intraespecífica de poblaciones ambientales de Vibrio cholerae, directa o indirectamente relacionada con la supervivencia de la especie en ecosistemas acuáticos y con su posible virulencia. Para ello, el trabajo se ha

acuerdo con los objetivos que se especifican a continuación.

En primer lugar, en el capítulo 2 se aborda el estudio de la presencia de la especie Vibrio cholerae en ecosistemas acuáticos cercanos a la ciudad de Valencia (lago de la Albufera y zonas costeras bajo su influencia) a lo largo de un ciclo anual completo, mediante el análisis de muestras periódicas de agua y plancton, cubriendo un amplio margen de salinidades. Asimismo se han relacionado los niveles de Vibrio spp. y Vibrio cholerae con los parámetros físicoquímicos que se postula determinan su supervivencia en ecosistemas acuáticos. En segundo lugar y tras la caracterización bioquímica y serológica de todos los aislamientos, se ha procedido a la selección de un número lo suficientemente representativo de cepas procedentes de muestras de diferentes características, al objeto de conseguir una perspectiva lo más amplia posible. Las cepas han sido sometidas a los ensayos que constituyen el objeto de los capítulos que se seguidamente se indican, incluyéndose a efectos comparativos cepas control 01 y no 01 procedentes de colecciones de cultivo y, en los casos oportunos, cepas de distintas especies del mismo y otros géneros.

En el capítulo 3 se realiza un estudio sobre la capacidad de adhesión de las cepas seleccionadas mediante la aplicación de dos modelos in vitro: hemaglutinación de eritrocitos e hidrofobicidad medida por el test de agregación de sales. En este apartado se han analizado los distintos tipos de hemaglutininas expresadas por las cepas (solubles y asociadas) a lo largo del ciclo celular y su posible relación con la hidrofobicidad de superficie. Asimismo se discute

sobre las implicaciones ecológicas de la variabilidad fenotípica encontrada.

En el capítulo 4 se procede a la caracterización de las proteínas de la envoltura celular de las cepas y su variabilidad en función del medio y de la edad del cultivo. Para ello se ha puesto a punto la metodología necesaria comparándose los resultados obtenidos tras la aplicación de las técnicas más ampliamente utilizadas. Asimismo se han agrupado las cepas de acuerdo con la similitud encontrada en sus perfiles proteicos y se ha intentado establecer un paralelismo entre cambios observados en sus envolturas externas y las propiedades de superficie descritas en el apartado anterior.

El capítulo 5 tiene por objeto la caracterización de los sistemas de captación de hierro de alta afinidad expresados por las cepas ambientales de la especie. Para ello se ha analizado la producción de sideróforos paralelamente a la de sus probables receptores a nivel de membrana. Asimismo se ha evaluado el potencial biológico de los mismos mediante bioensayos, incluyéndose como controles mutantes defectivos en la producción de sistemas conocidos. Finalmente se discute sobre la implicación ecológica del sistema encontrado y su potencial carácter como factor de virulencia.

En el capítulo 6 se analiza la presencia de factores R en las cepas seleccionadas y su capacidad de transferencia. Con este objeto se ha procedido a la determinación de las resistencias a antibióticos y su capacidad de transmisión mediante conjugaciones intraespecíficas

e intergenéricas. Al mismo tiempo se ha analizado su contenido en DNA extracromosómico para lo que se ha puesto a punto una metodología a de extracción reproducible y repetitiva. Además, se ha caracterizado parcialmente el plásmido portador de las resistencias transferidas y, con el fin de conocer parte del fenotipo codificado, los transconjugantes obtenidos se han incluido en los estudios que se especifican en el capítulo 7. También se discute la importancia de la conjugación, en el grupo estudiado, como mecanismo de evolución genética bacteriana

El capítulo 7 aborda el estudio de distintas propiedades relacionadas con la virulencia. Para ello se han realizado ensayos sobre la actividad enzimática, hemolítica y citotóxica desarrollada por los productos extracelulares excretados. Se han escogido líneas celulares de animales homeotermos y poiquilotermos con el fin de evaluar conjuntamente la toxicidad desarrollada por Vibrio cholerae frente a distintos tipos de especies animales. Asimismo se han incluido los transconjugantes obtenidos en los estudios de citotoxicidad. Por último se evalúan conjuntamente los distintos factores estudiados en relación al probable peligro potencial que constituye para el hombre y otras especies la presencia de cepas de la especie en el ambiente objeto de estudio.

Finalmente, en el capítulo 8 se exponen las conclusiones obtenidas y se hace una referencia a los problemas aún por resolver que suscita la investigación realizada en cada uno de los aspectos estudiados.

2. AISLAMIENTO DE Vibrio spp. Y Vibrio cholerae DE ECOSISTEMAS ACUATICOS

2.1. INTRODUCCION

Los estudios sobre supervivencia y viabilidad de Vibrio cholerae fuera del organismo humano son importantes para comprender el comportamiento epidemiológico de la especie, además del interés intrínseco que poseen desde una perspectiva ecológica. El carácter patógeno de este microorganismo condicionó que las primeras investigaciones realizadas sobre el tema tuvieran un enfoque eminentemente clínico, abordándose el estudio de su acción sobre los receptores intestinales y diseñándose experiencias que pusieron de manifiesto, tanto in vivo como in vitro, su enterotoxigenidad. Su vía de transmisión, básicamente hídrica, también condujo a investigar su supervivencia en aguas y heces. De esta forma, Sakazaki y cols. (1967) concluyeron que Vibrio cholerae podía sobrevivir en heces durante unas pocas semanas a bajas temperaturas, pero que moría al cabo de uno o dos días a temperatura ambiente. Otros investigadores afirmaron que Vibrio cholerae poseía una capacidad limitada de supervivencia en el medio natural, llegando a precisar que este periodo estaba comprendido entre 7 y 10 días para aguas dulces superficiales e intervalos de tiempo más largos para aguas marinas (Fenselfeld, 1965; Pandit y cols., 1967; Pesigan y cols., 1967).

Trabajos más recientes revelaron aspectos inéditos en cuanto a

la capacidad de supervivencia de este microorganismo en el medio acuático. En aislamientos realizados a lo largo de un ciclo anual en la bahía de Tokio, Simidu y cols. (1977) encontraron una población de bacterias heterótrofas entre las que abundaban miembros de la familia Vibrionaceae, incluyendo representantes de la especie Vibrio cholerae. Casi simultáneamente, diversos grupos de investigadores (Colwell y cols., 1977; Austin y cols., 1979; Bashford y cols., 1979; Kaper y cols., 1979) postularon que la antigua concepción de Vibrio cholerae como bacteria de hábitat intestinal, ocasionalmente encontrada en aguas naturales, debía ser desechada dada la elevada frecuencia con la que se aislaba de ecosistemas acuáticos.

Vibrio cholerae, O1 y no O1, ha sido encontrado tanto en aguas residuales como en aguas superficiales naturales pertenecientes a gran cantidad de áreas geográficas distribuidas por todo el mundo y su presencia no está necesariamente correlacionada con los microorganismos indicadores de contaminación fecal (Kaper y cols., 1979; Hood y Ness., 1982; Colwell y cols., 1984, Tison y cols., 1986; Rhodes y cols., 1986). Aunque la mayoría de los aislamientos corresponden a cepas no O1 o NAG (no aglutinables), también se han aislado cepas O1 de ambientes naturales: bahía de Chesapeake (Kaper y cols., 1979), estuarios de Maryland y Louisiana (Blake y cols., 1980; Colwell y cols., 1981) Kent y Queensland (Bashford y cols., 1979; Rogers y cols., 1980; West y Lee, 1982), en ausencia de brotes epidémicos conocidos. Se considera en la actualidad que Vibrio cholerae, constituye una especie autóctona de ecosistemas acuáticos (Kaneko y

Colwell, 1978; Kaper y cols., 1979; Lee y cols., 1982; Huq y cols., 1983; Colwell y cols., 1983, 1984; Garay y cols., 1985; Bockemühl y cols., 1986), habiéndose demostrado mediante experimentos realizados en el laboratorio, que sobrevive y crece bajo las condiciones típicas que se dan en los ambientes estuarinos (Singleton y cols. 1982a, 1982b; Colwell y cols., 1984).

La ecología de Vibrio cholerae, considerado como microorganismo propio de aguas naturales, está determinada por los mismos parámetros físico-químicos y biológicos que definen la dinámica de las poblaciones de cualquier ecosistema. Entre los primeros, se postula que la salinidad (requerimiento en iones Na^+), el pH, la temperatura y los niveles de nutrientes, determinan la supervivencia de Vibrio cholerae en los ecosistemas naturales (Singleton y cols., 1982a, 1982b, Colwell y cols., 1983, Huq y cols., 1984a). Cuando estos parámetros no son los adecuados ($T^{\circ} \leq 10^{\circ}\text{C}$, salinidad $\leq 10\text{ppt}$, pH ácido y bajo contenido en nutrientes) para el crecimiento de la especie, Vibrio cholerae permanece metabólicamente activo, es decir viable, pero no es recuperable del ambiente por medios convencionales (Colwell y cols., 1984), volviendo a su estado activo en el momento en que se restablecen las condiciones óptimas para su crecimiento. A esta forma metabólicamente disminuída, se la conoce con el nombre de "microvibrio" (Mc Donnell y Hood, 1984). Los parámetros biológicos que determinan la supervivencia de Vibrio cholerae en estos ambientes vienen definidos por las interacciones que mantiene, no sólo con organismos de su mismo nivel taxonómico, sino también con otros de

nivel de organización superior. Los estudios sobre su relación con el plancton se han centrado casi exclusivamente en el zooplancton puesto que se ha constatado que el fitoplancton ejerce un efecto antagónico sobre las poblaciones bacterianas (Simidu y cols., 1977; Kogure y cols.; 1980). Por el contrario, la asociación con el zooplancton parece estimular el crecimiento de Vibrio cholerae, bien por la presencia de nutrientes favorables no presentes en el medio libre, bien por proteger a la bacteria de las condiciones adversas, caso de que ésta se albergue en el intestino de estos organismos. En este sentido, Colwell y cols. (1981) proponen una relación de tipo comensal, ya que la producción de la toxina colérica podría suponer un mecanismo de captación de iones Na^+ y otros electrolitos de las células del huésped, en condiciones en que la salinidad ambiental no sea adecuada para la supervivencia y crecimiento del microorganismo. Vibrio cholerae se ha encontrado adherido a la superficie de copépodos vivos, específicamente a la zona oral y al ovisaco de la hembra. Según se deduce de experimentos llevados a cabo en el laboratorio, en estas condiciones su supervivencia es mayor, por lo que el zooplancton podría actuar como reservorio ambiental de la especie (Huq y cols., 1983, 1984a, 1984b, 1986), de donde pasaría por ingestión o filtración al interior de otros organismos propios de estos ecosistemas como cangrejos, ostras, peces etc. (Hood y cols., 1981; Roberts y cols., 1984). Fuera del ecosistema acuático, Vibrio cholerae se ha encontrado asociado a gran cantidad de representantes de los diferentes niveles de cadenas tróficas superiores hasta llegar al hombre, donde puede desencadenar los síntomas asociados al cólera (Lee y cols., 1984).

En resumen, Vibrio cholerae puede existir bien como forma libre (planctónica), bien como forma asociada, estando el equilibrio entre ambas determinado por las condiciones ambientales. Cuando la Tª, pH, salinidad y nutrientes son adecuados para el crecimiento de la especie, Vibrio cholerae sobrevive e incluso crece en estado planctónico. Cuando las condiciones son adversas, sufre un cambio fisiológico que conlleva cambios morfológicos y decrecimiento en tamaño y actividad metabólica (MacDonell y Hood, 1982) pudiendo de esta forma sobrevivir durante largos periodos de tiempo (Hood y cols., 1984). En este momento puede ser transportado, mediante adhesión a detritus o material particulado, hacia el sedimento donde encontraría un microambiente más apropiado al crecimiento, o bien puede asociarse epibiótica o endobióticamente, a organismos vivos con los que tendría una relación de tipo comensal (Huq y cols., 1986). Desde un punto de vista ecológico, Vibrio cholerae ha desarrollado una importante estrategia de supervivencia basada en la multiplicidad de nichos que puede ocupar y en su capacidad de adaptación a las condiciones adversas.

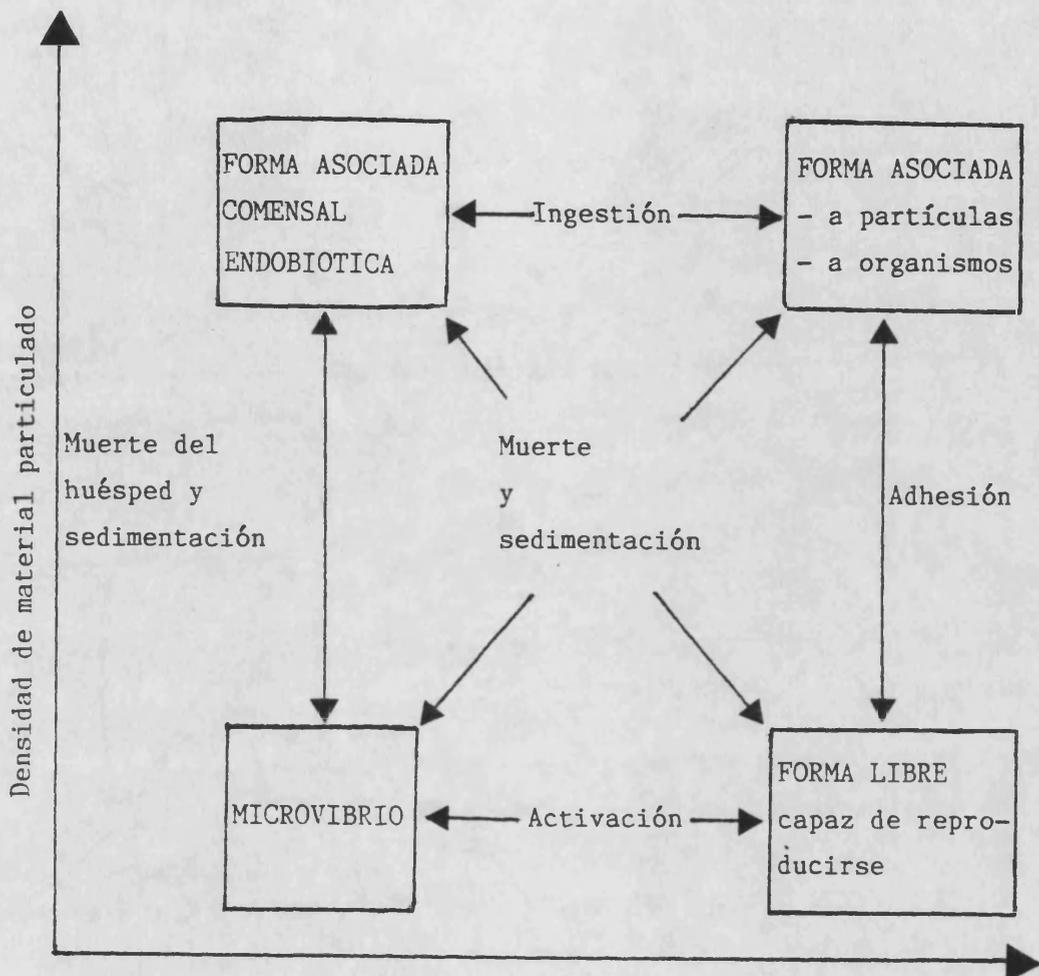
En la Figura 2.1 se presenta un modelo de supervivencia de la especie en ambientes acuáticos que intenta esquematizar todas las hipótesis anteriores.

2.2. MATERIAL Y METODOS

Descripción del área de estudio y selección de los puntos de muestreo

El lago de la Albufera es una laguna somera hipereutrónica de agua dulce, separada del mar por una barra de arena litoral que es atravesada por tres canales. El nivel de agua del lago se regula en función de necesidades agrícolas y pesqueras (fundamentalmente el cultivo de arroz) por medio de compuertas localizadas en cada uno de los canales. Gran cantidad de vertidos urbanos, industriales y agrícolas van a parar al lago a través de más de 50 acequias y canales de riego.

Se eligieron cuatro puntos de muestreo de diferentes características a nivel de dos de los canales que comunican el lago de la Albufera con el mar Mediterráneo: gola de Puchol y gola del Perelló (Figura 2.2). Los puntos de muestreo 1 y 3, corresponden a agua de la Albufera y están situados justo antes del comienzo de las golas de Puchol y Perelló respectivamente. El punto 1 se localiza exactamente en el lago y el punto 3 en un canal que recoge agua del lago tras haber recorrido 7 Km a través de acequias de riego. A esta gola van a parar los vertidos urbanos del pueblo de El Perelló (1000-3000 habitantes). Los puntos 2 y 4 están localizados en el mar, bajo la influencia de las descargas de agua dulce procedentes del lago a través de las golas de Puchol y Perelló respectivamente. De este modo se analizaron muestras de agua y zooplancton de aguas con diferentes salinidades.



Optimización de los parámetros físico-químicos

FIGURA 2.1. Modelo propuesto para la supervivencia de Vibrio cholerae en los ecosistemas acuáticos (elaborado, con modificaciones menores, a partir de diversos autores recopilados en R.R. Colwell, ed., 1984).

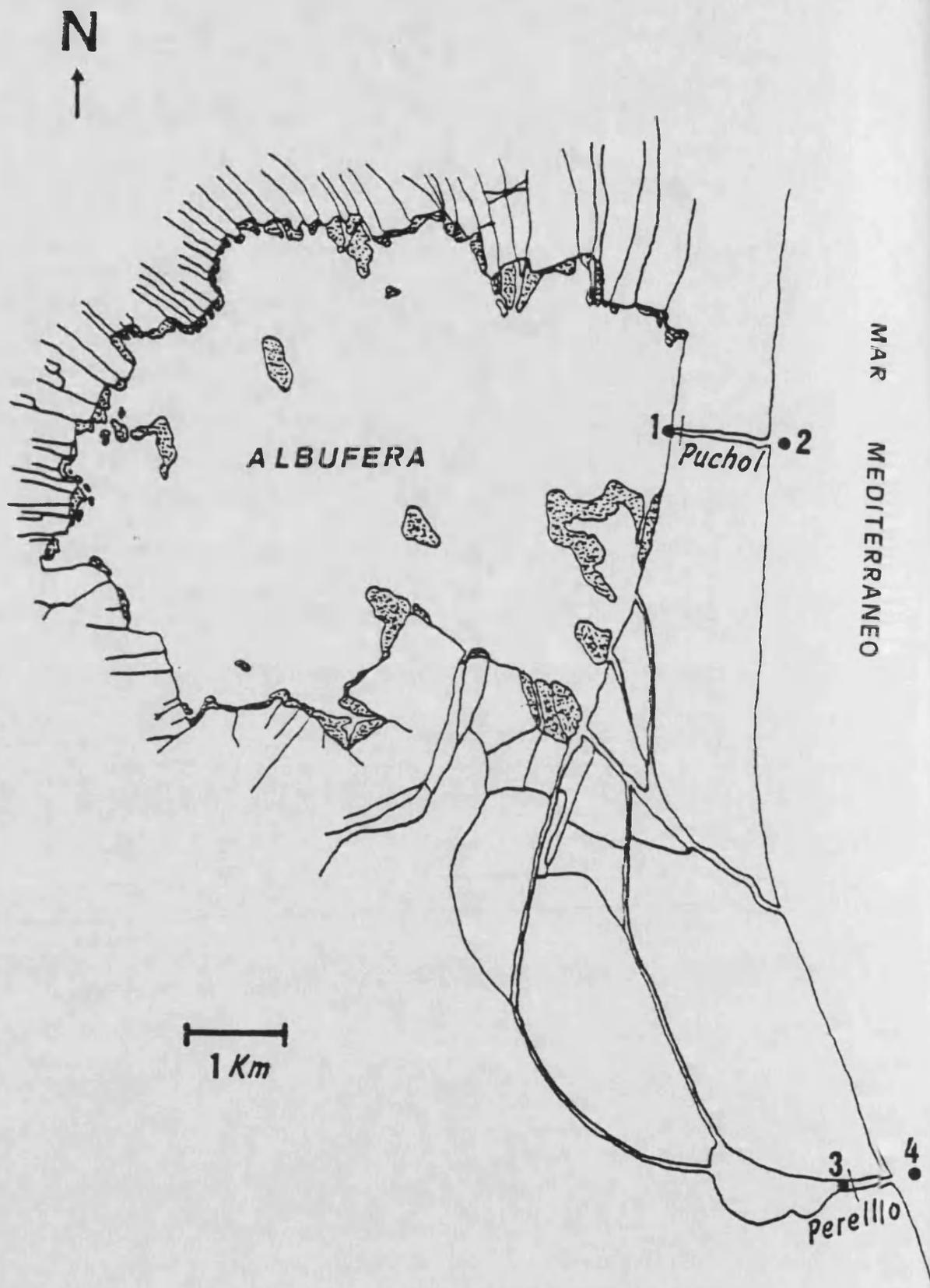


FIGURA 2.2. Mapa del lago de la Albufera y canales de comunicación con el mar. Se indican los puntos seleccionados para la toma de muestras.

Muestreos

Durante el periodo correspondiente a un ciclo anual, se recogieron un total de 40 muestras de agua y zooplancton en 20 muestreos. La frecuencia de los muestreos estuvo supeditada a la temperatura del agua para conseguir el mismo número de muestras en cada intervalo de temperaturas (Tabla 2.1) (10 muestras por debajo y 10 por encima de 20°C).

a) Muestras de agua. Se tomaron a contracorriente en botellas estériles de 500 ml de capacidad y a 15 cm por debajo de la superficie, conservándose refrigeradas durante un período no superior a 2 horas hasta su procesamiento en el laboratorio (A.P.H.A., A.W.W.A, W.P.C.F., 1980).

b) Muestras de zooplancton. En el mar, la recogida se efectuó por arrastre de red de plancton provista de distintos tamaños de trama (60 μm -250 μm), a una velocidad aproximada de 2-3 nudos. En las golas, se utilizó también la red cuando las compuertas estaban abiertas, colocándola en el centro de las mismas para aprovechar la corriente de salida del agua. Cuando éstas estaban cerradas, se tomaron 10 l de agua que se filtraron en el laboratorio a través de malla estéril de 60 μm de diámetro de trama. Las muestras se procesaron, previa determinación de su peso seco, en un periodo no superior a 2 h mediante resuspensión por agitación vigorosa en un volumen conocido de solución de cuatro sales y filtración a través de malla estéril de idéntico tamaño de trama (Kaneko y Colwell, 1978).

Parámetros ambientales

La temperatura del agua fue medida in situ con un termómetro de mercurio. El pH y la salinidad fueron determinados en el laboratorio, utilizándose respectivamente un pHmetro Crison Digit 74 y el método argentométrico (APHA, AWWA, WPCF, 1980).

Parámetros bacteriológicos: cuantificación e identificación de *Vibrio* spp. y *Vibrio cholerae*

Se seleccionó el método del número más probable (NMP) para la evaluación de los niveles de vibrios no halófilos (*Vibrio* spp.) y de *Vibrio cholerae*, debido a que permite obtener un mayor porcentaje de recuperación de estos microorganismos en relación con las técnicas de siembra directa en placa. Además, las aguas con elevada turbidez, como es el caso de la Albufera, no suelen ser adecuadas para recuentos bacterianos mediante el sistema de membranas filtrantes (Martínez Germes y cols., 1981).

Se inocularon volúmenes de 100, 10, 1 y 0.1 ml de agua o de suspensión bacteriana procedente de las muestras de zooplancton, en las series correspondientes de matraces y tubos según la combinación 3-3-3 (APHA, AWWA, WPCF, 15ª edición, 1980) empleándose como medio de enriquecimiento Agua de Peptona Alcalina (APA, pH 8.6)). Los volúmenes de 100 ml, se filtraron previamente a través de filtros de membrana (0.45 μm ; Millipore corp.) que fueron colocados en matraces conteniendo 100 ml de APA. El resto de las muestras, tanto de agua

TABLA 2.1 Fechas de los muestreos correspondientes a las dos golas estudiadas.

N° de muestreo	Gola	
	Puchol	Perelló
1	11- 1-82	25- 1-82
2	1- 2-82	8- 2-82
3	24- 2-82	17- 5-82
4	3- 5-82	14- 6-82
5	1- 6-82	7- 7-82
6	21- 6-82	2- 8-82
7	26- 7-82	13- 9-82
8	6- 9-82	29- 9-82
9	27- 9-82	23-11-82
10	7-12-82	13-12-82

como de zooplancton, se sembraron directamente en una serie de tres matraces y dos series de tres tubos, conteniendo respectivamente 90, 9 y 9.9 ml de APA. La incubación se realizó a 28 °C durante 18 h. En épocas de temperatura elevada se inocularon diluciones de las muestras originales con el fin de obtener resultados cuantificables.

Los enriquecimientos procedentes de las muestras de agua y plancton fueron sembrados por estría sobre Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) y Monsur (Furniss y cols., 1978; Morris y cols., 1979), e incubados durante 18 - 24 h a 35 ° C. Tras la incubación en TCBS, las colonias de los microorganismos pertenecientes al género Vibrio aparecen de color amarillo debido a la fermentación de la sacarosa, a excepción de alguna especie y de los biogrupos V, VI, VII y VIII de Heiberg. El medio de Monsur es menos selectivo pero permite detectar la presencia de vibrios en condiciones en que éstos no aparecen en TCBS. Sobre Monsur, las colonias de vibrios presentan un centro oscuro debido a la reducción del telurito y un halo opaco. De cada placa de medio selectivo se eligieron dos colonias con morfología correspondiente a la descrita para Vibrio y se emulsionaron en solución salina estéril (NaCl 0.9 %), sembrándose posteriormente sobre Agar Nutritivo (NA) o Agar Triptona-Soja (TSA). La incubación se efectuó a 35 °C durante 18 - 24 h.

Las colonias así purificadas fueron sometidas a la batería de pruebas fenotípicas que se indican a continuación con el fin de incluirlas o no en el género Vibrio (Sakazaki y Balows, 1981).

- Tinción Gram: a partir de cultivos líquidos de 18 h.

- Oxidasa: Cultivos de 18 h en TSA fueron extendidos sobre un papel de filtro impregnado con reactivo de Kovac. La formación de un

color azul-violeta intenso en menos de 10 s fue considerado como prueba positiva. La extensión se realizó con asa de vidrio para evitar falsos positivos.

- Movilidad: se determinó en el medio semisólido Sulfuro-Indol-Movilidad (SIM) tras 24 h de incubación a 28°C.

- Metabolismo oxifermentativo de la glucosa: el medio utilizado fue el agar hierro de Kligler. La acidificación de la zona anaerobia después de 24 h de incubación a 28°C, se consideró como prueba positiva de anaerobiosis facultativa.

- Producción de gas en la fermentación: se determinó tanto en agar hierro de Kligler, por la formación de burbujas en el agar, como en medio base para la fermentación, por acumulación de gas bajo la campana Durham. Los cultivos de uno y otro medio se incubaron 24 h a 28°C.

- Producción de H₂S; se determinó en Agar Hierro de Kligler y SIM mediante la observación del ennegrecimiento del fondo del tubo provocada por la precipitación de SFe, tras la incubación a 28°C, 24 h.

- Sensibilidad a O/129: Los discos impregnados en el agente vibriostático 2,4 diamino 6,7 diisopropil pteridina (O/129; 20 y 150 µg/disco) fueron colocados en el centro de placas de NA sembradas por césped. Tras 24 h de incubación a 28 °C, cualquier grado de inhibición del crecimiento alrededor de los discos se consideró como resultado positivo.

La presencia de microorganismos Gramnegativos, móviles, oxidasa positivos, fermentadores de la glucosa sin producción de gas, no productores de H₂S y sensibles a O/129, confirmó la presencia del



género Vibrio en las muestras de agua y plancton correspondientes y permitió el cálculo del NMP a partir de las Tablas de McCrady (Collins, 1969).

Para determinar que proporción de los vibrios recuperados en los distintos muestreos pertenecía a la especie Vibrio cholerae, se completó la caracterización con las pruebas que se reseñan a continuación. En todos los casos, se incubaron los medios a 35°C:

- Detección de descarboxilasas para arginina, lisina y ornitina: se inoculó el medio para descarboxilación con el aminoácido correspondiente y se cubrió con aceite mineral estéril para crear anaerobiosis. tras 24-48 h de incubación, los tubos que presentaron sólo acidificación debido a la fermentación de la glucosa, se consideraron negativos. Los tubos con alcalinización y turbidez se dieron como positivos para la descarboxilasa correspondiente.

- Crecimiento en ausencia de NaCl: se determinó en el medio líquido STB (caldo de tolerancia a la sal), tras incubación de 24 h (Twedt, 1978).

- Producción de ácido a partir de la lactosa. Se usó el medio agar hierro de Kligler, dándose la prueba como positiva cuando aparecía acidificación en todo o en parte del tramo inclinado (aerobio) del tubo.

En este nivel de identificación, se clasificaron como microorganismos pertenecientes a la especie Vibrio cholerae los no fermentadores de la lactosa, capaces de crecer en ausencia de NaCl y que descarboxilan la lisina y ornitina pero no la arginina. El NMP para la especie en agua y plancton se calculó mediante las mencionadas Tablas de McCrady.

Pruebas complementarias

Todos los aislamientos confirmados como Vibrio cholerae fueron sometidos a una batería de pruebas adicionales por su significado clínico o ecológico:

- Determinación del biogrupo de Heiberg: Heiberg (1934) propuso una clasificación bioquímica de las cepas de Vibrio cholerae basada en la fermentación de los azúcares sacarosa, manosa y arabinosa, por la cual se establecieron seis grupos diferentes (I-VI). Posteriormente Smith y Goodner (1965) añadieron a esta clasificación dos grupos más.

- Utilización de la quitina como fuente de carbono: Esta se adiciona al Medio Basal de Kaneko y Colwell (1978) y los tubos se incuban durante 21 días a 25°C. La lectura se efectúa por comparación de turbidez con un tubo control negativo.

- Determinación del serotipo: Se partió de cultivos de 18 h crecidos sobre TSA utilizándose sueros comerciales polivalentes y monovalentes (Difco) y sueros polivalentes suministrados por H. Smith (Vibrio Reference Library, Philadelphia, Pa). Se realizó sobre portaobjetos, con los correspondientes controles negativos.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA, Sokal y Rohlf, 1979) con los datos de NMPs transformados logarítmicamente (\log_{10}) al objeto de conocer la influencia de la temperatura (fría-caliente),

tipo de agua analizada o ambiente (mar-lago), y características del punto de muestreo (Puchol-Perelló) sobre la recuperación de Vibrio cholerae. Dado que fue imposible cuantificar el flujo de agua lacustre que se vertía a través de las compuertas en los diferentes muestreos, se determinó indirectamente la descarga de la misma al mar a partir de los datos de disminución de la salinidad. Asimismo, se comprobó si existían diferencias significativas en la utilización de la quitina entre las cepas de Vibrio cholerae de agua y plancton. Se consideraron los siguientes efectos: temperatura (fría-caliente), gola (Puchol-Perelló), tipo de agua o ambiente (mar-lago), y tipo de muestra (agua- plancton). Los datos fueron transformados mediante la relación $\log_{10} (x+1)$.

Selección y conservación de las cepas

Una vez caracterizados los aislamientos a este primer nivel, se procedió a una selección de cepas ambientales de Vibrio cholerae de agua y plancton que fueron utilizadas en los ensayos que se describen en los capítulos siguientes. En la Tabla 2.2 figura el origen de estas cepas respecto a tipo de muestra, época del año y localización.

Paralelamente se utilizaron como controles en los ensayos, las siguientes cepas de colección:

- Vibrio cholerae 01 NCTC 3661
- Vibrio cholerae 01 NCTC 7270
- Vibrio cholerae 01 NCTC 7254

TABLA 2.2. Origen de las cepas ambientales de Vibrio cholerae estudiadas.

Cepas	num.	Punto	Muestra	Fecha	Temp., °C	pH	Salinidad, ‰
72-78	2	2	agua	11- 1-82	13	8.0	-
94	1	1	agua	11- 1-82	15	8.5	-
110-116	6	4	agua	25- 1-82	11	8.1	8.27
123-127	2	3	agua	25- 1-82	9	8.3	0.47
134-137	2	2	agua	1- 2-82	12	8.3	21.26
147-148	3	4	agua	8- 2-82	14	7.9	28.09
150-152	3	3	agua	8- 2-82	13	8.0	0.6
153-155	3	2	agua	24- 2-82	12	7.9	21.8
156-173	12	1	agua	3- 5-82	21	8.0	0.7
178-182	3	3	agua	17- 5-82	21	7.4	0.8
187-194	9	1	agua	1- 6-82	23	9.1	0.06
195-201	6	2	agua	1- 6-82	22	8.2	11.87
204	1	4	agua	7- 7-82	28	7.4	12.79
209-219	11	3	agua	7- 7-82	29	7.4	1.37
220-248	29	1	agua	26- 7-82	31	8.7	1.4
251-270	17	2	agua	26- 7-82	29	7.9	21.9
E-D	2	1	agua	6- 9-82	25.5	8.9	0.58
1-13	5	3	agua	23-11-82	14	8.7	0.27
13-18	3	4	agua	23-11-82	15	7.6	30.22
24-39	6	1	agua	27- 9-82	25.5	8.9	0.58
30	1	2	agua	27- 9-82	25	8.3	34.78
47-57	2	4	agua	13- 2-82	14	7.7	27.5
66A-67A	2	1	plancton	11- 1-82	15	8.5	-
70A-71A	2	2	plancton	11- 1-82	13	8.0	-
73A-75A	3	3	plancton	25- 1-82	9	8.3	0.47
76A	1	4	plancton	25- 1-82	11	8.1	8.27
82A-84A	3	4	plancton	8- 2-82	14	7.9	28.09
93A-94A	2	3	plancton	17- 5-82	21	7.4	0.8
96A-98A	2	4	plancton	17- 5-82	19	7.8	-
114A-128A	5	1	plancton	1- 6-82	23	9.1	0.06
140A-149A	4	3	plancton	7- 7-82	28	7.4	12.79
155A-167A	6	4	plancton	23-11-82	15	7.6	30.22

- Vibrio cholerae 01 NCTC 8021
- Vibrio cholerae 01 ATCC 25870
- Vibrio cholerae No 01 ATCC 11195

Tanto las cepas ambientales como las cepas de colección utilizadas a lo largo del estudio, se conservaron por dos métodos simultáneos:

- Sobre agar nutritivo a temperatura ambiente:

"Long-Term preservation medium (LPTM) inoculado por picadura e incubado a 35°C 18 h. Los cultivos se conservaron en tubos de tapón de rosca, a temperatura ambiente y en la oscuridad, por un periodo no superior a seis meses. Las resiembras periódicas se realizaron sobre medio no selectivo (TSA, NA) comprobándose en cada caso la pureza de la cepa.

- Por liofilización:

Cultivos de las cepas, en fase logarítmica de crecimiento, se resuspendieron en glucosa 7.5% o leche descremada y se sometieron a liofilización.

Observaciones microscópicas

a) Microscopía óptica: La observación de las tinciones de Gram se realizó en un fotomicroscopio Zeiss III.

b) Microscopía electrónica:

- Microscopía electrónica de barrido. Se utilizó para la observación de los microorganismos adheridos al zooplancton según la metodología de Amsellem y Clement (1980). Los especímenes fueron situados en pequeños pocillos limitados por membranas de 0.45 μm de diámetro de poro para permitir el cambio de soluciones sin producir el desprendimiento de la muestra. La fijación se realizó con glutaraldehído (0.3%) tamponado con cacodilato sódico 0.1 M (pH 7.3) durante 2 h a 4°C. Seguidamente las muestras fueron lavadas en el mismo tampón y deshidratadas empleando una serie de disoluciones acuosas de etanol, desde el 10% hasta alcohol puro. Posteriormente, el alcohol se sustituyó por acetato de amilo para proceder a la realización del punto crítico según Anderson (1951), utilizándose un aparato Belzers Union. Seguidamente, se colocaron sobre una película de plata situada en el bloque portamuestras, y se recubrieron de una fina capa de oro en un Jeol Ion Sputter JFC-1100. La observación se realizó en un microscopio electrónico de barrido Jeol Scanning Microscope 25-S.

- Microscopía electrónica de transmisión. Se empleó para la observación de los flagelos de las cepas aisladas mediante la técnica de tinción negativa, utilizándose molibdato amónico (1%) en tampón de acetato amónico 0.1 M. La observación se realizó en un Jeol Electron Microscope 100-S.

Composición de los medios de cultivo y reactivos

- Medios para el aislamiento e identificación de Vibrio spp

a) Medio de enriquecimiento

Agua de Peptona Alcalina 1% NaCl (APA)

Peptona 1.0%

NaCl 0.5%

Agua destilada

pH, 8.6

Esterilización: 121°C, 20 min.

b) Solución de cuatro sales

NaCl 2.40%

MgSO₄·7H₂O 0.70%

MgCl₂·3H₂O 0.53%

KCl 0.07%

Agua destilada

pH, 7.6

Esterilización: 121°C, 20 min.

Fue utilizado como solución de lavado del zooplanc-
ton.

c) Medios sólidos selectivos de aislamiento

Agar Tiosulfato Citrato Bilis sacarosa (TCBS, Difco)

Medio de Monsur

Triptona 1.0%

NaCl 1.0%

Taurocolato sódico 0.5%

Na₂CO₃ 0.1%

Gelatina 1.5%

Agua destilada

pH, 8.5

Esterilización: 121°C, 15 min. Se deja enfriar a 50°C y se añaden 10 ml de una solución reciente de telurito potásico en agua 1/1000, esterilizada por filtración. El medio se debe utilizar 3 o 4 días después de la adición de telurito.

d) Medios sólidos de purificación de las colonias

Agar Triptona Soja (TSA)

Triptona	1.5%
Soyotona	0.5%
NaCl	0.5%
Agar Bacteriológico	1.5%

Agua destilada

pH, 7.4

Esterilización: 121°C, 20 min.

Agar Nutritivo (NA)

Peptona	1.0%
Extracto de carne	1.0%
Agar Bacteriológico	1.5%

Agua destilada

pH, 7.4

Esterilización: 121°C, 20 min.

e) Medios para la identificación de Vibrio spp. y Vibrio cholerae

Agar Hierro de Kligler (Oxoid)

Agar Sulfuro-Indol-Movilidad (SIM, Oxoid)

Medio para la descarboxilación de aminoácidos

Descarboxilase Medium Base (Difco) 0.9%

NaCl 0.5%

Agua destilada

Los siguientes aminoácidos fueron añadidos al

0.5%:

L-Arginina, L-Lisina o L-Ornitina

pH, 7.0

Esterilización 121°C, 15 min.

Caldo de tolerancia a la sal (STB)

Triptona 1.0%

Extracto de levadura 0.3%

Agua destilada

pH, 7.2

Esterilización: 121°C, 15 min.

Medio para la fermentación de azúcares

Peptona	1.0%
Extracto de carne	0.3%
NaCl	0.5%
Azul de Bromotimol	0.004%

Agua destilada

pH, 7.6

Los carbohidratos utilizados para la determinación del biogrupo de Heiberg, fueron añadidos al 1%, esterilizándose el medio completo a 115°C, 15 min.

Medio mínimo para la utilización de quitina (Kaneko y Colwell, 1978)

K_2PO_4	0.1%
NaCl	0.5%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05%
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01%
NH_4Cl	0.1%

Quitina pulverizada

pH, 7.0

Esterilización: 121°C, 15 min.

f) Medio de conservación

Medio LTPM ("Long time preservation medium")

Peptona	1.0%
Extracto de carne	0.3%
NaCl	0.5%
Agar bacteriológico	0.3%

Agua destilada

pH, 7.2

Esterilización: 121°C, 15 min.

- Reactivos para la lectura de las pruebas fenotípicas

a) Reactivo de la oxidasa (de Kovac)

N,N,N',N'' tetrametil 1,4 fenilen-diamonio-dicloruro	0.1 g
Agua destilada	10 ml
Debe usarse inmediatamente.	

b) Reactivo del indol

para-dimetildiaminobenzaldehido	10 g
Alcohol isoamílico	75 ml
Acido clorhídrico	25 ml

2.3. RESULTADOS

Parámetros ambientales

Temperatura

La evolución anual de la temperatura de las dos golas, se indica en la Figura 2.3. Los valores en todos los puntos registraron importantes oscilaciones entre los periodos cálido y frío, siendo éstas más acusadas en el caso de las muestras de la Albufera que en el mar. Las temperaturas máximas y mínimas de los distintos puntos aparecen reflejadas en la Tabla 2.3, así como el mes correspondiente a la medida.

pH

Los valores de pH se mantuvieron siempre por encima de la neutralidad en todos los puntos muestreados a lo largo del ciclo anual. En las muestras de lago, y tal como cabía esperar de una laguna hipereutrófica, los valores de pH fueron superiores, alcanzando valores marcadamente alcalinos. En la gola del Perelló se observó una evolución del pH (Figura 2.3) similar en los dos puntos de muestreo salvo en dos casos coincidentes con épocas en que, por exigencias del cultivo de arroz, las compuertas estuvieron cerradas.

TABLA 2.3. Valores máximos y mínimos de los parámetros que se indican. Los recuentos de los microorganismos se efectuaron por el método del NMP y se expresan en individuos/ml e individuos/gramo para las muestras de agua y zooplancton respectivamente.

		pH ^a	Temp, °C ^a	<u>Vibrio spp,</u>		<u>Vibrio cholerae,</u>	
				agua	plancton	agua	plancton
Mar							
Gola Puchol	máx	8.3(F)	29(J)	10 ⁴	10 ⁴	10 ²	10 ³
	mín	7.9(J)	12(F)	3	0	0	0
Gola Perelló	máx	8.3(S)	28(J)	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵
	mín	7.5(J)	12(E)	2	40	0	0
Albufera							
Gola Puchol	máx	9.2(F)	31(J)	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
	mín	8.2(M)	11(D)	10 ²	80	0	0
Gola Perelló	máx	8.2(Jn)	29(A)	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴
	mín	8.3(S)	10(E)	6	3	6	0

a. Mes correspondiente a la medida (E: Enero; F: Febrero; M: Mayo; Jn: Junio; J: Julio; A: Agosto; S: Septiembre; D: Diciembre)

La evolución de este parámetro en la gola de Puchol (Figura 2.3) fue diferente para cada punto de muestreo, debido a que las compuertas estuvieron casi siempre cerradas. Los pH máximos y mínimos del ciclo anual, así como el mes correspondiente a la medida, aparecen en la Tabla 2.3.

Salinidad

En la Tabla 2.4 se muestran los valores de salinidad obtenidos así como el estado de las compuertas durante los muestreos. Puede apreciarse que éste influye en la salinidad del agua de mar al suponer la apertura de las golas, un aporte de agua dulce procedente de la Albufera. Así pues, mientras que la salinidad de la Albufera no superó nunca el 2.5‰, la salinidad de los puntos de mar (2 y 4), mostró grandes fluctuaciones (8.27-34.78‰).

Parámetros bacteriológicos

a) NMP de Vibrio spp. y Vibrio cholerae en agua

La Figura 2.4 muestra los NMPs calculados, a lo largo del ciclo anual, a partir de las muestras de agua tomadas en las golas. En la Tabla 2.3 se indican los valores máximos y mínimos de los recuentos.

- Gola del Perelló

NMP Vibrio spp. En más de un 50% de los muestreos, los recuentos de vibrios en la Albufera fueron superiores a los del mar en un orden de una unidad logarítmica, aproximadamente. Los valores

TABLA 2.4. Valores de salinidad (en %) y número de compuertas abiertas en cada uno de los diferentes muestreos.

		Muestreo									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gola Puchol											
Salinidad	lago	-	0.56	0.64	0.7	0.06	1.4	1.43	0.57	0.58	0.34
	mar	-	21.26	21.8	32.7	11.87	30.38	21.88	12.03	34.78	28.5
Compuertas		1	3	1 ^a	0	4	0	0	6	3 ^a	0
Gola Perelló											
Salinidad	lago	0.47	0.6	0.8	-	1.37	-	2.5	0.81	0.27	0.24
	mar	8.27	28.09	-	-	12.79	13.45	14.03	21.98	30.22	27.5
Compuertas		1	1	0	0	1	1	2	2	0	0

a. Barra de arena en la bocana.

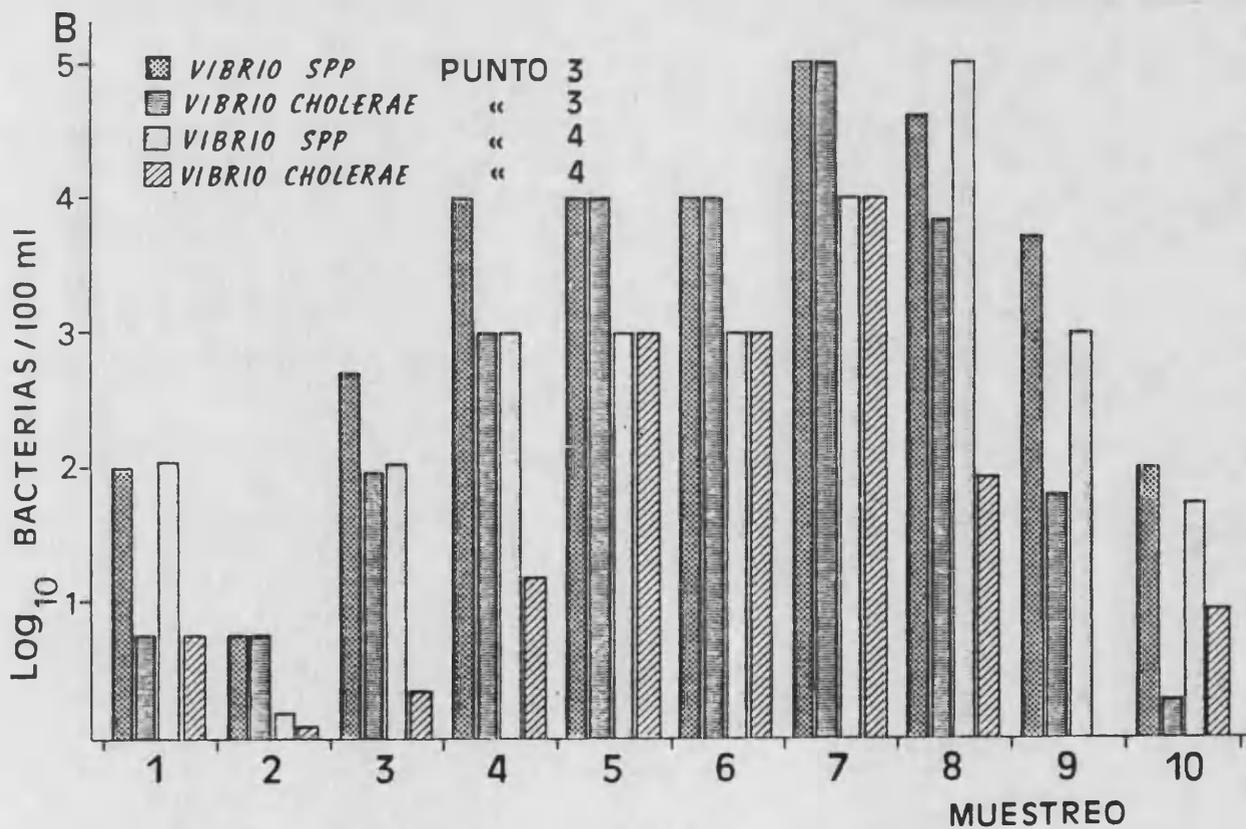
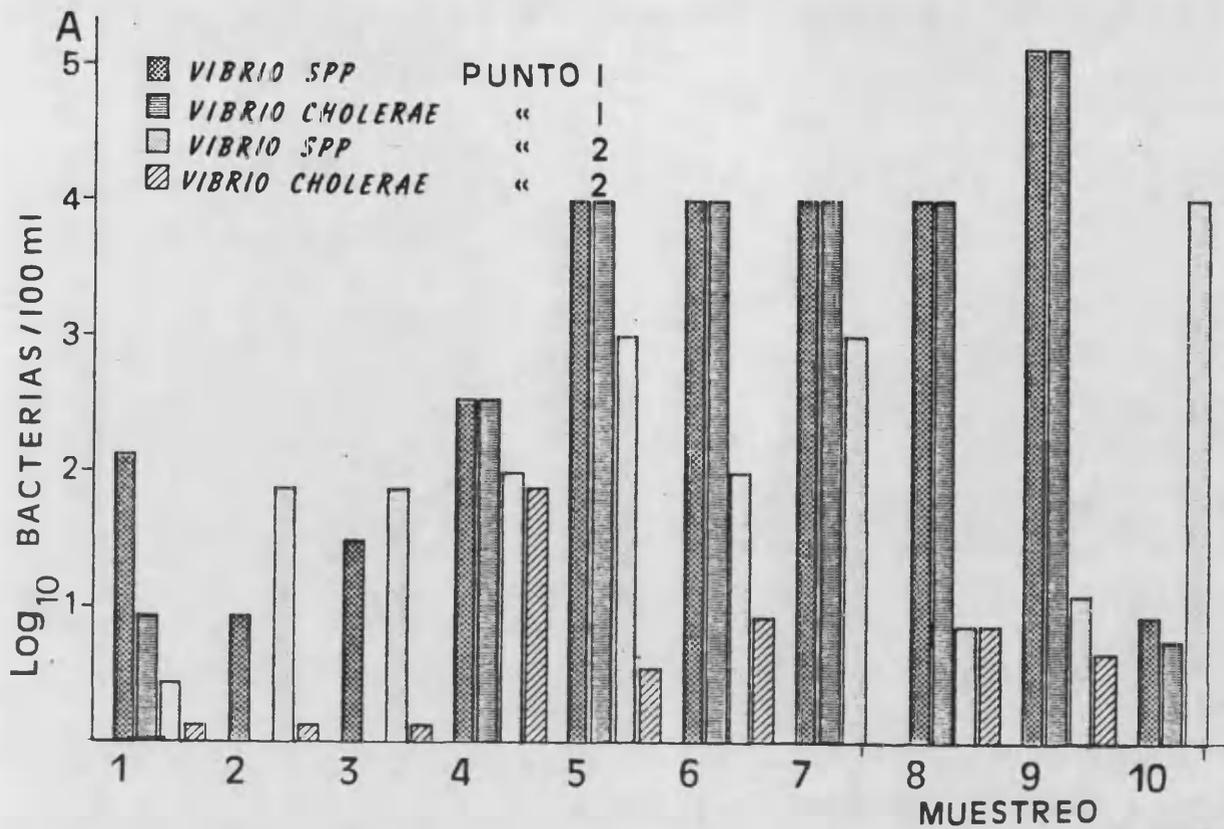


FIGURA 2.4. NMPs de *Vibrio spp* y *Vibrio cholerae* de las muestras de agua. A, gola de Puchol; B, gola del Perelló.

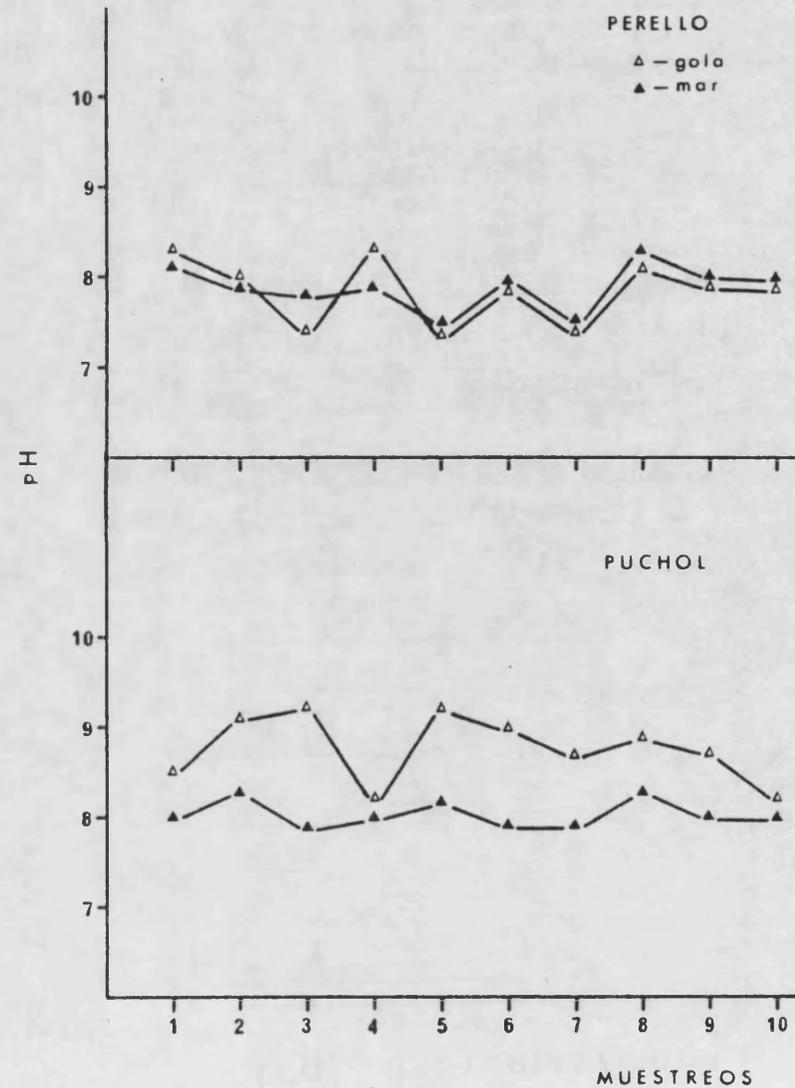
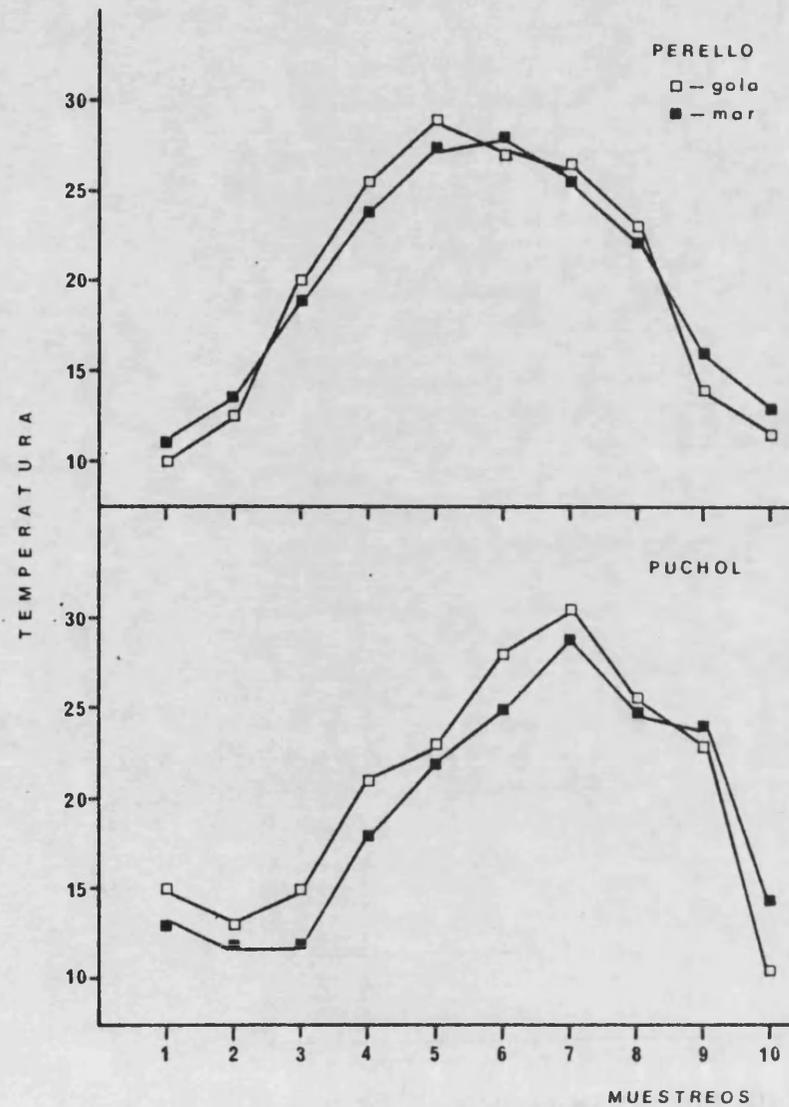


Figura 2.3. Evolución anual de la temperatura y del pH en las dos golas objeto de estudio.

máximos y mínimos, tanto para el mar como para la Albufera, corresponden a las épocas cálidas (Septiembre, temperatura media superior a 20°C), y frías (Febrero, temperatura media inferior a 13°C) respectivamente.

NMP Vibrio cholerae. Los niveles de esta especie fueron del orden de 1 a 3 unidades logarítmicas superiores en los muestreos de agua dulce. El nivel máximo, tanto de mar como de lago, correspondió al mes de Septiembre (temperatura media, 25°C), y el más bajo a los meses de Enero y Febrero (temperatura media, 10-12°C). Es de destacar que no se detectó presencia de Vibrio cholerae en el mar durante el mes de Noviembre (temperatura media, 16°C).

- Gola de Puchol

NMP Vibrio spp. Los recuentos de vibrios aislados de la Albufera fueron entre 1 y 4 unidades logarítmicas mayores que los encontrados en el mar, a excepción de un muestreo que precisamente correspondió al valor máximo (10^4 microorganismos/ml) de las muestras de mar y que se registró en el mes de Diciembre (temperatura media, 14.5°C). Los valores máximos y mínimos, tanto de agua dulce como de mar, se detectaron igualmente en las épocas cálidas (Septiembre; temperatura media, 24°C) y frías (Enero y Febrero; temperatura media, 13°C), salvo la excepción mencionada.

NMP Vibrio cholerae. Los recuentos en el lago fueron de 1 a 4 unidades logarítmicas superiores a los de mar, no aislándose esta especie en el mes de Febrero (temperatura media, 14°C). Los niveles máximos y mínimos en agua dulce correspondieron a los meses de Septiembre (temperatura media, 24°C) y Febrero (temperatura media,

14°C) respectivamente; en agua de mar, el recuento máximo se registró en el mes de Mayo (temperatura media, 18°C) y el mínimo en los meses de Julio (temperatura media, 29°C) y Diciembre (temperatura media, 14.5°C), durante los cuales no se aisló Vibrio cholerae. Conviene resaltar que el muestreo del mes de Julio, fue el único de los realizados en épocas de temperatura superior a 20°C, que dió ausencia de la especie.

Comparando las figuras correspondientes a las dos golas, puede observarse que los recuentos de Vibrio spp y Vibrio cholerae han sido siempre más elevados en las muestras de lago, y que los recuentos de agua de mar son mayores cuando ésta proviene del Perelló. Hay que resaltar que en el 60% de los muestreos de agua dulce efectuados en la gola de Puchol y en el 40 % de los del Perelló, el 100% de los vibrios recuperados perteneció a la especie Vibrio cholerae.

b) NMP de Vibrio spp. y Vibrio cholerae en plancton

En la Tabla 2.3 aparecen los valores máximos y mínimos registrados en cada punto, y en la Figura 2.5 pueden compararse las distribuciones de los recuentos realizados a lo largo del ciclo anual.

- Gola del Perelló

NMP Vibrio spp. Los recuentos en las muestras de plancton de mar fueron superiores a los de agua dulce en el 60% de los casos, al contrario de lo que ocurría con las muestras de agua. Los máximos y mínimos, para ambos tipos de muestras, correspondieron a las épocas cálidas (Agosto y Septiembre; temperatura media, 26°C) y frías (Febrero; temperatura media, 12.5°C) respectivamente.

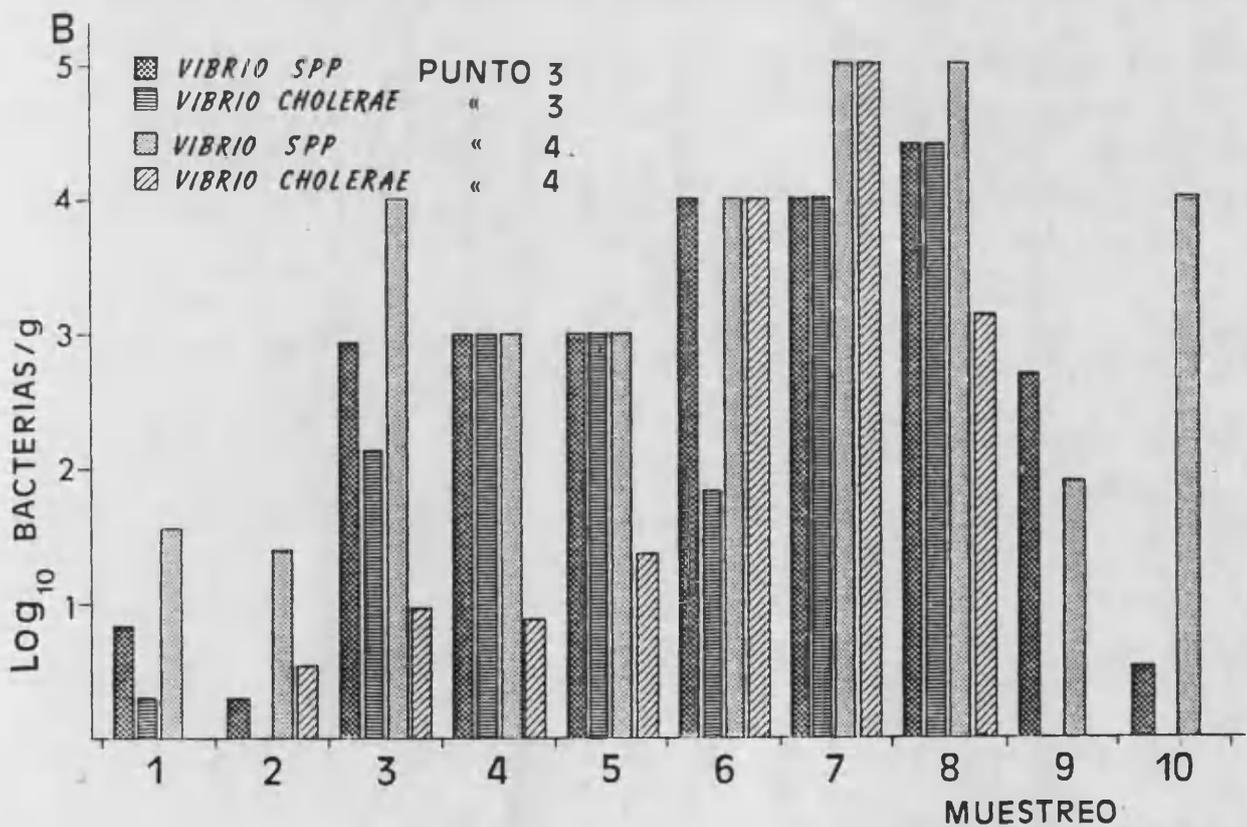
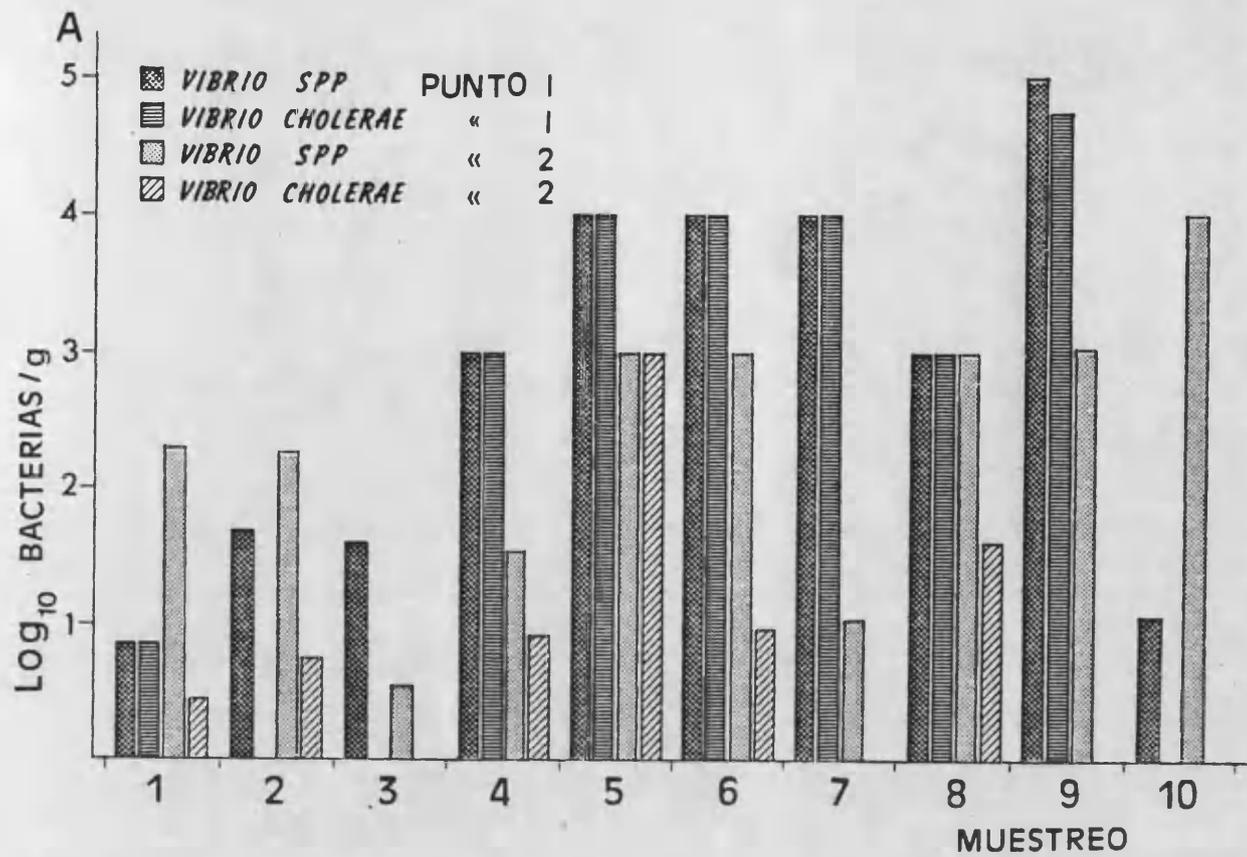


FIGURA 2.5. NMPs de *Vibrio* spp y *Vibrio cholerae* de las muestras de plancton. A, gola de Puchol; B, gola del Perelló.

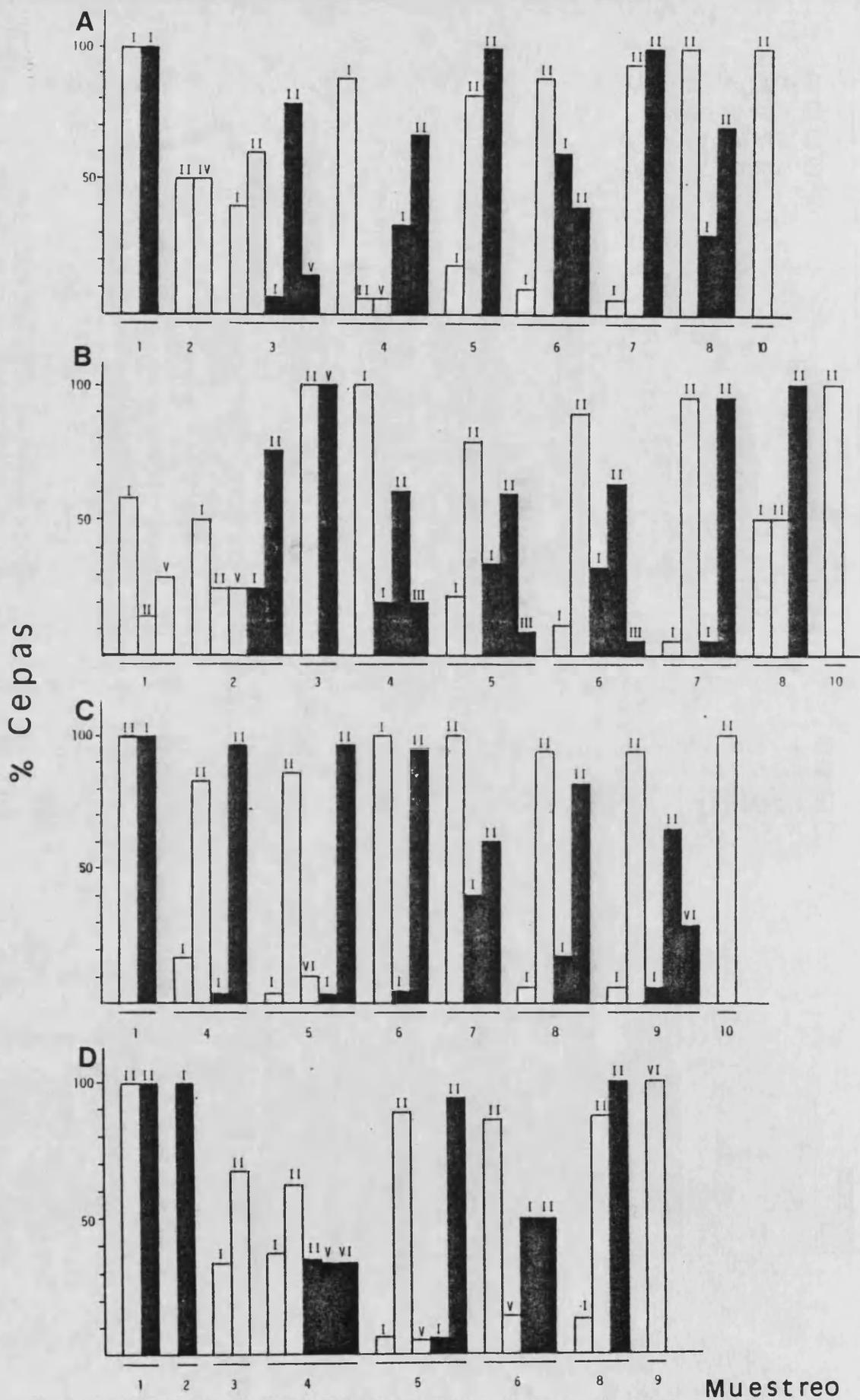


FIGURA 2.6. Distribución de los grupos de Heiberg en las muestras de agua y plancton. A, punto 1; B, punto 2; C, punto 3; D, punto 4.

□ AGUA ■ PLANCTON

NMP Vibrio cholerae. Los recuentos en las muestras de plancton de la Albufera fueron mayores y presentaron una elevada homogeneidad a lo largo de los diferentes muestreos. Por el contrario, en el mar se observaron fluctuaciones importantes, no superando 1 microorganismo/g en el 30% de los casos. Los valores máximos y mínimos correspondientes al plancton de agua dulce se alcanzaron en el mes de Septiembre (temperatura media, 25°C) y en los meses de Febrero (temperatura media, 12.5°C), Noviembre (temperatura media, 14°C) y Diciembre (temperatura media, 11.5°C) respectivamente, meses en que no se aisló la especie. Los máximos y mínimos de plancton de agua de mar fueron detectados en Septiembre (temperatura media, 24°C) y en los meses de Enero (temperatura media, 11°C), Noviembre (temperatura media, 16°C) y Diciembre (temperatura media, 13°C) respectivamente, correspondiendo estos últimos a ausencia de Vibrio cholerae.

- Gola de Puchol

NMP Vibrio spp. Los recuentos del 60% de las muestras de plancton de la Albufera fueron de 1 a 3 unidades logarítmicas superiores a los de mar. El valor máximo se registró en Septiembre (temperatura media, 24°C) y el mínimo en Enero (temperatura media, 15°C). En los aislamientos de plancton de mar, al igual que ocurrió con los de agua, se alcanzó el nivel máximo a temperatura inferior a 20°C, concretamente en Diciembre, cuando la temperatura media fue de 14°C. En Febrero (temperatura media, 14°C), los recuentos alcanzaron el valor mínimo.

NMP Vibrio cholerae. Los recuentos de esta especie asociada a plancton de lago fueron muy superiores a los encontrados en el mar, a

excepción de un muestreo. Los máximos y mínimos correspondieron a Septiembre (temperatura media, 24°C) y a los meses de Febrero (temperatura media, 14°C) y Diciembre (temperatura media, 10.5°C), no detectándose la especie en el 30% de los muestreos. En las muestras de mar, el máximo se alcanzó en Junio (temperatura media, 25°C) y no se aisló Vibrio cholerae en los meses de Febrero (temperatura media, 12°C), Julio (temperatura media, 29°C), Septiembre (temperatura media, 24°C) y Diciembre (temperatura media, 14.5°C).

Comparando las figuras que representan los niveles de Vibrio spp. y Vibrio cholerae asociados a muestras de plancton, puede apreciarse una evolución similar a la encontrada para muestras de agua. Así, para agua de mar, los NMPs son generalmente superiores en la gola del Perelló, mientras que en agua dulce, es la gola de Puchol la que presenta mayores recuentos. En el 40% de los muestreos de plancton de agua dulce de la gola del Perelló y en el 60% de los de Puchol, el 100% de los vibrios recuperados fueron identificados como Vibrio cholerae. No se detectó esta especie en el 30% de los muestreos efectuados en ambas golas.

La Tabla 2.5 refleja los resultados obtenidos en los análisis de varianza realizados para los datos de NMPs transformados logarítmicamente. Al nivel de significación del 99% y considerando sólo los efectos simples estudiados, únicamente la temperatura afecta conjuntamente a la recuperación de Vibrio cholerae de agua y plancton.

TABLA 2.5. Significación, evaluada mediante ANOVA, de los efectos principales estudiados y de sus interacciones sobre los niveles de Vibrio spp y V. cholerae (**, p<0.01; *, p<0.05; ns, no significativo).

	Agua		Plancton	
	<u>Vibrio</u> spp	<u>V. cholerae</u>	<u>Vibrio</u> spp	<u>V. cholerae</u>
Temperatura (T)	**	**	**	**
Gola (G)	**	**	ns	ns
Ambiente (A)	**	**	ns	ns
TxG	ns	ns	ns	ns
TxA	**	**	**	**
GxA	ns	ns	*	*
TxGxA	**	**	ns	ns

Pruebas complementarias

Se identificaron en total 763 cepas pertenecientes a la especie Vibrio cholerae que fueron sometidas a las siguientes pruebas complementarias:

a) Biogrupos de Heiberg. La Figura 2.6 muestra la distribución de los biogrupos de Heiberg encontrados en agua y plancton a lo largo de los diferentes muestreos. La mayoría de las cepas fueron identificadas como pertenecientes a los biogrupos I y II, estando este último más abundantemente representado, tanto en las muestras de agua como en las de plancton. De los restantes, sólo se han detectado representantes del III, IV, V y VI en muy baja proporción. El biogrupo III únicamente se dió en las muestras de plancton y el IV sólo en las de agua. Por otra parte, en los distintos muestreos de mar aparece una mayor heterogeneidad, mientras que en la Albufera prácticamente el 100 % de los aislamientos en cada muestreo perteneció al I, al II o a ambos.

b) Utilización de la quitina como fuente de carbono. La Tabla 2.6 refleja los porcentajes de microorganismos capaces de utilizar la quitina como única fuente de carbono. A simple vista parece deducirse una mayor proporción de microorganismos quitinasa-positivos en las muestras de plancton. Los resultados del ANOVA revelaron que de todos los efectos estudiados, sólo la temperatura (T) y el tipo de muestra (M), así como su interacción (TxM) eran significativos (T, $p < 0.01$; M, $p < 0.05$; TxM, $p < 0.05$).

c) Serología. Los primeros ensayos con antisuero específico comercial (Difco) dieron un 2.5 % de cepas como pertenecientes al serotipo O1, que resultaron ser falsos positivos en confirmaciones posteriores realizadas con antisuero polivalente suministrado por H. Smith (Vibrio Reference Library, Philadelphia). En consecuencia, salvo un 27 % de vibrios que resultaron ser autoaglutinables, el resto se incluye entre los denominados Vibrio cholerae no O1 o NAG.

2.4. DISCUSION

A lo largo del ciclo anual correspondiente al trabajo de campo, se ha aislado Vibrio spp., tanto de agua como de plancton, en todos los puntos de muestreo y en todas las épocas del año, como cabía esperar de un género que comprende numerosas especies propias de aguas con salinidades intermedias. Se aprecia, en general, una tendencia al aumento de estos microorganismos en las épocas cálidas, durante las cuales el 100% de los vibrios recuperados a partir de las muestras de lago, fue frecuentemente identificado como perteneciente a la especie

TABLA 2.6. Porcentaje de cepas degradadoras de quitina distribuidas según el tipo de muestreo.

	Gola de Puchol		Gola de Perelló	
	Lago	Mar	Lago	Mar
Agua	24.5	59.5	49	58
Plancton	47	50.5	75	68.5

Vibrio cholerae.

La salinidad ha sido reconocida por algunos autores como uno de los parámetros físico-químicos que puede influir en la recuperación de Vibrio cholerae de ambientes acuáticos (Kaper y cols., 1979; Singleton y cols., 1982a, 1982b; Hood y Ness, 1982; Seidler y Evans, 1984). De todas las especies del género, Vibrio cholerae es la que tiene los requerimientos más bajos en NaCl para crecer, pudiendo sobrevivir perfectamente a salinidades del 25% , típicas de aguas salobres y estuarinas (Singleton y cols., 1982a; Colwell y cols., 1984). A lo largo del presente trabajo, Vibrio cholerae fue aislado de muestras de agua y plancton que cubrían amplios márgenes de salinidad (0.06-34.78 %.), detectándose en mayor proporción en las muestras de lago, y en aquellas de mar cuya salinidad fue inferior al 15%. En este sentido conviene distinguir los puntos 2 y 4 correspondientes a las salidas de las golas de Puchol y El Perelló respectivamente. El punto 4 se ve marcadamente influenciado por las descargas de agua dulce procedentes de la Albufera, debido a que las compuertas se encuentran abiertas con mayor frecuencia y a que periódicamente se ve sometido a dragado por exigencias del puerto deportivo. Este hecho dió lugar a valores de salinidad más bajos y fluctuantes obteniéndose mayores recuentos de la especie que a la salida de Puchol, donde frecuentemente se forma una barra de arena en la desembocadura que impide la mezcla de aguas. Sin embargo, aunque los recuentos de Vibrio spp. correspondientes a las salinidades más bajas se correlacionaron con los niveles más altos de Vibrio cholerae ($p < 0.001$), esta especie también fue aislada a salinidades tan altas como 32.7% y 34.78%, con

recuentos de 100 y 7 microorganismos en 100 ml respectivamente. Distintos investigadores, en estudios similares realizados en zonas geográficas muy distintas (Bahía de Chesapeake, Golfo de Louisiana, Costa de Oregon; E.E.U.U.), si bien encuentran niveles de la especie más bajos a estas salinidades tan altas, coinciden con nosotros en los valores óptimos para la recuperación de Vibrio cholerae que corresponderían a salinidades de aproximadamente 14 ‰. (Seidler y Evans, 1984).

Resulta interesante comparar los niveles de Vibrio spp y Vibrio cholerae en el lago y en los puntos de mar. Los recuentos de Vibrio cholerae fueron generalmente superiores en el lago y en el punto de mar de salinidad intermedia, lo que podría interpretarse como que la Albufera actúa como reservorio de la especie, la cual es vertida periódicamente al mar a través de las golas. La tolerancia al NaCl que presenta Vibrio cholerae le permitiría sobrevivir en las aguas marinas. Esta tendencia no se ha apreciado tan claramente para el caso de Vibrio spp., especialmente en el caso de las muestras de plancton de mar, ya que muchas especies de vibrios marinos, pueden crecer perfectamente en el medio de enriquecimiento utilizado en el aislamiento de de estos microorganismos.

El parámetro que más ha influido en la recuperación de Vibrio cholerae, tanto de agua como de plancton, ha sido la temperatura, que precisamente es el más universalmente aceptado como determinante de la supervivencia de la especie en ambientes acuáticos (Singleton y cols., 1982b; Seidler y Evans, 1984; Bockemühl y cols., 1986). En épocas de temperatura elevada se registraron los mayores niveles de este

microorganismo en todos los puntos estudiados. El análisis de la varianza confirmó la significación de este parámetro y de su interacción con la salinidad en la recuperación de Vibrio cholerae, tanto de agua como de plancton. Aunque el efecto de temperaturas inferiores a 10°C no pudo ser estudiado durante el año correspondiente al trabajo de campo, aislamientos efectuados posteriormente a estas temperaturas confirman la presencia de Vibrio cholerae en el lago. Por otro lado, y en concordancia con similares estudios (Seidler y Evans, 1984) temperaturas por encima de 25°C, alcanzadas en los meses de verano, no resultaron ser en ningún momento limitantes para el aislamiento de Vibrio cholerae.

Los valores de pH obtenidos se encuentran dentro del rango óptimo para el crecimiento de Vibrio cholerae, por lo que las diferencias de recuentos entre los distintos aislamientos, no pueden atribuirse a este factor.

Las pruebas complementarias, revelaron resultados interesantes. Históricamente, los microorganismos pertenecientes a la especie Vibrio cholerae se clasificaron, según la fermentación de los azúcares sacarosa, manosa y arabinosa, en los denominados grupos de Heiberg que, a su vez, se relacionaron con la procedencia clínica o ambiental de las cepas. Así, en un principio, se asignaron las cepas O1, patógenas clásicas, al biogrupo I de Heiberg y las cepas no O1 ambientales se incluyeron mayoritariamente en el II (Müller, 1978). En la actualidad, la distinción entre cepas de origen clínico O1 y ambiental no O1 carece de consistencia, puesto que, por un lado,

algunas cepas no O1 pueden elaborar la toxina colérica y otras O1 carecer de los genes que codifican su síntesis (Kaper y cols., 1983) y, por otro, cepas O1 pueden proceder de aislamientos ambientales en ausencia de brotes epidémicos conocidos (Colwell y cols., 1984). Así pues, la equivalencia entre cepas pertenecientes al biogrupo II y el carácter ambiental no patógeno, ha perdido vigencia. Es más, la propia validez de los biogrupos de Heiberg como carácter taxonómico podría ser objeto de discusión, debido a la baja reproductibilidad que presentan estas pruebas (Kaper y cols., 1983). En el presente trabajo se ha comprobado que las fermentaciones de manosa y arabinosa dan lugar frecuentemente a resultados dudosos de difícil interpretación, por lo que ha sido necesario repetir las hasta tres veces. Esto dió lugar a que cepas de Vibrio cholerae, que en un principio se incluyeron en los biogrupos I y III, se situaran finalmente en el II, que resultó ser el mayoritario..

En nuestro estudio no se aislaron cepas de Vibrio cholerae O1, siendo todas no O1 o autoaglutinables. Estos resultados coinciden con los datos de trabajos realizados por numerosos autores en ambientes acuáticos (Roberts y cols., 1984; Bockemühl y cols., 1986). Existen referencias de aislamientos de cepas O1 del ambiente (Kaper y cols., 1979; Blake y cols., 1980; West y Lee, 1982) y parece ser que periodos de incubación más cortos en los medios de enriquecimiento podrían favorecer la recuperación de Vibrio cholerae O1 frente a los no O1, ecológicamente más oportunistas (Colwell, comunicación personal). Sin embargo, en aislamientos posteriores, no incluidos en la presente tesis, que se han llevado a cabo siguiendo estas recomendaciones, no

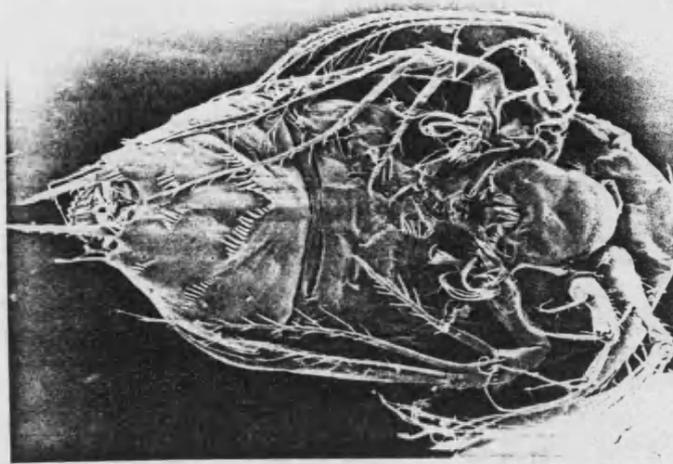
se ha encontrado hasta la fecha la serovariedad O1.

La prueba de la quitina revela la capacidad de utilización de un compuesto carbonado de difícil ataque, que no puede ser utilizado normalmente por microorganismos patógenos restringidos a ambientes muy protegidos y ricos en nutrientes de fácil asimilación, como son las cavidades naturales y órganos internos del cuerpo de los seres superiores. Los vibrios son microorganismos muy ubicuos, que se han adaptado a ecosistemas pobres en nutrientes como son las aguas. En éstas, y dependiendo de la mayor o menor influencia de los aportes terrígenos y vertidos humanos, se puede encontrar una casi total ausencia de fuentes orgánicas de carbono. Los organismos que viven en estos ambientes son pues la fuente de carbono por excelencia para los gérmenes quimioorganotrofos, y gran cantidad de ellos poseen caparazones y cutículas de quitina. Se han realizado estudios sobre la asociación de Vibrio cholerae a copépodos y otros miembros quitinados del zooplancton observándose que favorece la supervivencia de la bacteria en el ambiente. Trabajos realizados en el laboratorio con microcosmos que simulan las condiciones naturales, revelaron el efecto favorable que temperaturas de 30°C, junto con salinidades más altas de 10‰ y pH de 8-8.5, tenían sobre esta asociación (Huq y cols., 1983). Valores similares de estos tres parámetros se han registrado durante casi la mitad del año correspondiente al trabajo de campo, lo cual, junto con el hecho de que la Albufera contiene elevados niveles de fito y zooplancton (Oltra y Miracle, 1984), supone la presencia de vibrios asociados a copépodos especialmente durante la estación templada.

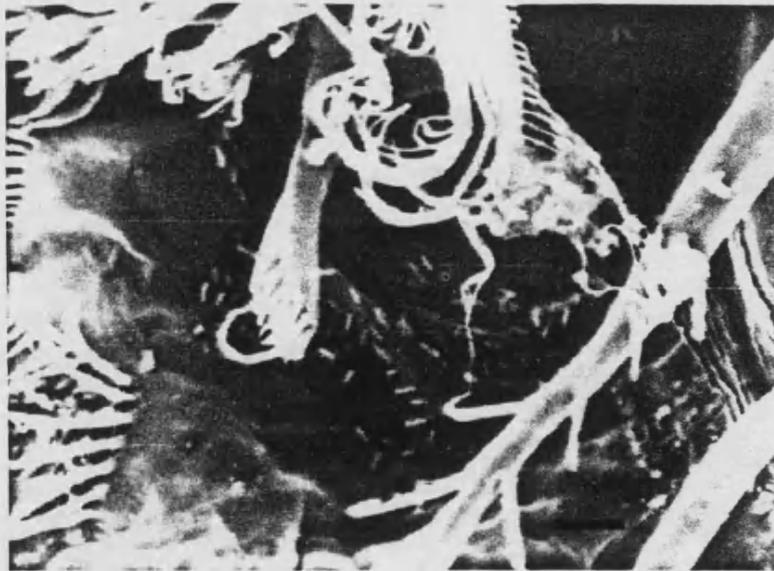
Efectivamente, las observaciones microscópicas efectuadas con copéodos intactos y degradados (ver Figura 2.7) revelaron la presencia de gran cantidad de bacterias adheridas, a partir de las cuales se constató la existencia de la especie Vibrio cholerae. La mayor densidad de bacterias adheridas se registraba alrededor de la región oral y el caparazón y fue observada únicamente sobre copéodos vivos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Huq y cols. (1983, 1984a, 1984b) que proponen la hipótesis de que el copéodo elabora algún tipo de sustancia que atraería, bien química, bien eléctricamente a los vibrios sobre su superficie. El análisis de la varianza ha revelado que existen diferencias significativas en la utilización de la quitina entre las poblaciones de agua y de plancton, lo que se puede deducir directamente del mayor porcentaje de cepas de Vibrio cholerae productoras de quitinasa aisladas de muestras de plancton.

De los resultados obtenidos, se puede concluir que Vibrio cholerae es, efectivamente, un microorganismo autóctono del ambiente objeto de estudio, en el que se halla presente, al menos, como forma libre y como forma asociada al plancton. Los parámetros ambientales significativos fueron los mismos tanto para las muestras de agua como para las de plancton, lo que sugiere que ambas poblaciones siguieron una evolución similar a lo largo del año. Este hallazgo apoyaría la hipótesis de que el zooplancton pudiera actuar como reservorio ambiental de Vibrio cholerae. En este sentido se daría un intercambio constante entre formas libres y adheridas que, a su vez, podrían ser ingeridas y diseminadas en el interior del detritus fecal del

zooplancton. Las circunstancias geográficas y geológicas favorables contribuirían a mantener la presencia de esta especie en el lago y en los puntos de la costa sometidos a su influencia, pudiendo suponer un peligro potencial de infección para el hombre.

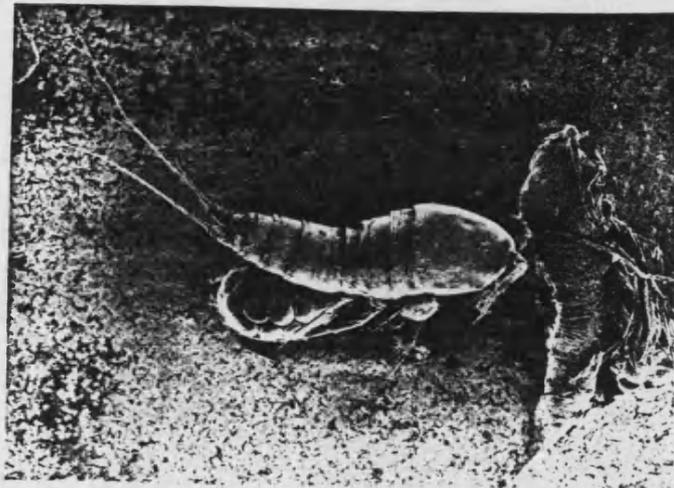


1a

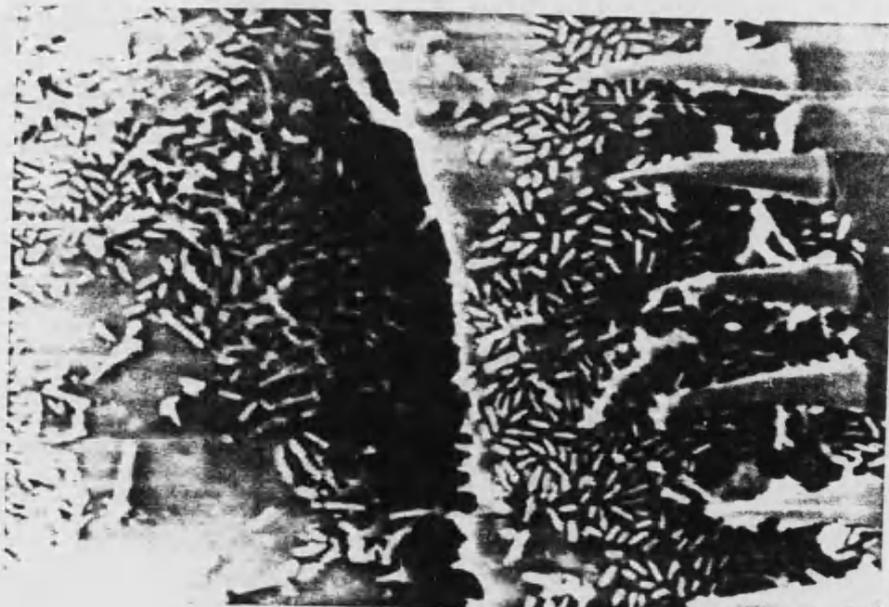


1b

FIGURA 2.7. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido: 1a, forma larvaria de copépedo (x150); 1b, detalle de la región oral, donde se observan bacterias adheridas(x 2250); en la página siguiente: 2a, copépedo adulto (Fam. Harpacticoideae (x85); 2b, detalle de la superficie mostrando gran cantidad de bacterias adheridas.



2a



2b

3. PROPIEDADES RELACIONADAS CON LA ADHESION: ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE E HIDROFOBICIDAD DE SUPERFICIE

3.1. INTRODUCCION

La capacidad de adhesión supone ventajas ecológicas tanto para microorganismos patógenos como para no patógenos. En ambos casos, la asociación del microorganismo, bien a otro ser vivo, bien a distintos tipos de sustratos presentes en su ambiente natural, incrementa su supervivencia, viabilidad y actividad metabólica (Colwell y cols., 1984).

El proceso de adhesión depende de dos factores:

- interacciones físico-químicas inespecíficas de naturaleza hidrofóbica y/o electrolítica entre el sustrato y la superficie bacteriana
- interacciones específicas entre estructuras del microorganismo, en su mayoría proteicas, y sus receptores a nivel de sustrato.

La importancia de las interacciones hidrofóbicas como mecanismos de adhesión bacteriana no específica, sólo ha sido reconocida recientemente (Rosenberg y cols., 1980). En principio se pensó que únicamente jugaban un papel importante en la degradación microbiana de aceites e hidrocarburos (Reisfield y cols., 1972), sin embargo actualmente se sabe que participan en fenómenos tales como la adhesión de bacterias bénticas al sedimento (Fattom y Shilo, 1984), de

bacterias patógenas a sus tejidos diana (Faris y cols., 1981; Faris y cols., 1982; Jiwa y Jones, 1984; Trust y cols., 1983; Kabir y Alf, 1983), de bacterias cariogénicas a superficies de la cavidad oral (Rosenberg y cols., 1983) y también de bacterias acuáticas a la interfase aire-agua (Dahlback y cols., 1981). En este sentido, se postula que constituyen un importante factor en la determinación de la distribución y actividad de los microorganismos en su hábitat natural (Costerton, 1984). Las interacciones hidrofílicas inespecíficas parecen ser que no tienen un papel tan importante, ya que la mayor parte de las especies bacterianas adhesivas se asocian preferentemente con sustratos hidrofóbicos. Además, se ha demostrado en Escherichia coli la pérdida simultánea de capacidad adhesiva e hidrofobicidad de superficie por mutación (Jones, 1984). En consecuencia se cree que sólo cuando la célula está ya adherida en un micronicho adecuado es cuando se rodea a sí misma de una matriz exopolisacárida, fuertemente aniónica, que le confiere propiedades hidrofílicas. Se postula que esta matriz actuaría como una resina de intercambio iónico, atrayendo y concentrando los nutrientes cargados eléctricamente, protegería a la célula de agentes surfactantes, bacteriófagos, anticuerpos, antibióticos etc., y favorecería, al promover la agregación celular, la formación de películas biológicas (Costerton, 1984).

Por otro lado, observaciones morfológicas directas de poblaciones bacterianas en sus ecosistemas naturales, han confirmado la existencia de interacciones específicas entre las bacterias y varios tipos de sustratos presentes en su hábitat (Costerton, 1984). El microorganismo implicado en este tipo de asociaciones posee como

parte integral de su superficie celular, una o más estructuras o componentes que entran a formar parte del fenómeno de adherencia. Así, se ha postulado que las asociaciones se producirían en dos fases (Costerton y Cheng, 1982):

- fase reversible inicial mediada por fuerzas de Van der Waals, donde tomarían parte mecanismos no específicos de atracción entre superficies

- fase irreversible producida por interacciones específicas. Esta implicaría la síntesis de material polimérico extracelular que, según la especie, sería del tipo de pili o fimbriae, antígenos de superficie, mucopolisacáridos y/o ácidos lipoteicoicos.

En la mayor parte de las bacterias, las estructuras que median el proceso de adhesión específica son proteínas de superficie de naturaleza hidrofóbica similares a las lectinas, que se conocen con el nombre genérico de adhesinas (Jones y Isaacson, 1983). Estas proteínas, en los organismos en que han sido caracterizadas, se encuentran básicamente organizadas en dos formas principales:

- empaquetadas en estructuras más o menos rígidas tales como fimbriae o pili, de las que constituye un ejemplo las fimbriae tipo 1 de E. coli (Jones y Isaacson., 1983).

- distribuídas más o menos uniformemente en una capa, sobre la superficie celular como la proteína A de Aeromonas salmonicida (Trust y cols., 1983).

Los receptores de las adhesinas bacterianas son residuos de carbohidratos y/o proteínas localizados en la superficie del sustrato, los cuales pueden formar parte estructural de la célula diana o ser polímeros depositados por el propio microorganismo. En este contexto,

el término "receptor" se usa para denotar sitios de unión específicos, y el concepto "especificidad de receptor" se refiere a la adhesión selectiva de las bacterias sobre tipos concretos de sustratos y a la correlación entre ésta y la colonización de tales sustratos in vitro (Costerton, 1984).

Se sabe que las bacterias adhesivas generalmente aglutinan eritrocitos a través de uniones multivalentes a estructuras de la superficie celular, que se postula han de ser similares a sus receptores naturales en las células diana. Por este motivo, y por la sencillez del método, es la técnica de la hemaglutinación uno de los modelos in vitro más ampliamente utilizados a la hora de estudiar la producción de adhesinas por parte de las cepas bacterianas (Jones y cols, 1976; Faris y cols., 1981; Jones, 1984). Así, se han descrito múltiples tipos de adhesinas o, más propiamente dicho, de hemaglutininas en función del tipo de eritrocito aglutinado y los patrones de inhibición obtenidos. En este sentido conviene puntualizar que los inhibidores utilizados son análogos estructurales de los receptores que se supone específicos de la adhesina. Un dibujo que esquematiza la interacción específica bacteria-eritrocito y su inhibición por azúcares se presenta en la Figura 3.1.

En el caso de cepas de especies patógenas, se ha dado especial importancia al estudio del proceso de adhesión, ya que determinaría:

- 1) la colonización de los tejidos frente a los mecanismos de defensa del huésped,
- 2) el establecimiento del microorganismo y, en consecuencia, la liberación posterior de los factores tóxicos que actúan a nivel de

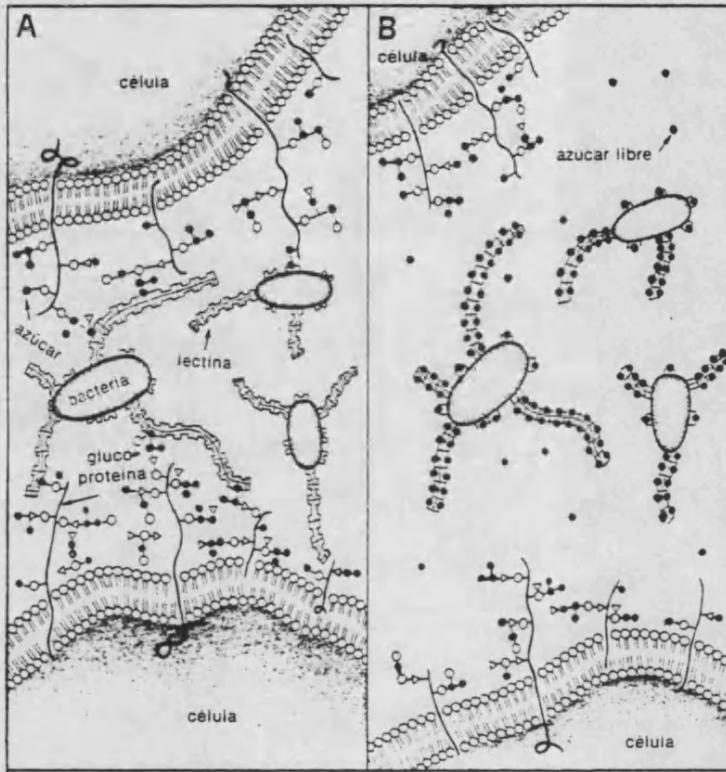


FIGURA 3.1. Esquema del proceso de adhesión que implica el reconocimiento mutuo y específico del agente patógeno y el tejido diana. A, adherencia bacteriana a la superficie del huésped; B, inhibición de la adhesión bacteriana en presencia de moléculas de azúcar libre (Sharon y Ofek, 1983)

receptores eucarióticos,

3) finalmente, el desarrollo de la infección.

Las cepas enterotoxigénicas de Vibrio cholerae secretan una exotoxina que, al unirse al receptor correspondiente (gangliósido GM1) localizado sobre células del epitelio intestinal, activa el sistema de la adenilato-ciclasa desencadenando los síntomas clásicos del cólera. La adherencia a las células epiteliales del intestino delgado representaría, por tanto, el primer paso en la colonización y subsiguiente patogénesis. En consecuencia, tanto la adhesión como la acción de la enterotoxina, dependen de la presencia de receptores de membrana. Se ha propuesto que el receptor/receptores de la/s adhesina/s colérica sería químicamente un glicoconjugado formado por una molécula de oligosacárido unida a un esqueleto lipídico o proteico que lo anclaría sobre la membrana celular (Holmgren y cols., 1983).

Existen evidencias de que en el proceso de asociación del vibrio a la superficie intestinal intervienen interacciones de tipo hidrofóbico (Faris y cols., 1982; Kabir y Alf, 1983), de modo similar a como ocurre con otras especies bacterianas (Faris y cols., 1981). Sin embargo, no está claro si estructuras similares a pili o fimbriae, que median este proceso en especies tales como E. coli (Faris y cols., 1981), actuarían en la adhesión de Vibrio cholerae, o si ésta sería el resultado de una interacción más directa entre la superficie del vibrio y la célula epitelial del intestino del huésped (Nelson y cols., 1976; Faris y cols. 1982).

Se ha demostrado que la producción de hemaglutininas coléricas está directamente relacionada con la adherencia del vibrio in vivo

(Jones y Freter, 1976). Sin embargo, la naturaleza y tipo de estas adhesinas es todavía objeto de controversia. Así, Hanne y Finkelstein (1982) describieron dos tipos de hemaglutininas producidas por cepas de Vibrio cholerae O1:

- solubles o liberadas al medio a lo largo del ciclo celular,
- asociadas a células.

El primer tipo era producido por todas las cepas ensayadas y fue propuesto por dichos autores como la lectina colérica universal. El segundo parecía ser dependiente del biotipo y de la fase de crecimiento, existiendo varias clases en función del patrón de inhibición por azúcares. En contraposición, otros investigadores trabajando con cepas O1 procedentes de aislamientos clínicos recientes, encontraron excepciones a esta regla (Kabir y Alf, 1983).

Finkelstein y Hanne (1982a), y más tarde Booth y cols. (1983), identificaron la hemaglutinina soluble como una proteasa metaloenzimática y propusieron que actuaría como un importante factor de virulencia, al degradar la fibronectina del epitelio intestinal y, como consecuencia, promover la adhesión. Svennerholm y cols. (1984), a partir de estudios realizados sobre niveles de anticuerpos contra la hemaglutinina soluble en el suero, concluyeron que no debía ser éste uno de los factores de virulencia determinantes del desarrollo de la enfermedad.

A diferencia de otros patógenos potenciales, Vibrio cholerae es una bacteria autóctona de ecosistemas acuáticos y como tal se desarrolla en una multiplicidad de nichos ecológicos, incluyendo el intestino de muchos animales. En consecuencia, parece lógico pensar

que la adhesión de Vibrio cholerae es un proceso multifactorial en el que intervienen todos los mecanismos anteriormente descritos, incluyendo como factores adicionales la motilidad y la quimiotaxia, pudiéndose expresar como más importantes unos u otros en función del modelo experimental elegido.

3.2. MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas ambientales seleccionadas para este estudio, así como las procedentes de colecciones de cultivo, aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2. Cada una de las cepas fue inoculada a partir del medio de conservación en tres tubos conteniendo agua de peptona (AP), caldo nutritivo (NB) y caldo triptona-soja, sin glucosa (TSB-G) (pH 7.2), e incubada a 37°C durante 18 h. De cada tubo crecido se sembraron 0.5 ml en matraces con 50 ml del correspondiente medio fresco, que fueron incubados a la misma temperatura, con agitación a 200 rpm para los ensayos de hemaglutinación e hidrofobicidad de superficie, y sin agitación para la realización de observaciones al microscopio electrónico. Se construyeron las curvas de crecimiento de todas las cepas, con el fin de estudiar los posibles cambios en sus propiedades adhesivas en función de la edad del cultivo. Para ello, se tomaron muestras de 0.5 ml a intervalos de 30-60 min y se midió su absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-7. Una vez conocido su ciclo vital, se seleccionaron dos puntos representativos del mismo;

TABLA 3.1. Origen y características de las cepas de Vibrio cholerae ambientales estudiadas.

Cepas	num.	Punto	Muestra	Fecha	Temp., °C	pH	Salinidad(‰)
78	1	2	agua	11- 1-82	13	8.0	-
94	1	1	agua	11- 1-82	15	8.5	-
110-116	6	4	agua	25- 1-82	11	8.1	8.27
127	1	3	agua	25- 1-82	9	8.3	0.47
134-137	2	2	agua	1- 2-82	12	8.3	21.26
147-148	3	4	agua	8- 2-82	14	7.9	28.09
150-152	3	3	agua	8- 2-82	13	8.0	0.6
153-155	2	2	agua	24- 2-82	12	7.9	21.8
160-170	6	1	agua	3- 5-82	21	8.0	0.7
192-194	4	1	agua	1- 6-82	23	9.1	0.06
201	1	2	agua	1- 6-82	22	8.2	11.87
209-219	2	3	agua	7- 7-82	29	7.4	1.37
230-247	8	1	agua	26- 7-82	31	8.7	1.4
252-270	13	2	agua	26- 7-82	29	7.9	21.9
E-D	2	1	agua	6- 9-82	25.5	8.9	0.58
5-9	2	3	agua	23-11-82	14	8.7	0.27
14-18	2	4	agua	23-11-82	15	7.6	30.22
24-39	4	1	agua	27- 9-82	25.5	8.9	0.58
30	1	2	agua	27- 9-82	25	8.3	34.78
47-57	2	4	agua	13- 2-82	14	7.7	27.5
66A-67A	2	1	plancton	11- 1-82	15	8.5	-
70A-71A	2	2	plancton	11- 1-82	13	8.0	-
73A-75A	3	3	plancton	25- 1-82	9	8.3	0.47
76A	1	4	plancton	25- 1-82	11	8.1	8.27
82A-84A	3	4	plancton	8- 2-82	14	7.9	28.09
93A-94A	2	3	plancton	17- 5-82	21	7.4	0.8
96A-98A	2	4	plancton	17- 5-82	19	7.8	-
114A-128A	5	1	plancton	1- 6-82	23	9.1	0.06
140A-149A	4	3	plancton	7- 7-82	28	7.4	12.79
155A-167A	6	4	plancton	23-11-82	15	7.6	30.22

TABLA 3.2. Origen y características de las cepas de Vibrio cholerae de colección.

Cepas	Origen	Serología	Biotipo
11195	ATCC	No 01	-
7270	NCTC	01 Hikojima	cólera
7254	NCTC	01 Inaba	cólera
8021	NCTC	01 Ogawa	cólera
3661	NCTC	01 Inaba	eltor
569B	ATCC	01 Inaba	eltor

uno en el inicio de la fase logarítmica de crecimiento y otro ya en la fase estacionaria.

Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación

Se utilizó sangre humana perteneciente al grupo O que fue recogida por punción en vena e inmediatamente mezclada con citrato sódico al 1% en condiciones estériles. Los eritrocitos de pollo se prepararon a partir de sangre fresca procedente de matadero y se conservaron en las mismas condiciones. Las muestras de ambos tipos de sangre fueron almacenadas a 4°C, durante un periodo no superior a 24 horas, hasta su utilización (Hanne y Finkelstein, 1982). Inmediatamente antes de los ensayos, los eritrocitos se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.0), mediante sucesivas centrifugaciones a 3000 rpm (centrífuga Beckman J2-21M, rotor JA-20), y finalmente se resuspendieron al 3% (v/v) en PBS. Paralelamente, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 8000 rpm, 10 min y las células sedimentadas se resuspendieron en tampón PBS a una concentración final de 10^9 células por mililitro.

Las aglutinaciones se realizaron sobre portaobjetos, a 4 °C y a temperatura ambiente, mezclándose mediante agitación suave 20 µl de suspensión bacteriana con 20 µl de solución de eritrocitos (Atkinson y Trust, 1980). En todas las experiencias se incluyó un control negativo sangre-PBS. Las cepas se consideraron hemaglutinantes si la agregación de eritrocitos se producía de modo visible antes de 10 minutos, estableciéndose los siguientes grados de positividad: ++,

hemaglutinación completa producida antes de 1 min; ++, hemaglutinación completa visible entre 1-5 min; +, hemaglutinación completa visible entre 5-10 min; +/- hemaglutinación incompleta producida antes de 10 min. Los casos dudosos se resolvieron mediante observación con contraste de fases al microscopio óptico (Zeiss 2000). Para los ensayos de inhibición, las suspensiones bacterianas (10^9 microorganismos/ml) se realizaron en PBS conteniendo distintas concentraciones (0.5-1.5%, p/v) de los azúcares inhibidores seleccionados. Los experimentos se realizaron de idéntica manera a la descrita y las hemaglutinaciones se consideraron como sensibles al azúcar probado, cuando se producía inhibición completa. En el caso de darse inhibiciones parciales, se ensayaron concentraciones mayores (1.5-2%). Los azúcares utilizados fueron: D-manitol, D-manosa, L-arabinosa, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-ribosa y L-fucosa. Paralelamente se utilizaron controles negativos en los que se mezclaron idénticos volúmenes de PBS-azúcar y suspensión de eritrocitos. Todos los ensayos de hemaglutinación e inhibición se realizaron por duplicado con muestras de cada cepa recogidas en fase logarítmica temprana y estacionaria de crecimiento, y sólo en los casos en que se detectaron variaciones se siguió la actividad hemaglutinante desarrollada a lo largo del ciclo celular mediante toma de muestras a intervalos de 60 min.

Obtención de membranas libres de células

Se obtuvieron preparaciones de membranas de cepas altamente

hemaglutinantes a partir de 10 ml de cultivo crecido en TSB-G hasta alcanzar una absorbancia a 660 nm de 0.4-0.6. Las células se recogieron por centrifugación a 8000 rpm, 10 min y a 4°C, tras lo cual se lavaron en PBS y finalmente se resuspendieron en 5 ml del mismo tampón. El procedimiento seguido para la obtención de membranas se describe con detalle en el apartado correspondiente del capítulo 4, con la salvedad de que el tampón utilizado en este caso fue PBS. La resuspensión del sedimento de membranas se efectuó en 1 ml del mismo tampón y se utilizó en los ensayos de hemaglutinación e hidrofobicidad de superficie.

Detección de la hemaglutinina/s soluble

Para investigar la presencia de hemaglutininas solubles (o exohemaglutininas) en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos, se eliminaron las células por centrifugación (8000 rpm, 10 min a 4°C) e inmediatamente se utilizó el sobrenadante en ensayos de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación efectuados a 4°C y a temperatura ambiente. Los experimentos se realizaron por triplicado, de modo similar al descrito, mezclándose 20 µl de sobrenadante con 20 µl de suspensión de eritrocitos en PBS, PBS+4.5µM de CaCl₂ y KRT (Jones, y Freter 1976), esta vez sobre un portaobjetos excavado de Koch. Todas las hemaglutinaciones e inhibiciones se efectuaron con las cepas recogidas en fase logarítmica temprana y estacionaria, considerándose positivas si la hemaglutinación se producía de modo visible en menos de 20 min. Se establecieron tres grados de

intensidad: +++, hemaglutinación producida en los primeros 5 min; ++, hemaglutinación producida entre 5-10 min; + hemaglutinación producida en 10-20 min; +/- hemaglutinación débil o dudosa. Los ensayos de inhibición se realizaron preparando los eritrocitos en los tampones anteriormente mencionados, conteniendo además la cantidad correspondiente de cada uno de los citados azúcares de inhibición, y los criterios utilizados fueron esencialmente los mismos que los descritos para la hemaglutinación asociada a células. Una vez caracterizadas las cepas, se escogieron las 20 más productoras, siguiéndose a lo largo del ciclo celular el tiempo de aparición de la hemaglutinina soluble y su máxima actividad, mediante toma de muestras a intervalos de una hora y ensayo de la manera anteriormente descrita.

Test de agregación de sales (SAT)

Se utiliza en la determinación del grado de hidrofobicidad de superficie bacteriana (Faris y cols., 1981). Se preparó una solución madre de sulfato amónico 2 M en PBS, ajustándose el pH con NH_4OH , de la cual se realizaron diluciones decrecientes en PBS desde 0.1 a 1.9 M. Se mezclaron en un portaobjetos 20 μl de suspensión bacteriana en PBS (10^9 células/ml) y las soluciones de sulfato amónico, anotándose la molaridad a la cual se producía la agregación celular en forma de cúmulos blancos más o menos grandes. La lectura se efectuó a los dos minutos, tras una agitación suave, y sobre un fondo oscuro.

Tratamiento por calor

Una vez escogidas las cepas más intensamente hemaglutinantes e hidrofóbicas, las células y sobrenadantes se sometieron a calentamiento a 80°C durante 15 min. Seguidamente se utilizaron en los ensayos correspondientes de hemaglutinación e hidrofobicidad de superficie.

Microscopía electrónica

Se seleccionaron 4 cepas altamente hemaglutinantes que fueron crecidas en condiciones óptimas en TSB-G, sin agitación, y recogidas en fase log. temprana de crecimiento. Se mezclaron, sobre una rejilla de cobre cubierta por una película de Formvar, 10 µl de la suspensión bacteriana con 10 µl de una solución de ácido fosfotúngstico al 1% en agua destilada (pH 7.2), dejándose actuar 45 segundos. Seguidamente se lavó la rejilla con agua destilada y se eliminaron los restos con un papel de filtro. Las rejillas fueron examinadas al microscopio electrónico de transmisión (JEOL 100 S).

Medios de cultivo, reactivos y productos

- Medios utilizados en el crecimiento de las cepas

a) Agua de Peptona (AP)

Peptona	1.0%
NaCl	0.5%
Agua destilada	
pH 7.2	

Esterilización: 121°C, 20 min.

b) Caldo Nutritivo (NB)

Peptona	1.0%
Extracto de carne	0.5%
NaCl	0.5%

pH 7.2

Esterilización: 121°C, 20 min.

c) Caldo Triptona Soja sin glucosa (TSB-G)

Triptona	1.5%
Soyotona	0.5%
NaCl	0.5%

pH 7.2

Esterilización: 121°C, 20 min.

- Soluciones tampón

a) Solución salina tamponada con fosfato (PBS)

NaCl	0.80%
KCl	0.02%
Na ₂ HPO ₄	0.15%
KH ₂ PO ₄	0.20%

pH 7.0

Esterilización: 115°C, 15 min o por filtración.

b) Solución de Krebs-Ringer modificada por Jones y cols.
(1976)

NaCl	0.7500%
KCl	0.0383%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.0318%
CaCl ₂	0.3050%

La mezcla se tampona con Tris-HCl 0.01 M pH 7.4

Esterilización: 115°C, 15 min o por filtración.

- Productos

a) Azúcares utilizados en los ensayos de inhibición

L-fucosa, D-glucosa, D-galactosa, D-arabinosa, D-fructosa
D-ribosa, D-manosa, D-manitol, todos ellos de Sigma Chemical Co. (USA). Las soluciones se prepararon a las con-

centraciones indicadas en el texto y fueron esterilizadas por filtración.

3.3. RESULTADOS

Hemaglutininas asociadas a células.

Se ha estudiado la actividad hemaglutinante de 96 cepas ambientales de Vibrio cholerae no O1 y 6 cepas de colección, tanto O1 como no O1, cuyos orígenes aparecen en las Tablas 3.1 y 3.2. Se seleccionaron dos tipos de eritrocitos, humanos y de pollo, dado que el criterio de clasificación más generalmente aceptado, a raíz de los trabajos de Hanne y Finkelstein (1982), se basa en la utilización de estas dos clases de sangre.

Previamente se analizó en 20 cepas, escogidas al azar, la influencia de la temperatura (4°C y 20°C) y del medio de crecimiento (AP, NB y TSB-G) sobre la actividad hemaglutinante desarrollada. En ninguno de los casos se observaron diferencias en función de la temperatura a la que se efectuaba el ensayo, por lo que el resto de las pruebas se realizó a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Por otro lado, no se detectaron tipos de hemaglutininas (determinados en función del patrón de inhibición por azúcares) y/o intensidades distintas al cultivar las células en NB y en TSB-G, y recogerlas en la misma fase del ciclo celular (Tabla 3.3). Sin embargo sí se dieron intensidades de hemaglutinación más bajas con las mismas células cultivadas en AP y recogidas en fase logarítmica tardía de

TABLA 3.3. Variación de la intensidad de hemaglutinación asociada a células e hidrofobicidad de superficie (SAT) en función del medio de cultivo empleado en el crecimiento de las cepas.

Cepas ^a	Hemaglutinación ^b						SAT ^c		
	Sangre humana			Sangre pollo			AP	NB	TSB-G
	AP	NB	TSB-G	AP	NB	TSB-G			
e	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.3	0.2	0.2
d	++	++	++	++	++	++	0.4	0.4	0.4
24	-	++	++	+	++	++	2	1	1
30	++	++	++	+	+	+	0.3	0.3	0.3
148	++	+++	+++	+	++	++	1.2	1	1
209	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.3	0.3	0.3
247	+++	+++	+++	++	++	++	0.4	0.4	0.4
257	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.4	0.4	0.4
270	-	-	-	+	++	++	1	1	1
11195 ^d	+/-	++	++	+/-	++	++	1	0.4	0.4
67(A)	++	++	++	-	-	-	0.4	0.4	0.4
71(A)	+++	+++	+++	-	-	-	0.6	0.5	0.5
76(A)	-	-	-	-	-	-	1.2	1	1
82(A)	++	++	++	++	++	++	0.4	0.4	0.4
114(A)	++	+++	+++	+++	+++	+++	1	0.1	0.1
121(A)	++	++	++	++	++	++	0.3	0.3	0.3
140(A)	++	++	++	++	++	++	0.3	0.3	0.3
142(A)	-	-	-	-	-	-	1.8	1.2	1
149(A)	-	-	-	-	-	-	1.5	1.2	1.2
167(A)	-	-	-	-	-	-	1.5	1.2	1

- a. Las células fueron ensayadas en fase logarítmica temprana de crecimiento. Los medios de cultivo fueron; AP, agua de peptona; NB, caldo nutritivo; TSB-G; caldo triptona-soja sin glucosa.
- b. Sólo se indican las intensidades de hemaglutinación (+++, completa y producida antes de 1 min; ++, completa y producida entre 1-5 min; +, completa y producida entre 5-10 min) el tipo de hemaglutinina aparece en la Tabla 3.3.
- c. Los resultados se expresan en moles de sulfato amónico necesarios para producir la agregación bacteriana.
- d. Cepa procedente de colección de cultivo.

crecimiento. Por esta razón las hemaglutinaciones se efectuaron con las cepas crecidas en NB o TSB-G indistintamente.

El 75% de las cepas presentó, de forma asociada a células, algún tipo de actividad aglutinante de eritrocitos de pollo y/o humanos, siendo la mayor parte de las mismas altamente hemaglutinantes. El uso de microscopía de contraste de fases ayudó a dilucidar los casos dudosos, tanto de hemaglutinación como de inhibición de la hemaglutinación, y permitió la observación directa de los microorganismos adheridos sobre la superficie del eritrocito (Figura 3.2). Se establecieron cuatro grupos, en función de los distintos tipos de hemaglutininas expresadas por las cepas y de su variación en las dos fases del ciclo celular seleccionadas (Tabla 3.4).

- El grupo I está formado por 31 cepas de Vibrio cholerae no 01 procedentes de agua y plancton, caracterizadas por desarrollar un solo tipo de hemaglutinina, la MSHA (hemaglutinina sensible a manosa) que fue activa, salvo en seis de los casos, tanto frente a eritrocitos humanos como de pollo. En general, una concentración de 0.5% (p/v) de D-manosa, fue suficiente para inhibir por completo la hemaglutinación. Igualmente, concentraciones entre 0.5 y 1 % de D-fructosa y D-glucosa fueron también inhibitorias, y además, ocasionalmente el D-manitol y la D-ribosa actuaron como parcialmente inhibitorias a todas las concentraciones ensayadas (0.5-2%). Este patrón de inhibición fue común para todas las cepas que, aunque pertenecientes a grupos diferentes, produjeron MSHA.

- El grupo II está formado por 24 cepas no 01, tanto

TABLA 3.4. Hemaglutininas asociadas a células y su variación en función de la edad del cultivo.

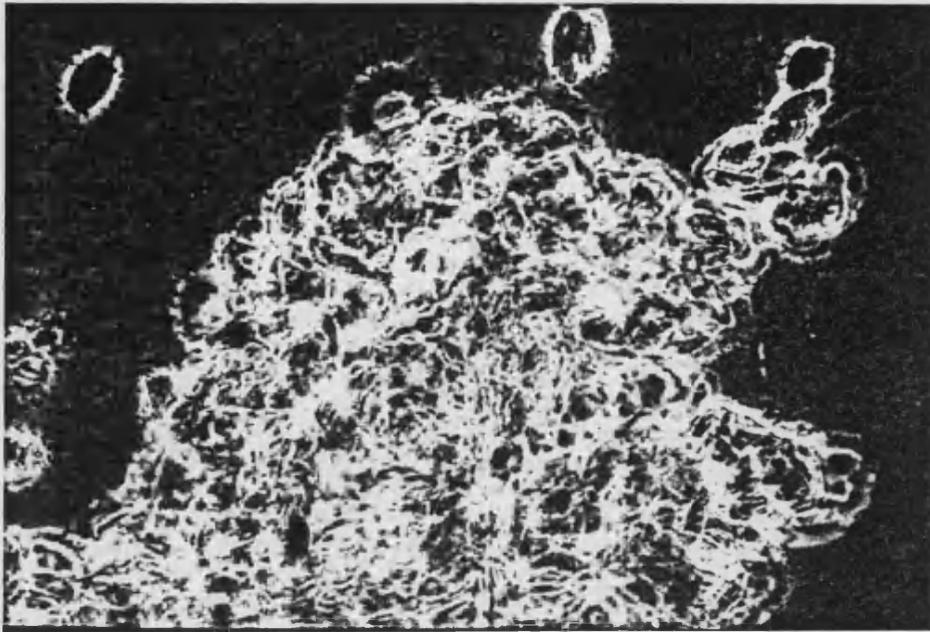
Cepas	Sangre humana		Sangre pollo	
	temp	tard ^a	temp	tard
	int tipo ^b	int tipo	int tipo	int tipo
Grupo I:				
e, 113, 134, 209, 211, 241, 244, 252, 257	+++ MSHA	+++ MSHA	+++ MSHA	+++ MSHA
47, 152, 153, 155, 255 ^c , 141(A)	+++ MSHA	++ MSHA	+++ MSHA	++ MSHA
d, 9, 111, 194	++ MSHA	+ MSHA	++ MSHA	+ MSHA
192, 192 ₂ , 128(A)	+++ MSHA	+ MSHA	+++ MSHA	+ MSHA
242, 93(A), 264 ^c	+++ MSHA	+++ MSHA	+++ MSHA	-
35, 193 ^c , 256	-	-	+++ MSHA	++ MSHA
78, 98(A)	-	-	+ MSHA	+ MSHA
265 ^c	-	-	+++ MSHA	+ MSHA
Grupo II:				
113 ₂ , 11195 ^d	++ RHA	-	++ RHA	-
30	++ RHA	+ RHA	+ RHA	-
37, 127, 170, 67(A), 159(A)	++ RHA	+ RHA	-	-
76(A)	-	++ RHA	-	-
240, 267, 268, 269, 114(A)	+++ RHA	++ RHA	+++ MSHA	+++ MSHA
5, 75(A)	+ RHA	+ RHA	+ MSHA	-
270	-	++ RHA	++ MSHA	++ MSHA
151, 96(A)	++ RHA	+ MSHA	++ RHA	+ MSHA
112, 230, 231, 82(A), 140(A)	++ RHA	++ MSHA	++ MSHA	+ MSHA
Grupo III:				
94, 116, 233	++ FSHA	+ FSHA	-	-
120(A), 121(A)	++ FSHA	+ RHA	++ RHA	-
24, 110, 162, 247, 569B ^d	++ FSHA	+ MSHA	++ MSHA	++ MSHA
18, 33, 57, 148, 3661 ^d	+++ FSHA	-	++ MSHA	-
66(A), 70(A), 71(A), 73(A), 115(A)	+++ FMSHA	++ FMSHA	-	-
8021 ^d	++ FSHA	-	-	-
Grupo IV:				
83(A), 84(A)	+++ GSHA	+++ GSHA	++ MSHA	+ MSHA

a. temp, fase logarítmica temprana de crecimiento; tard, fase estacionaria.

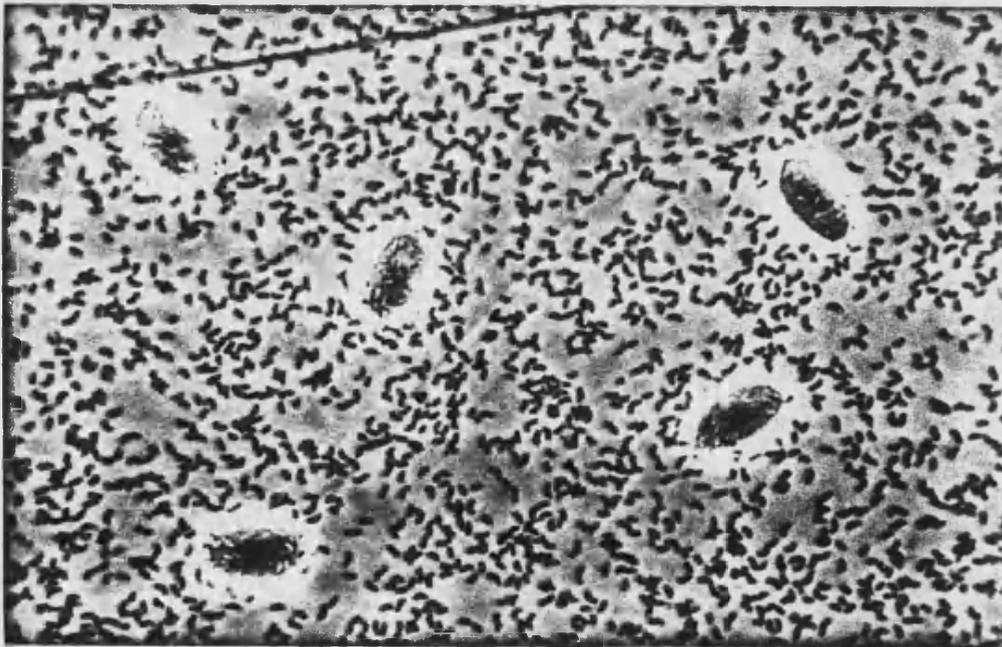
b. int, intensidad de hemaglutinación; +++, producida antes de 1 min; ++, producida entre 1-5 min; +, producida entre 5 y 10 min. Sólo se han considerado las hemaglutinaciones completas. Tipo de hemaglutinina; MSHA, sensible a D-manosa; FSHA, sensible a L-fucosa; FMSHA, sensible a ambos azúcares; GSHA, sensible a galactosa; RHA, resistente a todos los azúcares y concentraciones ensayadas.

c. cepas productoras de hemaglutinina transitoria RHA, que sólo pudo detectarse en fase log. tardía de crecimiento (dato que no aparece en la tabla).

d. cepas pertenecientes a colecciones de cultivo.



A



B

FIGURA 3.2. Microfotografías al microscopio de contraste de fases mostrando: A, hemaglutinación positiva de eritrocitos de pollo (x 800); B, glóbulos rojos con gran cantidad de bacterias adheridas (x 2000).



FIGURA 3.3. Microfotografía al microscopio electrónico de transmisión (x 15000) en la que puede apreciarse la ausencia de pili sobre la superficie celular de una cepa ambiental de de Vibrio cholerae no O1 altamente hemaglutinante.

ambientales, de agua y plancton, como de colección (11195 ATCC). Este grupo se caracterizó por producir una hemaglutinina activa frente a eritrocitos humanos, resistente (RHA) a todos los azúcares y concentraciones ensayadas (0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 y 2%), no detectándose ningún caso de inhibición parcial. Cinco de las cepas dieron, además, este mismo tipo de hemaglutinación frente a eritrocitos de pollo y 15 produjeron una hemaglutinación diferente (MSHA) frente a este tipo de sangre.

- En el grupo III fueron incluídas 21 cepas que produjeron hemaglutinación de eritrocitos humanos sensible a L-fucosa (FSHA). Este grupo está formado por cepas ambientales, aisladas de agua y plancton, y tres cepas O1 de colección, de biotipos cólera y eltor. Doce cepas expresaron, además de FSHA, una hemaglutinina diferente, activa sobre eritrocitos de pollo, que en la mayor parte de los casos fue del tipo MSHA. Hay que destacar que cinco cepas de plancton produjeron un tipo especial de hemaglutinación que fue sensible a la vez, y a idénticas concentraciones (0.5%), a la L-fucosa y D-manosa, actividad que, aunque decreció en intensidad, se mantuvo a lo largo del ciclo celular.

- El grupo IV está formado por dos cepas de plancton que produjeron un tipo de hemaglutinación de eritrocitos humanos hasta ahora no descrito en Vibrio cholerae. Esta hemaglutinación fue intensa e inhibida única y exclusivamente por la D-galactosa (GSHA), a cualquier concentración ensayada. Al mismo tiempo, las cepas expresaron una hemaglutinina sensible a D-manosa, detectada al utilizar eritrocitos de pollo en el ensayo, que a su vez fue inhibida por D-fructosa y D-glucosa.

El estudio efectuado con muestras tomadas en fase logarítmica temprana y estacionaria del ciclo celular (Tabla 3.4), permitió observar que la expresión de las hemaglutininas era dependiente de la edad del cultivo. Por un lado se produjeron variaciones de tipo cuantitativo, de modo que en el 90 % de las cepas hemaglutinantes de uno o ambos tipos de sangre se detectó una disminución en la intensidad de hemaglutinación en la fase estacionaria, llegando incluso en trece casos a desaparecer por completo. Por otro lado, se observó que existía una variación de tipo cualitativo, ya que catorce cepas produjeron una hemaglutinina diferente en la fase estacionaria (18-24 h de incubación). El estudio de muestras de estas cepas, tomadas a intervalos de una hora a lo largo del ciclo celular, demostró que durante toda la fase exponencial se detectaba un único tipo de hemaglutinina y que el segundo tipo dominaba ya bien avanzada la fase estacionaria (8-18 h). Hay que destacar aquí que cuatro cepas incluidas en el primer grupo expresaron en fase logarítmica tardía de crecimiento (punto de inflexión de la curva) un tipo de hemaglutinación transitoria resistente a todos los azúcares y concentraciones ensayadas, volviendo a detectarse en la fase estacionaria la hemaglutinación sensible a manosa.

Dada la variabilidad encontrada, se consideró de interés averiguar si la actividad hemaglutinante asociada a células se mantenía, variaba, o se perdía a lo largo del tiempo de almacenamiento de las cepas. Para ello, se seleccionó un representante de cada grupo que fue rutinariamente ensayado tras los sucesivos pases a través de

medio de conservación. En ninguno de los casos se observaron variaciones de tipo cualitativo, y solamente una de las cepas expresó una menor intensidad de hemaglutinación frente a ambos tipos de sangre.

Con el fin de comprobar si la actividad hemaglutinante asociada a células residía en estructuras lábiles, tipo pili o fimbriae, se recurrió a la observación directa de las cepas por microscopía electrónica de transmisión así como a experimentos de hemaglutinación con membranas aisladas. Se seleccionó un representante de cada uno de los grupos, de entre las cepas más intensamente hemaglutinantes. Las cepas escogidas fueron : nº 244 (grupo I), nº 269 (grupo II), nº 94 (grupo III) y 83(A) (grupo IV). En ninguno de los casos se observaron estructuras similares a pili sobre la superficie celular (Figura 3.3). Además, las membranas obtenidas tras tratamientos mecánicos, que destruyen este tipo de orgánulos (sonicación), retuvieron en todos los casos la actividad hemaglutinante, como así lo confirmó la observación directa de los portaobjetos por microscopía de contraste de fases. Paralelamente se comprobó si la actividad hemaglutinante era retenida o se perdía tras calentamiento de las células a 80°C, 15 min. En los cuatro casos ensayados las células calentadas fueron incapaces de aglutinar los eritrocitos.

Hidrofobicidad de superficie (SAT).

Previamente a los ensayos generales, se estudió la variación de la hidrofobicidad de superficie en función del medio de cultivo utilizado en el crecimiento de las cepas. Para ello se emplearon las 20 cepas mencionadas en el apartado anterior, realizándose las experiencias de hidrofobicidad de modo paralelo a las de hemaglutinación. Como puede verse en la Tabla 3.3, el 50 % de las cepas, recogidas en fase logarítmica temprana de crecimiento, agregó a idénticas concentraciones de sulfato amónico, independientemente del medio de cultivo utilizado. En el resto de los casos, las células crecidas en NB presentaron una hidrofobicidad de superficie similar a la detectada cuando se empleó TSB-G, y mayor que la expresada cuando el medio utilizado era AP. Además, las diferencias se acusaron en fase estacionaria, de modo que las células crecidas en los dos primeros medios mantuvieron una cierta hidrofobicidad de superficie (0.2-1.2M) mientras que en el último caso no agregaron a ninguna de las concentraciones de sulfato amónico ensayadas (≥ 2 M).

En las Tablas 3.5 y 3.6, se ha agrupado a las cepas en función del tipo e intensidad de hemaglutinación producida, indicándose en la columna de la derecha los valores correspondientes de SAT. No se ha podido relacionar siempre la intensidad de HA con la hidrofobicidad de superficie, ya que entre las bacterias altamente hemaglutinantes (+++) hay cepas que requieren bajas concentraciones de sulfato amónico para agregar (0.1-0.2 M), y cepas que lo hacen a concentraciones mucho mayores (1 M), similares a las que requieren microorganismos en los

TABLA 3.5. Relación entre la hemaglutinación específica de eritrocitos humanos y la hidrofobicidad de superficie (SAT).

num. cepas	Sangre humana ^a		SAT ^b	
	temp	tard	temp	tard
12	MSHA+++	MSHA+++	0.2-0.4	0.2-1
6	MSHA+++	MSHA++	0.2-0.3	0.2-0.6
3	MSHA+++	MSHA+	0.4	1
4	MSHA++	MSHA+	0.6-1	1
5	RHA+++	RHA++	0.1	0.3
6	RHA++	RHA+	0.3	0.7
2	RHA++	-	0.4	1
2	RHA+	RHA+	0.8-1	1
2	-	RHA++	1	0.6-0.8
2	RHA++	MSHA++	0.2-0.3	0.4-0.8
5	RHA++	MSHA+	0.1-0.4	1
5	FSHA+++	-	1	1.2
1	FSHA++	-	0.3	1.6
3	FSHA++	FSHA+	0.4	1
5	FSHA++	MSHA+	0.3-1	1-1.2
2	FSHA++	RHA+	0.6	0.8
5	FMSHA+++	FMSHA++	0.2-0.8	0.2-1
2	GSHA+++	GSHA+++	0.2-0.6	0.2-0.8

a. Grupos de cepas establecidos, considerando únicamente su actividad hemaglutinante frente a eritrocitos humanos.

b. Los valores corresponden a la concentración de sulfato amónico (en moles) necesaria para que se produzca la agregación del grupo de cepas bacterianas considerado.

TABLA 3.6. Relación entre la hemaglutinación específica de eritrocitos de pollo y la hidrofobicidad de superficie (SAT).

num. cepas	Sangre pollo ^a		SAT ^b	
	temp	tard	temp	tard
14	MSHA+++	MSHA+++	0.1-0.4	0.2-1
9	MSHA+++	MSHA++	0.2-1	0.2-1
4	MSHA+++	MSHA+	0.4-1	1.2
3	MSHA+++	-	0.2-1	0.2-1
6	MSHA++	MSHA++	0.3-1	0.6-1.2
11	MSHA++	MSHA+	0.2-1	0.2-1
5	MSHA++	-	1	1.2
2	MSHA+	MSHA+	1	1.2
2	MSHA+	-	0.8-1	1
4	RHA++	-	0.4	1
1	RHA+	-	0.3	0.7
2	RHA++	MSHA+	0.2-0.3	0.8

a. Grupos de cepas establecidos, considerando únicamente su actividad hemaglutinante frente a eritrocitos de pollo.

b. Los valores corresponden a la concentración de sulfato amónico (en moles) necesaria para que se produzca la agregación del grupo de cepas bacterianas considerado.

que no se detectó ninguna hemaglutinina asociada a células. Sin embargo, sí que se dieron los valores más bajos de hidrofobicidad entre las cepas no hemaglutinantes. Por otro lado, al agrupar los casos en función del tipo de hemaglutinina producido y los resultados del SAT, sí se pudo establecer una relación directa entre la intensidad de la RHA y la hidrofobicidad de superficie. En el resto de los casos a igualdad de actividad FSHA, MSHA y GSHA, se dió una gran variabilidad en la concentración de sulfato amónico requerida para la agregación celular. Estos resultados fueron, sin excepción, generales en todas las cepas del grupo II y en las cepas productoras de RHA de los otros grupos. También hay que destacar que la mayor parte de las agregaciones celulares, en presencia de sulfato amónico, de las cepas de los grupos I, III y IV y algunas de las del III, fueron incompletas, reflejando de este modo que dentro del mismo cultivo puro se pueden encontrar poblaciones de microorganismos hidrofóbicas y no hidrofóbicas.

Al estudiar los cambios producidos en hidrofobicidad de superficie a lo largo del ciclo celular, se observó que ésta disminuía en la fase estacionaria, salvo en el caso de las cepas 76(A) y 270 que, además, produjeron en esta fase una hemaglutinina resistente a todos los azúcares ensayados. Asimismo, se comprobó que las membranas de las bacterias seleccionadas en el apartado anterior como fuertemente hemaglutinantes retenían su hidrofobicidad de superficie, siendo ésta perdida tras calentamiento a 80°C, 15 min.

Hemaglutinina/s soluble.

Se realizó un estudio preliminar en las 20 cepas mencionadas anteriormente encaminado a detectar la actividad hemaglutinante en los sobrenadantes de tres medios de crecimiento (AP, NB, TSB-G), utilizándose tres tipos de tampones (PBS, PBS + 5 μM CaCl_2 , KRT). Dado que sólo se detectó este tipo de actividad en el caso de utilizar NB o TSB-G como medio de cultivo, y PBS + 5 μM CaCl_2 o KRT como tampón, se seleccionó TSB-G para el crecimiento y se empleó KRT o PBS + Ca^{++} en el resto de los ensayos. Aproximadamente el 62% de las cepas produjeron hemaglutinina soluble, aunque con distinta intensidad y actividad (Tabla 3.7). De ellas, el 95% expresó una HA resistente a todos los azúcares y concentraciones ensayados y activa sólo frente a eritrocitos de pollo. Tres cepas produjeron una HA soluble sensible a D-manosa, D-fructosa, D-glucosa al 0.5% y parcialmente sensible a D-manitol y D-galactosa a concentraciones superiores al 1%. Cinco cepas expresaron una exohemaglutinina resistente, activa con la misma intensidad frente a eritrocitos humanos y de pollo.

Hay que resaltar que todas las cepas de colección, 01 y no 01, produjeron HA soluble resistente y activa frente a eritrocitos de pollo, mientras que sólo el 59% de las cepas ambientales, tanto de agua como de plancton, expresaron hemaglutinina no asociada a células. El uso del microscopio de contraste de fases confirmó los casos dudosos y permitió comprobar la aglutinación en ausencia de células (Figura 3.4).

De las muestras tomadas en los dos puntos del ciclo celular seleccionados, sólo se pudo detectar actividad hemaglutinante en

los sobrenadante de los cultivos recogidos en fase estacionaria. Se consideró interesante averiguar cual era el tiempo de aparición de la hemaglutinina soluble y el punto en que la actividad detectada alcanzaba el máximo. Para ello se eligieron 20 cepas de entre las más altamente productoras y se incubaron en TSB-G, tomándose muestras a intervalos de una hora, a lo largo del ciclo celular. Como puede verse en la Figura 3.5, aunque el tiempo de aparición de actividad hemaglutinante macroscópica osciló entre 2 y 8 horas, según la cepa, existe una relación directa entre la velocidad de crecimiento y la detección de hemaglutinina soluble en el medio. Así, la aparición de actividad aglutinante en los sobrenadantes de cultivo era detectada en el inicio de la fase estacionaria, alcanzándose el máximo entre 8 y 18 horas de incubación. La observación paralela de las muestras al microscopio de contraste de fases, permitió ver, ya en fase exponencial de crecimiento, cierta aglutinación de eritrocitos, aunque ésta sólo fue visible microscópicamente.

3.4. DISCUSION

El estudio de la adhesión de los microorganismos pertenecientes a la especie Vibrio cholerae ha sido tradicionalmente enfocado en base a la relación que existe entre estos mecanismos y la patogeneidad desarrollada por el microorganismo. En este sentido, se ha considerado a este tipo de interacciones como un factor más de virulencia, ya que permitirían la colonización del intestino y, en consecuencia, el posterior desarrollo de la enfermedad (Jones y cols.,

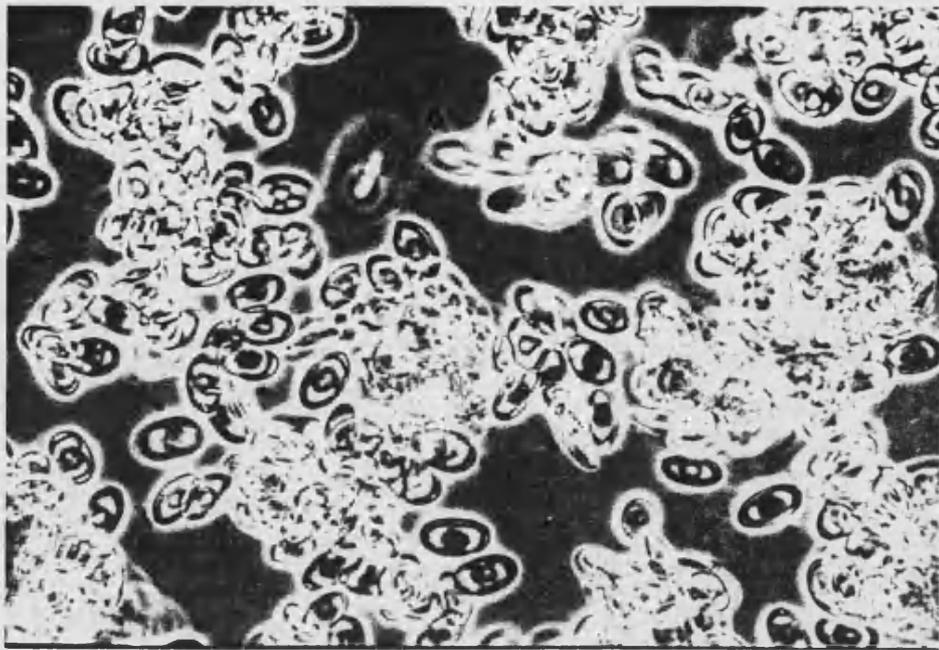
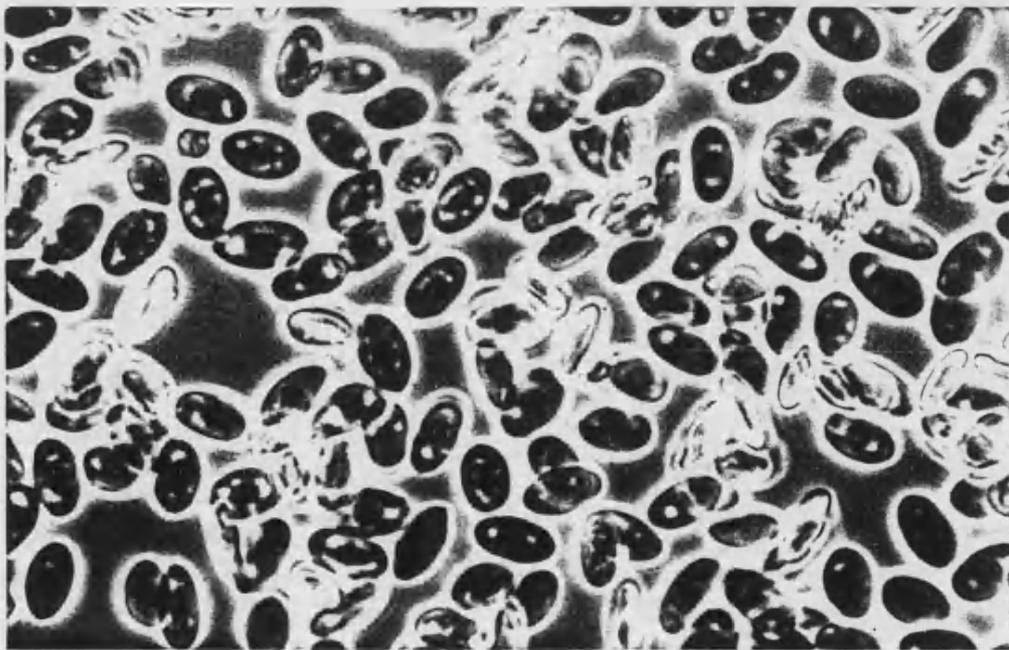
**A****B**

FIGURA 3.4. Microfotografías al microscopio de contraste de fases (x 800). A, hemaglutinación de eritrocitos de pollo en ausencia de células: B, control negativo.

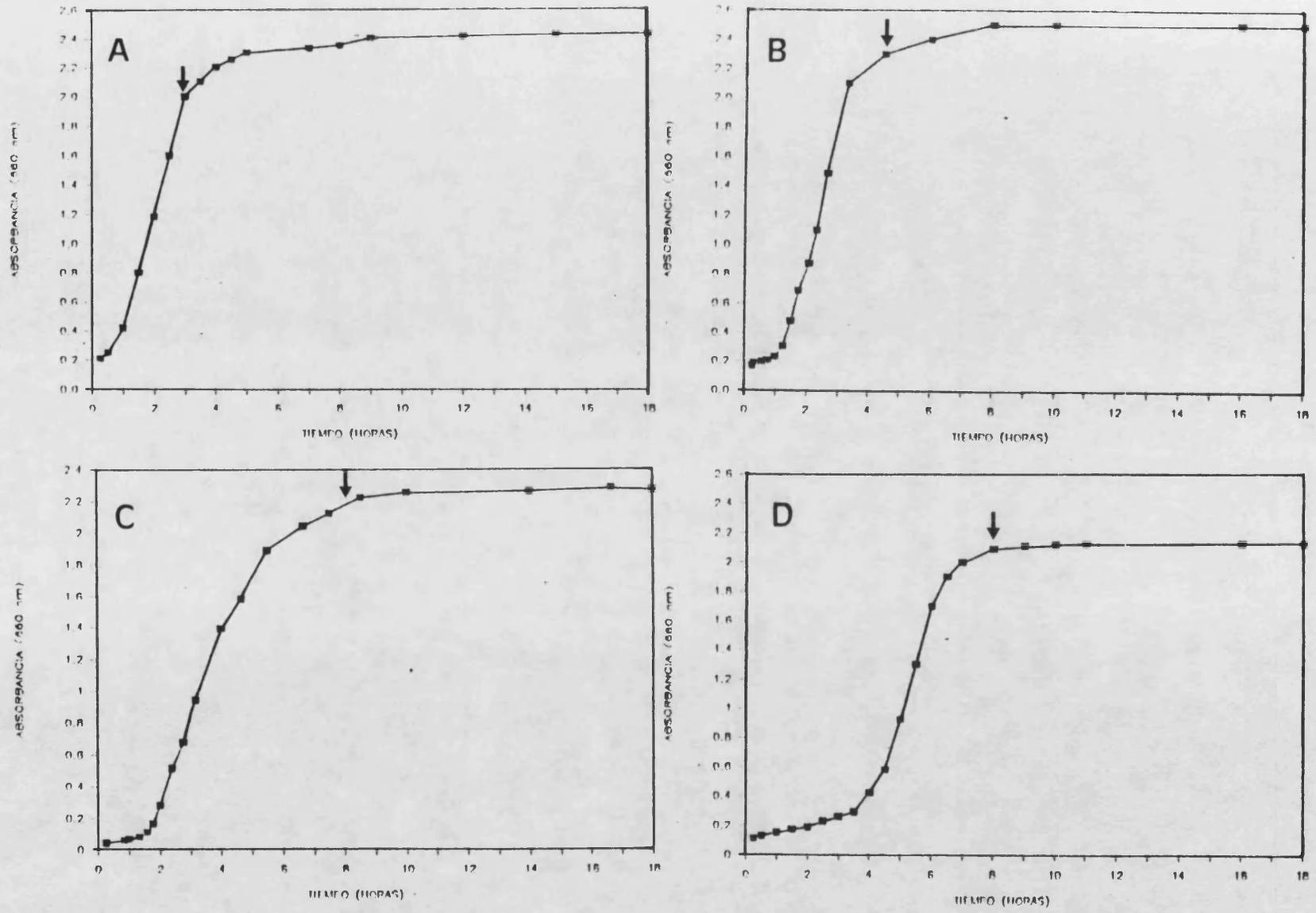


FIGURA 3.5. Curvas de crecimiento de cuatro cepas ambientales de *Vibrio cholerae* no O1, crecidas en NB. El tiempo de aparición de actividad hemaglutinante en los sobrenadantes de cultivo se indica con una flecha. A, cepa 94; B, cepa 82A; C, cepa 137; D, cepa 153.

TABLA 3.7. Intensidad y tipo de hemaglutinina soluble detectada en los sobrenadante de cultivo.

Cepas ^a	Hemaglutinina soluble ^b			
	Sangre humana		Sangre pollo	
	int	tipo	int	tipo
18,78,94,137,192,161,166,244,257,265,267,269, 7270,7254,8021,11195,569B	-	-	+++	RHA
24,47,114,116,153,155,252,270, 167,148,128(A),141(A),	-	-	++	RHA
e,57,114,116,147,148,151,152,161,166,167,241, 242,252,263,264,74(A),75(A),76(A),83(A),84(A), 93(A),96(A),120(A),121(A),3661	-	-	+	RHA
33,73(A),82(A),120(A),121(A)	+	RHA	+	RHA
113,113 ₂ ,256	-	-	++	SHA

a. Las cepas fueron incubadas en TSB sin glucosa en agitación (200 rpm) a 37°C.

b. Intensidad de hemaglutinación (HA) : +++, HA completa producida antes de 5 min; ++, HA completa producida entre 5-10 min; +, HA producida entre 10-20 min. Tipo ; RHA; resistente a todos los azúcares y concentraciones ensayadas SHA; sensible a D-manosa, D-fructosa y D-glucosa.

1976; Levett y Daniel, 1981; Finkelstein y Hanne, 1982b). Sin embargo, Vibrio cholerae es, además, una bacteria extraordinariamente frecuente en ecosistemas acuáticos, siendo actualmente considerada como un microorganismo autóctono de aguas. Aunque sólomente una pequeña proporción de estos vibrios ambientales está ocasionalmente implicada en enfermedades humanas, el hecho es que estas cepas pueden desarrollarse y colonizar gran multiplicidad de nichos, tanto corpóreos como extracorpóreos (Colwell y cols., 1984). Parece ilógico que una especie bacteriana que puede encontrarse en tal variedad de ambientes tenga que emplear mecanismos significativamente diferentes o estrategias de supervivencia dispares en función del hábitat donde se desarrolle. Así pues, puede considerarse lícito suponer que el modo de crecimiento de Vibrio cholerae en el ecosistema acuático debe ser, al menos, similar al que desarrolla la bacteria cuando crece en el intestino del huésped animal (Costerton, 1984).

Investigaciones previas realizadas con cepas de Vibrio cholerae 01, han demostrado que las hemaglutininas pueden servir como mediadoras de la adhesión a los receptores específicos de la célula diana (Jones y cols., 1976; Bhattacharjee y Srivastava, 1978), enfocándose los estudios posteriores hacia la caracterización de las mismas (Hanne y Finkelstein, 1982; Finkelstein y Hanne, 1982; Faris y cols., 1982; Holmgren y cols., 1983; Kabir y Alí, 1983; Finn y cols., 1987).

A lo largo del presente trabajo se ha constatado que las cepas

de Vibrio cholerae estudiadas, tanto las procedentes de aislamientos ambientales como las de colecciones de cultivo, son altamente hemaglutinantes, y que esta propiedad es independiente de la temperatura a la que se efectúa el ensayo y dependiente, aunque sólo cuantitativamente, del medio de cultivo utilizado en el crecimiento de las bacterias. Faris y cols.(1982), describieron una relación similar entre la intensidad de hemaglutinación y el medio de crecimiento empleado, si bien encontraron que la actividad hemaglutinante de alguna de sus cepas era dependiente de la temperatura. En nuestro estudio no se ha dado ningún caso similar.

Las diferencias obtenidas en los patrones de inhibición por azúcares y la repetitividad de los ensayos, parecen indicar que Vibrio cholerae puede expresar una gran variedad de factores de adhesión. Este fenómeno no es exclusivo de Vibrio cholerae, puesto que muchas especies bacterianas (Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Aeromonas sp. etc.) producen más de una adhesina, dependiendo en general del tipo de modelo in vitro seleccionado, de la célula animal utilizada como sustrato, del uso de inhibidores específicos etc. (Jones, 1984). Sin embargo, es de destacar que en nuestro caso, las diferentes hemaglutininas producidas por las cepas ensayadas han sido detectadas utilizando el mismo modelo in vitro, y que ha sido el estudio efectuado en diferentes momentos del ciclo celular el que nos ha permitido diferenciar más de una adhesina producida por una misma cepa.

Existe una gran controversia en cuanto al tipo de hemaglutininas producidas por Vibrio cholerae, habiendo sido

caracterizadas hasta la fecha 3 diferentes actividades asociadas a células. Así, Jones y cols. (1976) describieron la producción de una hemaglutinina asociada a células en una cepa clásica de Vibrio cholerae inhibida por L-fucosa y activa frente a eritrocitos humanos, proponiéndola como la "lectina colérica". Más adelante, Bhattacharjee y Srivastava (1978) estudiaron la producción de una hemaglutinina sensible a D-manosa por cepas eltor de Vibrio cholerae, relacionándola con la asociación del vibrio al epitelio. En 1982, Hanne y Finkelstein, a partir de un trabajo realizado con 4 cepas clásicas y 6 eltor, propusieron que la producción de hemaglutininas asociadas a células era dependiente del biotipo. Según su hipótesis, las cepas eltor producirían MSHA activa frente a eritrocitos humanos y de pollo, mientras que algunas cepas clásicas expresarían HA de eritrocitos humanos sensible a L-fucosa y sólo detectable en fase logarítmica temprana de crecimiento. Sin embargo, se encuentran excepciones a esta regla en trabajos posteriores realizados por otros autores, de los que mencionaremos los más relevantes. Holmgren y cols. (1983) incluyeron en sus trabajos la cepa de colección 569B, de biotipo clásico, que había sido estudiada previamente por Hanne y Finkelstein, y concluyeron que era capaz de producir tanto FSHA como MSHA. Kabir y Alí (1983) caracterizaron 50 aislamientos clínicos de ambos biotipos y sólo detectaron una actividad hemaglutinante asociada a células que era inhibida por D-manosa. Por otro lado, Faris y cols. (1982), a partir de 11 cepas clásicas y 9 eltor describieron una hemaglutinina resistente, activa frente a eritrocitos humanos, y otra sensible a manosa, activa frente a eritrocitos de pollo. Esta hemaglutinación resistente había sido detectada por Hanne y Finkelstein (1982) en

ciertos mutantes deficientes en la síntesis de MSHA, en fase estacionaria de crecimiento. Hay que tener en cuenta, finalmente, la escasez de trabajos realizados con cepas no O1 de origen ambiental (Faris y cols., 1982; Barja y cols., 1987), en los cuales, o bien no se ha descrito ninguna actividad hemaglutinante, o bien ésta ha sido del tipo RHA.

En el presente estudio se han encontrado al menos cuatro tipos diferentes de actividades hemaglutinantes asociadas a células, no existiendo en las cepas O1 ninguna relación aparente entre la producción de un tipo específico de hemaglutinina y el biotipo. El hecho de que todas las hemaglutininas puedan ser inactivadas por el calor (80°C, 15 min), parece demostrar que probablemente sean de naturaleza proteica y, por tanto, similares a las ya descritas para ésta y otras especies.

La MSHA, hemaglutinina más frecuente, presenta un patrón de inhibición por más de un azúcar que ya había sido descrito por Hanne y Finkelstein (1982) en cepas de colección O1 de biotipo eltor, y que parece ser debido a la similitud estructural existente entre los azúcares inhibidores.

La FSHA ha sido expresada junto con MSHA por la mayor parte de las cepas, bien en diferentes estadios del ciclo celular, bien frente a distintos tipos de eritrocitos. Existe una relación interesante entre la producción de MSHA y FSHA, que ya había sido apuntada por Hanne y Finkelstein en 1982. Según estos autores, Vibrio cholerae,

biotipo eltor, puede producir ambos tipos de actividades, dominando la MSHA de modo que sólo en mutantes deficientes se detectaría la actividad FSHA. En nuestro estudio, el uso de gran número de cepas ambientales no O1, nos permite encontrar casos claramente demostrativos de la hipótesis de que una misma cepa puede producir al mismo tiempo más de una hemaglutinina. Así, cinco cepas no O1 dieron una hemaglutinación intensa que era inhibida al mismo tiempo por idénticas concentraciones de D-manosa y L-fucosa y por ambos azúcares a la vez (FMSHA). Este mismo patrón de inhibición fue descrito por Jones y Freter (1976) para una cepa clásica de colección. Para dichos autores, la explicación estribaba en que la D-manosa forma parte del receptor estructural para la L-fucosa. Sin embargo, Atkinson y Trust (1980), trabajando con Aeromonas hydrophila llegaron a la conclusión de que la similaridad estructural entre estos azúcares sería la responsable de los casos de inhibición simultánea. El hecho de que en nuestro estudio se hayan encontrado estas dos actividades de modo separado en otras cepas, sin ningún tipo de inhibición cruzada, hace sospechar que se trataría de dos lectinas diferentes las cuales, según la cepa portadora, la edad del cultivo y, posiblemente, otros factores no estudiados, se expresan en mayor o en menor proporción sobre la superficie celular, de acuerdo con la hipótesis formulada por Finkelstein y Hanne (1982b) Este razonamiento se haría extensible a todos los casos en que se han encontrado dos tipos de actividades diferentes sobre el mismo cultivo.

La GSHA no ha sido descrita hasta la fecha en Vibrio cholerae aunque sí en otras especies bacterianas (Aeromonas hydrophila;

Atkinson y Trust, 1980) y sólo se ha encontrado en dos cepas ambientales procedentes de aislamientos de plancton.

Finalmente, se describe un cuarto tipo de hemaglutinina resistente a todos los azúcares y concentraciones ensayados. Este, al igual que la FSHA y GSHA, puede detectarse junto con otro tipo de hemaglutinación en diferentes momentos del ciclo celular o frente a eritrocitos distintos. Faris y cols. (1982) describieron actividades similares en cepas O1 de colección independientemente del biotipo y , muy recientemente, Barja y cols. (1987) en cepas no O1 de origen ambiental.

Es de destacar que la RHA ha sido la única actividad hemaglutinante aparentemente relacionada con la hidrofobicidad de superficie bacteriana, resultado que concuerda con los obtenidos en Escherichia coli (Faris y cols., 1981). En este caso, no se puede concluir que se trate de un tipo de interacción específica, puesto que no es inhibida por ninguno de los azúcares utilizados. Quedaría por dilucidar si la alta hidrofobicidad de superficie encontrada en las cepas productoras de RHA es el reflejo de la presencia de adhesinas específicas bacterianas, de especificidad no conocida, o si se trata de interacciones hidrofóbicas de tipo inespecífico.

Los resultados obtenidos respecto a la hidrofobicidad de superficie permiten sacar algunas conclusiones interesantes a parte de la ya mencionada. Por un lado, los valores obtenidos para las cepas

hemaglutinantes, mediante la aplicación del SAT, son similares a los encontrados por Faris y cols. (1981, 1982) tanto en Escherichia coli como en Vibrio cholerae. Por otra parte, y en concordancia con los anteriores autores, la hidrofobicidad de superficie desarrollada por el vibrio depende del medio de crecimiento utilizado y de la edad del cultivo, siendo destruída por calentamiento a 80°C. En este sentido, se observa un comportamiento similar entre hidrofobicidad de superficie e intensidad de hemaglutinación, ya que ésta también disminuye a lo largo del ciclo celular. Sin embargo no se puede establecer entre ambas actividades una relación directa en todos los casos estudiados. Esta variabilidad en las propiedades de superficie se observa, no sólo en función de la edad del cultivo, sino también entre poblaciones de células procedentes de un mismo clon y analizadas en la misma fase de crecimiento. La razón podría radicar en la existencia de diferencias en los componentes de la superficie celular (probablemente proteínas hidrofóbicas) detectadas, tanto entre poblaciones distintas, como entre elementos de una misma población tomados en momentos distintos del ciclo celular. Kabir y Alf (1983), en un amplio estudio realizado con cepas O1 de Vibrio cholerae, describen resultados similares, proponiendo que la variabilidad sería consecuencia de diferencias en la composición proteica de la membrana externa, ya que el lipopolisacárido y el glicocálix bacteriano contienen restos hidrofílicos en su estructura.

En nuestro estudio hemos encontrado que las membranas aisladas son capaces de retener la actividad hemaglutinante e hidrofóbica. Este resultado, junto con las observaciones de células intactas al microscopio electrónico, permite concluir que Vibrio cholerae no

desarrolla sobre su superficie estructuras similares a pili o fimbriae, que en otras especies bacterianas (*Escherichia coli*) actúan como mediadoras de la adhesión.

Nelson y cols. (1976) estudiaron la colonización del intestino de conejos experimentales por una cepa patógena de Vibrio cholerae y no encontraron ningún indicio de participación de orgánulos de superficie, tipo pili o fimbriae, en la adhesión al epitelio. Este hallazgo es únicamente puesto en duda por Faris y cols. (1982), quienes observaron este tipo de estructuras sobre la superficie de células de Vibrio cholerae altamente adhesivas. En cualquier caso, la hipótesis más ampliamente aceptada es que la asociación sería el resultado de una interacción más directa entre la superficie del vibrio y la célula epitelial del intestino del huésped.

Otro tipo de actividad hemaglutinante desarrollada por Vibrio cholerae es la no asociada a células, inicialmente descrita por Finkelstein y cols. en 1978. Posteriormente, Hanne y Finkelstein (1982) la detectaron en todas las cepas O1 estudiadas y la propusieron como "lectina colérica" universal. En el presente trabajo, los sobrenadantes de cultivo de todas las cepas de colección y del 59 % de las ambientales produjeron la aglutinación macroscópica de eritrocitos, siendo esta actividad destruída por calentamiento a 80°C y, por tanto, de posible naturaleza proteica. Asimismo resultó dependiente del ión Ca^{++} y del medio de cultivo utilizado en el crecimiento de las cepas. Esta dependencia ya había sido descrita por otros autores (Finkelstein y Hanne, 1982a; Holmgren y cols., 1983).

También se ha detectado un nuevo tipo de exohemaglutinina inhibida por manosa fructosa y glucosa, que no se presentó de forma asociada a células en ninguna de las muestras tomadas a lo largo del ciclo celular. Tampoco parece existir relación alguna entre las hemaglutininas solubles resistentes a azúcares y las asociadas a células, encontrándose tanto cepas productoras de los dos tipos como cepas productoras de un solo tipo. Resultados similares han sido descritos por Hanne y Finkelstein (1982), quienes propusieron que los vibrios podrían expresar este tipo de actividad de forma asociada a células in vivo, puesto que es bastante difícil de explicar como una hemaglutinina soluble actuaría mediando el proceso de adhesión. Actualmente, se le da el papel de una proteasa que sería uno más de los factores de virulencia producidos por Vibrio cholerae, al degradar la fibronectina del epitelio intestinal y favorecer la asociación del vibrio con sus receptores específicos (Svennerholm y cols., 1984). En trabajos más recientes, Finn y cols. (1987) vuelven a proponer que es la actividad hemaglutinante asociada a células la mediadora del proceso de adhesión, coincidiendo con anteriores investigaciones de Jones y cols. (1976) y Bhattacharjee y Srivastava (1978).

Es interesante comentar, que si bien no se ha detectado actividad hemaglutinante en los sobrenadantes de todas las cepas ambientales a nivel macroscópico, sí que se ha encontrado cierta aglutinación en la mayoría de los casos, al observar las muestras al microscopio y compararlas con los correspondientes controles. Esto podría significar que sí que es producida, aunque en tan pequeña cantidad que no es detectable por los métodos convencionales.

La expresión de la actividad exohemaglutinante es dependiente

de la edad del cultivo, ya que comienza a detectarse en fase logarítmica temprana de crecimiento a nivel microscópico alcanzando su máximo en estacionaria. En este sentido Hanne y Finkelstein (1982) detectaron la desaparición de este tipo de actividad al cabo de 18 horas de incubación a 37°C. En nuestro estudio, la exohemaglutinina fue detectada a las 48 horas de incubación, aunque la intensidad obtenida en los ensayos era mucho menor.

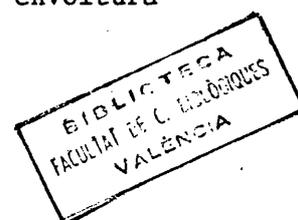
De todo lo expuesto, puede concluirse que Vibrio cholerae, O1 y no O1, produce más de una adhesina/hemaglutinina, tanto soluble como asociada a células. El hecho de que cubra en todo o en parte el espectro de actividades hemaglutinantes descritas en otras especies, indicaría que este microorganismo es capaz de desarrollar una gran diversidad de mecanismos de adhesión. Conviene recordar, una vez más, que se trata de una especie bacteriana que puede sobrevivir y multiplicarse en gran variedad de ambientes, y que en el ecosistema acuático puede existir en forma libre, asociado a superficies (bióticas y no bióticas), o bien encontrarse como comensal en el intestino de muchas especies. Como patógeno puede, al sobrevivir en el interior del organismo del hombre y animales, desencadenar los síntomas clásicos del cólera. En esta versatilidad de nichos ocupados por la especie podría residir la explicación de la variedad de mecanismos de adhesión encontrados al aplicar los modelos de aproximación in vitro utilizados.

4. ANALISIS DE LAS PROTEINAS DE LA ENVOLTURA CELULAR

4.1. INTRODUCCION

La membrana externa de las bacterias Gramnegativas es una estructura altamente especializada que se situa en la cara externa de la membrana citoplasmática (o membrana interna) y de la capa de peptidoglicano, constituyendo la interfase que separa la célula del medio que la rodea. Esta estructura forma una barrera física entre el cuerpo celular y el medio ambiente y, al mismo tiempo, una barrera funcional ya que controla de modo efectivo el acceso de solutos y compuestos externos al interior de la célula. De esta forma, la actuación de la membrana externa como barrera a antibióticos, detergentes y otros agentes químicos tóxicos, contrasta con la permeabilidad que manifiesta a los nutrientes presentes en el medio y necesarios para el crecimiento celular. Además se le reconoce un papel activo en la captación de macromoléculas (sideróforos, bacteriocinas, bacteriófagos etc.) vía receptores específicos, en la formación del septo durante la división celular, y en la promoción y mantenimiento de las parejas celulares durante la conjugación mediatizada por los pili F (Dirienzo y cols., 1978; Osborn y Wu, 1980). Las funciones especializadas de la membrana externa radican fundamentalmente en dos tipos de componentes, el lipopolisacárido (LPS) celular y un número limitado de proteínas altamente específicas y características de las distintas especies bacterianas.

El lipopolisacárido es el elemento que confiere a la envoltura



celular impermeabilidad a distintos tipos de solutos hidrofílicos así como una alta hidrofobicidad de superficie, manifestada en mecanismos tales como evitar la fagocitosis, resistir la acción bactericida del suero etc. (Nikaido y Vaara, 1985).

El contenido proteico de la membrana externa se encuentra dominado por unas pocas especies, que por ser las más abundantes se denominan mayoritarias y que realizan la práctica totalidad de las funciones específicas de la envoltura celular externa. Entre éstas se encuentran los siguientes tipos:

- lipoproteína mureína. Es un polipéptido pequeño (7.2 K) presente en gran número de copias, un tercio de las cuales se enlazan covalentemente al péptidoglicano y el resto se encuentran en forma libre. Su función principal es de tipo estructural ya que estabiliza la arquitectura del complejo peptidoglicano-membrana externa anclando esta última sobre la superficie del peptidoglicano (Nikaido y Vaara, 1985).

- proteínas termomodificables. La mejor conocida es la OmpA de Escherichia coli (Nikaido y Vaara, 1985), aunque también se ha estudiado extensivamente la proteína II de Neisseria gonorrhoeae (Heckels, 1977). Ambas se caracterizan porque su movilidad en los geles SDS-poliacrilamida decrece significativamente cuando la muestra es calentada en presencia de SDS. Su función no es bien conocida y parece ser variable según la especie bacteriana. Así, en Neisseria gonorrhoeae se ha relacionado con la adhesión a las células epiteliales del tracto genital y en Escherichia coli con la formación de las parejas conjugativas, así como con el mantenimiento de la estructura

celular y la integridad de la membrana externa, posiblemente gracias a sus interacciones con el péptidoglicano (Osborn y Wu, 1980).

- proteínas porínicas. Las porinas son proteínas oligoméricas (generalmente trímeros) cuyas unidades monoméricas tienen un peso molecular comprendido entre 28-48 K, según la especie bacteriana. Forman canales trans-membrana, repletos de agua, que permiten el paso selectivo (fundamentalmente limitado por tamaño y carga neta del soluto) de pequeñas moléculas hidrofílicas vía difusión pasiva. Entre sus propiedades físicas se puede destacar su resistencia a la desnaturalización con SDS debida, en parte, a que se encuentran asociadas fuertemente, aunque no covalentemente, con la capa de peptidoglicano y con el LPS. Asimismo el análisis de su estructura secundaria revela un alto contenido en estructuras β . Parece ser que su función viene determinada única y exclusivamente por su estructura terciaria y cuaternaria, no siendo determinante su asociación con la mureína y el LPS (Hancock, 1987). Las porinas mejor conocidas y más extensamente estudiadas son las producidas por Escherichia coli y son denominadas OmpF, OmpC y PhoE. Las tres forman canales de difusión no específicos, aunque con distintas propiedades en cuanto a tamaño de poro y selectividad a iones. La expresión de las dos primeras es controlada por la presión osmótica del medio y la temperatura de crecimiento, de modo que la OmpF es reprimida a presiones osmóticas similares a las de los fluidos animales (0.9% NaCl) y a temperatura de 42°C (Van Alphen y Lugtenberg, 1977; Lundrigan y Earhart, 1984). Nikaido y Vaara (1985) proponen que esta respuesta celular a las condiciones ambientales constituiría un mecanismo de reconocimiento del medio exterior por parte de la bacteria y al mismo tiempo un

mecanismo de defensa frente a la acción bactericida del huésped, ya que la OmpF forma poros de mayor tamaño que permitirían el paso de sustancias inhibitorias presentes en los fluidos animales. De manera opuesta, esta proteína se expresaría como mayoritaria cuando la célula se encontrase fuera del organismo en un medio bajo en nutrientes. Estos autores generalizan a las distintas especies bacterianas y proponen que la variabilidad fenotípica encontrada sería el resultado de la adaptabilidad de la bacteria al medio ambiente, el cual ejercería un control directo sobre la expresión de las porinas.

- proteínas implicadas en los procesos de difusión específica. Las proteínas más estudiadas son la LamB, TonA, FepA y BtuB de Escherichia coli. Todas ellas participan en procesos de difusión transmembrana específicos de soluto (Osborn y Wu, 1980; Dirienzo y cols., 1978; Neilands, 1982). La primera forma canales de difusión que muestran especificidad en el transporte de algunos azúcares como maltosa y maltodextrinas. Presenta gran cantidad de propiedades físicas en común con las proteínas porínicas como son su alto contenido en estructura β y su naturaleza oligomérica, de forma que se encuentra en forma de trímero estable asociado no covalentemente con el peptidoglicano. El resto de proteínas están implicadas en procesos específicos de transporte que requieren de la presencia de la proteína TonB para ser efectivos. Se ha propuesto que esta proteína actuaría de modo coordinado con las anteriores en un proceso de acoplamiento energético que conduciría al transporte activo de los sustratos (Postle y Good, 1983). La proteína TonA es el receptor del ferricromo, la FepA es el receptor de la enterocolina férrica (dos tipos de sideróforos) y la BtuB actúa en el proceso de transporte de la

vitamina B₁₂.

- otras proteínas. Han sido localizados algunos enzimas sobre la membrana externa de Escherichia coli, como fosfolipasa A y algunas proteasas, aunque su presencia no está generalizada en las distintas especies bacterianas. La mejor conocida es la proteína a de Escherichia coli, la cual es una proteasa que se piensa está implicada en la regulación de la producción del polisacárido capsular (Osborn y Wu, 1980; Nikaido y Vaara, 1985).

En la Figura 4.1 se representa el modelo de membrana propuesto por Nikaido y Vaara (1985) que hipotetiza la forma en que se disponen e interaccionan los distintos componentes anteriormente mencionados para dar lugar a una estructura estable.

Es de destacar que la mayor parte del conocimiento sobre las envolturas celulares de las bacterias Gramnegativas deriva de trabajos realizados con algunos miembros de las familias Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae, especialmente con Escherichia coli y Salmonella (Dirienzo y cols., 1978; Nikaido y Nakae, 1979; Osborn y Wu, 1980; Nikaido y Vaara, 1985; Hancock, 1984, 1987). En el caso del género Vibrio, prácticamente la totalidad de las investigaciones realizadas, hasta la fecha, lo han sido con cepas procedentes de colecciones de cultivo o, si la bacteria es patógena, de aislamientos clínicos (Kabir, 1980; Buckley y cols., 1981; Crosa y Hodges, 1981; Kelley y Parker, 1981; Koga y Kawata, 1983; Richardson y Parker, 1985), por lo que existen muy pocos artículos sobre vibrios

ambientales y además normalmente en ellos se trabaja con un bajo número de aislamientos acuáticos (Manning y cols., 1982; Manning y Haynes, 1984). El perfil de proteínas de membrana descrito para la especie Vibrio cholerae varía de unos autores a otros, de unas cepas de colección a otras y sobre todo es especialmente variable cuando se trata de cepas ambientales (Manning y cols., 1982; Barja y cols., 1987). Guidolin y Manning (1987) generalizan a la especie el siguiente patrón proteico: proteínas de 44-47 K con hipotética función porínica; proteína termomodificable de 35 K similar a la OmpA de Escherichia coli; una mayoritaria de 26.2 K que denominan OmpV y una minoritaria de aproximadamente 22 K ambas presentes en todas las cepas estudiadas por ellos, independientemente de su biotipo y serotipo.

4.2. MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas seleccionadas para el estudio, así como las procedentes de las colecciones de cultivo, figuran en la Tabla 4.1 (el origen de las cepas ambientales puede consultarse con más detalle en la Tabla 1 del capítulo 3). Las cepas fueron inoculadas a partir del medio de conservación en tubos conteniendo AP, NB y M9 suplementado con casaminoácidos (pH 7.2) (Maniatis y cols., 1982) e incubadas a 37°C durante 18 h. De cada tubo crecido se inocularon matraces (en la proporción 1/100) conteniendo 100 ml del correspondiente medio fresco que fueron incubados a la misma

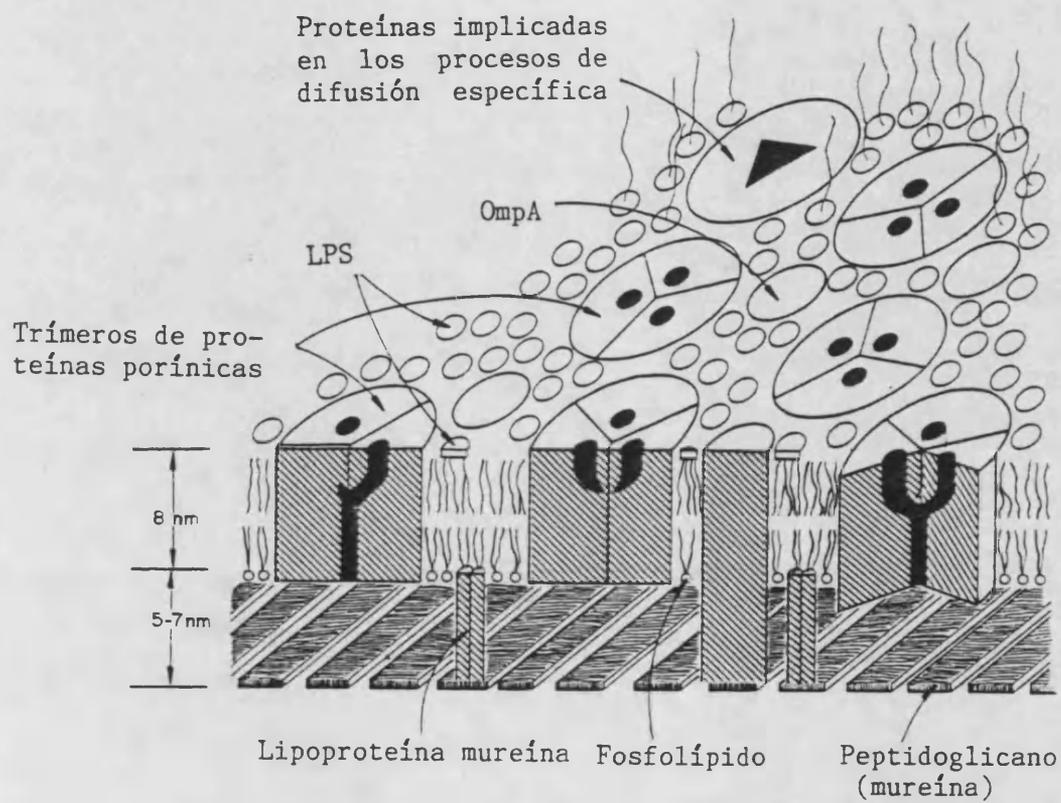


FIGURA 4.1. Modelo estructural de membrana propuesto por Nikaido y Vaara (1985).

TABLA 4.1. Origen y características de las cepas de Vibrio cholerae estudiadas.

Cepas	num.	Origen	Serología	Grupo Heiberg
78	1	agua salobre	No 01	II
94	1	agua lacustre	No 01	II
110-112	3	agua salobre	No 01	I
113	1	agua salobre	AAG	I
114	1	agua salobre	AAG	V
116	1	agua salobre	No 01	V
127	1	agua lacustre	No 01	I
134-137	2	agua salobre	No 01	II
147	1	agua salobre	No 01	II
148	1	agua salobre	No 01	IV
150	1	agua lacustre	No 01	V
151-152	2	agua lacustre	No 01	I
153	1	agua lacustre	No 01	I
155	1	agua salobre	No 01	II
160-161	2	agua lacustre	No 01	II
162	1	agua lacustre	No 01	I
166-167	2	agua lacustre	No 01	II
170	1	agua lacustre	No 01	I
192-194	4	agua lacustre	No 01	II
201	1	agua salobre	No 01	II
209	1	agua lacustre	AAG	II
219-232	7	agua lacustre	No 01	II
233-240	5	agua lacustre	AAG	II
241-244	3	agua lacustre	No 01	II
245	1	agua lacustre	No 01	I
246-247	2	agua lacustre	No 01	II
252	1	agua salobre	AAG	II
255-256	2	agua salobre	No 01	II
257	1	agua salobre	AAG	II
259	1	agua salobre	No 01	II
261	1	agua salobre	No 01	I
263-264	2	agua salobre	No 01	II
265	1	agua salobre	No 01	v
267	1	agua salobre	AAG	II
268	1	agua salobre	No 01	II
269	1	agua salobre	AAG	II
270	1	agua salobre	No 01	II
E	1	agua lacustre	No 01	II
5-9	2	agua lacustre	No 01	II
14-18	2	agua salobre	No 01	II
24	1	agua lacustre	No 01	II
30	1	agua salobre	No 01	II
33	1	agua lacustre	No 01	II
35	1	agua lacustre	No 01	I
37-39	2	agua lacustre	No 01	II
47-57	2	agua salobre	No 01	II
66A	1	plancton de lago	No 01	II
70A	1	plancton de mar	No 01	II
73A	1	plancton de lago	No 01	II
82A	1	plancton de mar	AAG	II
94A	1	plancton de lago	No 01	II
96A	1	plancton de mar	No 01	I
98A	1	plancton de mar	AAG	VII
114A-128A	5	plancton de lago	No 01	II
140A	1	plancton de mar	No 01	II
142A	1	plancton de mar	AAG	II
155A	1	plancton de mar	No 01	I
ATCC 11195	1	clínico	No 01	II
NCTC 7270 ^a	1	clínico	01 Hikojima	-
NCTC 7254 ^a	1	clínico	01 Inaba	-
NCTC 8021 ^a	1	clínico	01 Ogawa	-
NCTC 3661 ^b	1	clínico	01 Inaba	-
ATCC 569B ^a	1	clínico	01 Inaba	-

a. Biotipo cólera

b. Biotipo eltor

temperatura y en agitación (200 rpm), recogándose las células en los dos puntos del ciclo vital previamente seleccionados (ver material y métodos del capítulo 3): inicio de la fase logarítmica de crecimiento (A (660)= 0.4-0.6) y fase estacionaria avanzada (equivalente a 18-24 horas de incubación).

Preparación de las envolturas celulares totales

Las células se recogieron por centrifugación a 6000 x g, 10 min, se lavaron dos veces y finalmente se resuspendieron en 1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) conteniendo MgCl₂ a una concentración final de 0.5 mM. Los flagelos fueron eliminados por agitación vigorosa en un Vórtex (Lab-line Instruments, Inc) durante 60 s. Se utilizaron dos procedimientos de disrupción celular:

a) El primero consistió en la lisis de los esferoplastos obtenidos mediante la actuación combinada de lisozima y ácido etilen-di-amino-tetra-acético (EDTA). Para ello, se utilizaron diferentes concentraciones de lisozima (70-250 µg/ml) en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) conteniendo EDTA a una concentración final de 1 a 5 mM y sacarosa 0.8 M como estabilizante (Aldea y cols., 1980). Se ensayaron diferentes temperaturas (4°C, 20°C, 28°C y 37°C) y tiempos de incubación (desde 30 min a 18 h), siempre bajo agitación suave (15 rpm). Con el fin de controlar el proceso se tomaron muestras cada 15-30 min, que fueron examinadas al microscopio de contraste de fases. Los esferoplastos formados fueron lisados mediante choque osmótico;

añadiéndose lentamente 3 volúmenes de agua destilada fría (4°C) y manteniéndose la mezcla con agitación suave durante 5 min. A continuación los fragmentos celulares obtenidos se trataron (30 min a 37°C) con una solución de DNasa I (3µg/ml) en Tris-HCl 20 mM (pH 7.2) conteniendo MgCl₂ 5mM (Koga y Kawata, 1983).

b) El segundo procedimiento de disrupción consistió en la sonicación de las células en baño de hielo (diluidas en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 a la concentración final de 10⁸ células/ml), utilizándose un Labsonic 2000 (Braun). Se realizaron tantos pases de 15 s como fueron necesarios hasta obtener la ruptura celular total. Para ello se efectuaron controles de la marcha del proceso que fueron examinados mediante microscopía de contraste de fases.

Los fragmentos de membrana total obtenidos por cualquiera de los procedimientos mencionados, fueron recogidos por centrifugación a 48000 x g durante 60 min, tras una centrifugación preliminar (6000 x g, 10 min) encaminada a la eliminación de las posibles células que hubiesen quedado enteras. Se lavó a continuación el sedimento de envolturas celulares totales y se resuspendió en 100-200 µl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6.8), almacenándose hasta su uso a -20°C.

Separación de las proteínas de membrana interna y externa

Tras ajustar la concentración proteica de la envoltura celular total a 1-1.5 mg/ml con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6.8) (ver procedimientos analíticos), las proteínas de membrana interna y

externa fueron separadas mediante solubilización diferencial en dos detergentes no-iónicos que se usaron de modo alternativo, Tritón X-100 (Schnaitman, 1971) y Sarkosil (Filip y cols., 1973). El primero se ensayó a temperatura ambiente durante 20-30 min y a una concentración final entre 1 y 3% (p/v) en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6.8) conteniendo $MgCl_2$ 5mM. El segundo, se ensayó en las mismas condiciones de tiempo y temperatura, a una concentración final entre 0.5-1% (p/v) en el mismo tampón y en ausencia de $MgCl_2$. Algunas veces (según revelaron las electroforesis realizadas) fue necesaria una segunda extracción que se efectuó en las mismas condiciones durante 15 min. Las proteínas insolubles fueron recogidas por centrifugación a 48000 x g durante 120 min y el sedimento fue lavado y finalmente resuspendido en 200 μ l de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6.8). Tanto los sobrenadantes (conteniendo las proteínas solubles) como las suspensiones de proteínas insolubles, fueron almacenados a $-20^\circ C$ hasta su uso.

Procedimientos analíticos

Se determinó el contenido proteico, tanto de las envolturas celulares totales, como de las fracciones soluble e insoluble en los detergentes usados, mediante una modificación del método de Lowry específica para proteínas de membrana (Lowry, 1951), usándose concentraciones crecientes (5-100 μ g/ml) de seroalbúmina bovina en la realización de la curva patrón. La concentración proteica de las muestras fue ajustada a 1-1.5 mg/ml mediante dilución en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6.8).

Tratamiento con calor (termomodificabilidad) y efecto del

2-mercaptoetanol

Inmediatamente antes de las electroforesis, las muestras fueron mezcladas con tampón desnaturalizante (glicerol 20% (p/v), dodecil -sulfato -sódico (SDS) 4% (p/v), azul de bromofenol 0.005% (p/v), en tampón Tris-HCl 12.5 mM, pH 6.8) en la proporción 2:1 (v/v), en presencia y en ausencia de 2-mercaptoetanol a una concentración final del 3.3% (v/v). A continuación las mezclas fueron incubadas a 37°C y 100°C durante 5 min y sometidas a electroforesis.

Electroforesis en geles SDS-acrilamida

La preparación de los geles y tampones de electroforesis se realizó según el método de Laemmli (1970), con algunas modificaciones. Los geles, formados por dos capas, empaquetadora y separadora, se construyeron a partir de una solución stock que contenía 23.8% (p/v) de acrilamida y 4.28% (p/v) de bisacrilamida (N,N'-bis-metilen-acrilamida) en agua destilada. Las concentraciones finales de acrilamida y bisacrilamida en el gel empaquetador fueron del 6% y del 0.11%, mientras que en el separador fueron del 11% y del 0.22% respectivamente. Las concentraciones finales de Tris-HCl y SDS fueron en el gel empaquetador de 0.125 M (pH 6.8) y 0.1%, mientras que en el separador fueron de 0.375 M (pH 8.8) y 0.1% respectivamente. La polimerización de los geles se realizó tras su desgasificación al vacío añadiéndose 2 µl de tetra-metil-etilen-diamina (TEMED) y 25

µl de una solución de persulfato amónico al 10%, por cada ml de solución de gel. Los geles separador (10 cm x 0.6 cm) y empaquetador (1 cm x 0.6 cm) se prepararon en un aparato para electroforesis vertical LKB. El tampón de cubetas (pH 8.3) contenía una concentración final de 0.025 M de Tris, 0.192 M de glicina y 0.190 M de SDS. Una vez polimerizados, se colocó en cada pocillo un volumen de muestra equivalente a 100 µg de proteína si se trataba de envolturas totales, a 60 µg de proteína si se trataba de las fracciones soluble e insoluble en detergentes, y a 20 µg de proteína en el caso de los marcadores de pesos moleculares. Las electroforesis se realizaron a corriente constante (15 mA, a través del gel empaquetador y 20 mA a través del gel separador) suministrada por una fuente Pharmacia ECPS 3000/150. Los geles fueron teñidos por inmersión en una solución de Azul de Coomassie 0.05% (p/v) en isopropanol 25% (v/v) y ácido acético 10% (v/v), manteniéndose en agitación suave durante toda la noche. A continuación la destinción se llevó a cabo mediante tres pases sucesivos de dos horas en ácido acético 10% (v/v) y isopropanol 15% (v/v). Los geles se guardaron en una solución de metanol 30% y ácido acético 5% y se lavaron en agua destilada inmediatamente antes de su lectura densitométrica.

Análisis densitométrico de los geles

Se realizó, tanto para la determinación de los pesos moleculares de las bandas proteínicas problema, como para la estimación de la cantidad relativa de proteína, medida como el área

registrada bajo el pico correspondiente, y absoluta, calculada a partir del valor anterior y del valor de proteína total contenida en el volumen de muestra corrida. Para ello se utilizó un densitómetro láser (LKB 2202 ULTROSAN) con un integrador Hewlett Packard 3390 adaptado, realizándose tres determinaciones por carrera con el fin de obtener una estimación más objetiva y repetitiva, tanto de la distancia de migración, como de los valores de integración. Para evaluar los pesos moleculares de las proteínas problema, se incluyeron en todas las electroforesis los siguientes marcadores: lactoalbúmina (14 K), inhibidor de la tripsina (20 K), anhidrasa carbónica (29 K), gliceraldehido- 3P- deshidrogenasa (36 K), albúmina de huevo (45 K), seroalbúmina bovina (66 K) y fosforilasa B (94 K). Una vez obtenidos los datos de movilidad de las bandas patrón, éstos se procesaron mediante ajuste a una hipérbola robusta modificada según Plikaytis y cols. (1986) y, alternativamente, mediante transformación logarítmica de los mismos y ajuste al modelo lineal convencional. Se usaron los programas PAR y P2R de BMDP (Afifi y Azen, 1979) ajustados a los modelos mencionados y el programa original presentado por Plikaytis y cols. transcrito al BASIC de Microsoft (MSDOS 3.0, en un ordenador IBM-AT).

Análisis cluster

Para evaluar la semejanza o desemejanza global de los microorganismos estudiados en cuanto a la composición proteica de sus envolturas celulares (totales y externas), se realizó un análisis de

agrupamiento utilizándose como coeficiente de asociación el índice de Jaccard (S_j)

$$S_j = a/a+b+c$$

donde a es el número de concordancias positivas en las proteínas de las cepas comparadas y b y c son las discordancias de uno y otro signo. El coeficiente de Jaccard, por lo tanto, omite la evaluación de las concordancias negativas y elimina la posible falacia de estimar la ausencia mutua de un carácter como semejanza.

Los datos de composición proteica de las cepas, obtenidos a partir de la lectura densitométrica de los geles, fueron recogidos en una matriz de datos de tamaño $n \times t$, donde n es el número de bandas distintas y t es el número de cepas. Los resultados fueron codificados como 1 y 0 en base a la presencia o ausencia de las bandas proteicas discriminadas. La evaluación de los S_j para cada par de cepas se llevó a cabo haciendo uso del programa SIMIL.AIO escrito en APL, y el análisis de agrupación de las cepas se efectuó utilizando el programa AGRUSIM.AIO, también en APL, ambos diseñados por el Dr. Manuel Serra Galindo del Departamento de Microbiología de la Universidad de Ciencias Biológicas de Valencia.

Para el análisis de agrupación se eligió el método de asociación UPGMA ('unweighted pair group method with arithmetic averages'). El método pertenece al tipo de análisis con agregación por medias (Sneath, 1972). El criterio de unión entre los grupos emergentes consiste en la maximización del valor medio de los distintos S_j de las cepas integrantes de cada grupo.

A partir de la aplicación de los dos programas anteriormente mencionados se obtuvo una matriz de similaridad sombreada, y con los

resultados del análisis de agrupación se construyó el dendrograma correspondiente.

Medios de cultivo, reactivos, productos y soluciones

- Medios utilizados en el crecimiento de las cepas

a) Medio mínimo M9 suplementado con casaminoácidos (Maniatis y cols., 1982) (CM9)

Sales M9 10X

Na_2HPO_4 6%

KH_2PO_4 3%

NaCl 0.5%

NH_4Cl 1%

Ajustar el pH a 7.4, esterilizar a 121°C

Sales M9 10X 10%

MgSO_4 0.1M+ CaCl_2 0.01M 0.1%

glucosa 50% 1%

Casaminoácidos 20% 1%

Estas tres últimas soluciones se preparan de modo separado y se esterilizan preferentemente por filtración.

b) Agua de Peptona (descrita en el capítulo 3)

c) Caldo Nutritivo (descrito en el capítulo 3)

- productos

a) Implicados en la obtención de membranas totales

Lisozima y ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) y DNasa I de Sigma Chemicals Co (USA).

b) Implicados en la obtención de membranas externas

Triton X-100 y Sarkosyl de Sigma Chemicals Co.

c) Implicados en la realización de los geles SDS-poliacrilamida

Acrilamida, Bisacrilamida y SDS de Sigma; TEMED y azul de Coomassie R250 de Merck.

d) Implicados en la determinación del contenido proteico de las muestras (Lowry, 1951)

- CuSO_4 anhidro (Panreac)
- Tartrato sódico-potásico. $4\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)
- Deoxicolato sódico (Sigma)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Scharlau)
- Seroalbúmina bovina (BSA) utilizada como patrón en la determinación del contenido proteico de las muestras (Sigma).

e) Otros productos

- Glicerol (Scharlau)
- Alcohol Isopropílico, Acido Acético y Metanol (Scharlau)
- Marcadores de pesos moleculares (Sigma).

- Método de Lowry (Lowry, 1951) modificado

a) Soluciones

- Solución 1: CuSO_4 1.5%
- Solución 2: Tartrato sódico-potásico. $4(\text{H}_2\text{O})$ 5.37%
- Solución 3: Reactivo de Folin Ciocalteu
- Solución 4: Deoxicolato sódico 10% en NaOH 0.01N
- Solución 5: 30 g Na_2CO_3 + 4 g NaOH/ 1000 ml (almacenamiento máximo 2 días)
- Solución 6: 50 ml de Sol. 5 + 0.5 ml de Sol. 2 + 0.5 ml de Sol. 1.

b) Procedimiento

- Distribuir las muestras y aforar a 0.4 ml con H_2O
- Añadir 0.1 ml de Sol. 4 agitar
- Añadir 2.5 ml de Sol. 6 agitar y dejar 10 min a temperatura ambiente
- Añadir 0.25 ml de Sol. 3 y dejar 30 min temperatura ambiente
- Leer en un espectrofotómetro la absorbancia a 660 nm

4.3. RESULTADOS

Preparación de las envolturas celulares totales

El uso combinado de lisozima y EDTA seguido de la disrupción de los esferoplastos resultantes fue utilizado en el aislamiento de las envolturas totales de 23 cepas ambientales y 3 cepas 01 de colección, incluyendo una cepa de Escherichia coli utilizada como control. Dado que ninguna de las concentraciones de lisozima y EDTA, normalmente utilizadas con éxito en distintas especies de enterobacterias, rindió buenos resultados, se ensayaron distintas combinaciones, algunas de las cuales se resumen en la Tabla 4.2. El tiempo de incubación que se indica en la Tabla corresponde al máximo número de protoplastos observados en los controles. Las cepas y combinaciones no incluidas dieron lugar a menos del 10 % de protoplastos o fueron lisadas sin formación de esferoplastos, independientemente de las concentraciones de lisozima y EDTA ensayadas, por lo que no fueron utilizadas en las experiencias de obtención de membranas totales. Según se aprecia en la misma Tabla, se dió una gran variabilidad en función de la cepa objeto de estudio y los porcentajes más altos, equiparables a los obtenidos con la cepa de Escherichia coli K-12, se obtuvieron en dos cepas de Vibrio cholerae 01 de colección, que dieron lugar a un 90% de esferoplastos en las condiciones ensayadas. En general, cualquier incremento en la concentración de lisozima por encima de 120 µg/ml y en la de EDTA por encima de 1.5 mM, así como temperaturas de incubación inferiores a 20°C, produjeron una disminución en el número de esferoplastos

TABLA 4.2. Efecto de diferentes concentraciones de lisozima y EDTA, temperaturas y tiempos de incubación sobre el rendimiento en la formación de esferoplastos.

Cepa	células/ml	[lisozima], µg/ml	[EDTA], mM	temp, °C	tiempo, h	% esfero- plastos
1	1.04 x 10 ⁹	120	1.5	20	5	15
5	0.91 x 10 ⁹	120	1.5	20	5	20
9	0.57 x 10 ⁹	100	1	20	3	20
18 a	0.90 x 10 ⁹	120	1.5	20	3	85
18 b	0.60 x 10 ⁹	150	1.5	20	3	75
94 a	0.89 x 10 ⁹	120	1.5	4	2	15
94 b	0.89 x 10 ⁹	120	1.5	20	2	20
116 a	0.73 x 10 ⁹	120	1.5	20	4	15
116 b	0.80 x 10 ⁹	120	2	20	4	10
150 a	0.88 x 10 ⁹	120	1.5	4	4	10
150 b	0.89 x 10 ⁹	120	1.5	20	4	15
150 c	0.88 x 10 ⁹	120	1.5	37	4	20
162	0.70 x 10 ⁹	120	1.5	4	2	50
262	1.10 x 10 ⁹	133	1.5	28	1	60
263	1.43 x 10 ⁹	170	1.5	28	1	10
264	1.00 x 10 ⁹	130	1.5	28	1	60
265	1.31 x 10 ⁹	150	1.5	28	1	60
267	0.55 x 10 ⁹	80	1.5	28	1	65
268	0.67 x 10 ⁹	100	1.5	28	2	10
270 a	0.86 x 10 ⁹	120	1.5	28	2	10
270 b	0.90 x 10 ⁹	120	1.5	4	18	30
7270*	0.77 x 10 ⁹	100	1	4	1	85
7254* a	1.06 x 10 ⁹	160	5	4	1	15
7254 b	1.30 x 10 ⁹	160	1	4	1	90
8021*	0.81 x 10 ⁹	120	1.5	4	1	90
E. coli K-12	0.90 x 10 ⁹	120	1.5	4	1	90

a, b, c. Diferentes tratamientos para una misma cepa.

*. Cepas procedentes de colecciones de cultivo.

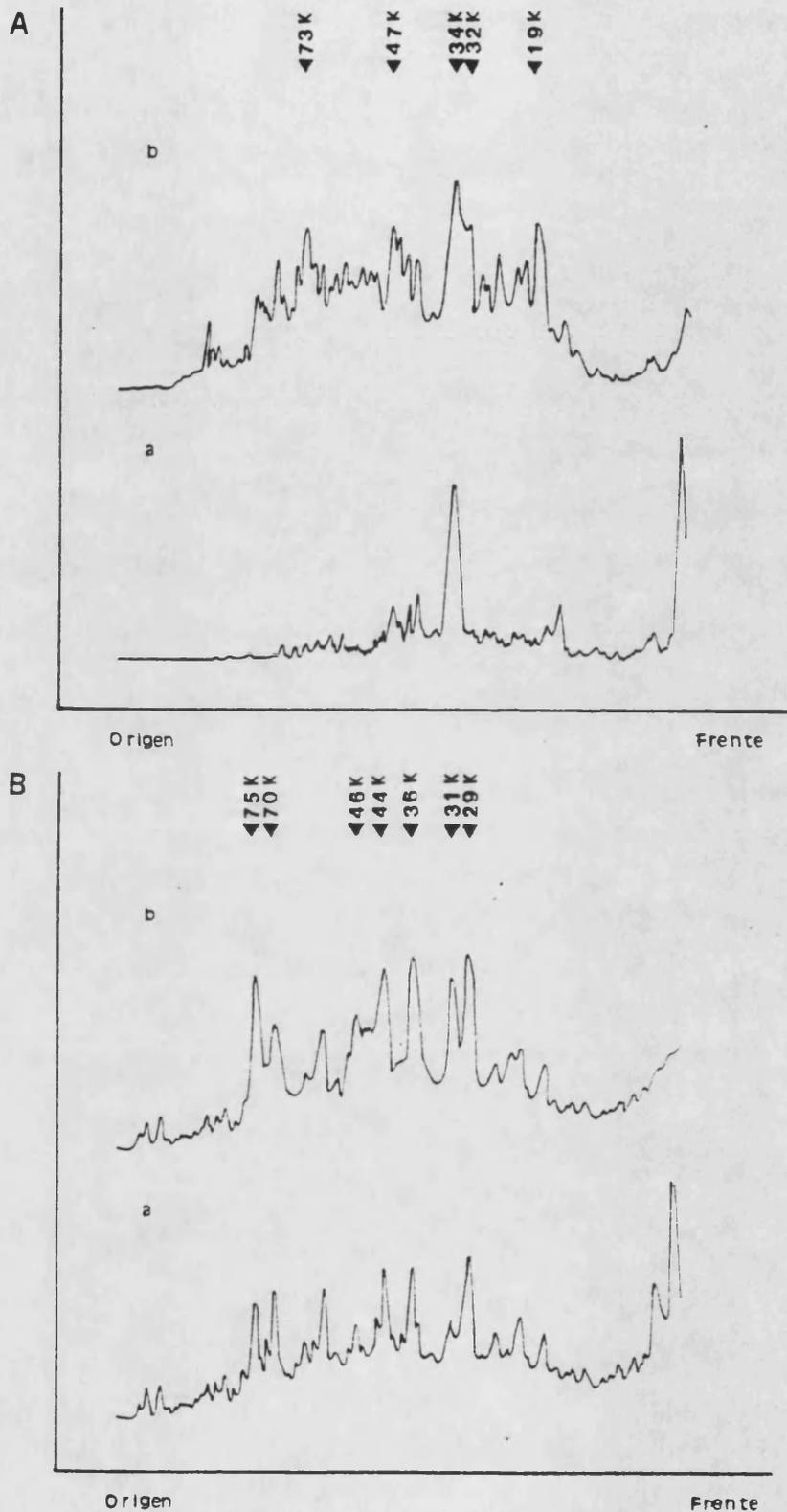


FIGURA 4.2. Perfiles densitométricos de las proteínas de la envoltura celular de dos cepas de *Vibrio cholerae* no 01, separadas por electroforesis en geles SDS- poliacrilamida. Las fracciones de membrana fueron obtenidas por dos procedimientos: sonicación (a) y tratamiento con lisozima + EDTA seguido de disrupción de los esferoplastos formados (b). A, cepa 18; B, cepa 263.

obtenidos. Por comparación de las lecturas densitométricas de muestras de membranas totales de una misma cepa obtenidas por tratamiento con lisozima + EDTA y por sonicación, se pudo concluir que el primer método, además de producir un menor rendimiento en la obtención de sedimentos de membranas, causó la pérdida de parte de las bandas proteicas, aumentando paralelamente los polipéptidos de bajo peso molecular. Dos ejemplos aparecen en la Figura 4. 2: la cepa 18, donde las diferencias fueron muy marcadas y la cepa 263 donde los efectos de pérdida de parte del contenido proteico fueron menos acusados. Este resultado se observó de modo general en todas las cepas ambientales analizadas, por lo que se seleccionó la sonicación como método óptimo de disrupción celular, usándose en el resto de los ensayos que se indican a continuación. En todos los casos, la eficiencia de la rotura celular fue comprobada por observación de los lisados al microscopio de contraste de fases.

Análisis de las proteínas de la envoltura celular total de las cepas de *Vibrio cholerae* estudiadas

Todas las cepas fueron crecidas en AP y recogidas en fase logarítmica temprana de crecimiento. Las electroforesis de las envolturas celulares totales obtenidas revelaron a simple vista una considerable heterogeneidad en cuanto al número de bandas proteicas mayoritarias por cepa y cantidad relativa de las mismas. El análisis densitométrico de los geles se utilizó en una primera aproximación para distinguir entre proteínas mayoritarias y minoritarias de la

envoltura celular, siguiéndose el siguiente criterio: aquellos picos que cubrían más del 5 % del contenido proteico total se consideraron proteínas mayoritarias, confirmándose su asociación con las membranas externas tras el tratamiento con detergentes. En la Figura 4.3 se muestran ejemplos de los perfiles proteicos de cepas de Vibrio cholerae seleccionadas. El número de bandas mayoritarias por cepa osciló entre tres y ocho, siendo además diferentes sus cantidades relativas, mientras que se observó un alto grado de similaridad entre las proteínas minoritarias. Las movilidades relativas de las proteínas mayoritarias oscilaron entre 19 y 82 K, mientras que el total de proteínas discriminadas a partir de los perfiles densitométricos presentó un mayor rango de oscilación, entre 11 y más de 100 K.

Con el fin de agrupar las cepas en función de su similaridad, los datos del contenido proteico, revelados por los perfiles densitométricos, fueron codificados como 1 y 0 en función de la presencia o ausencia de 30 bandas proteicas seleccionadas. Estas bandas correspondieron a los picos discriminados por los perfiles densitométricos que cubrían más del 1% del contenido proteico total, comprendiendo tanto bandas minoritarias como mayoritarias, cuyos pesos moleculares (no estimados en todos los casos) oscilaron entre 19 y más de 100 K. El análisis de agrupamiento aparece representado en las Figuras 4.4 y 4.5 en forma de dendrograma simplificado y hemimatriz sombreada respectivamente, así como el perfil de las cepas tipo de los distintos grupos establecidos. Las cepas quedaron distribuidas en 4 grupos, y el cálculo de las frecuencias con que se presentaron las bandas proteicas dentro de los grupos permitió diferenciar unos de otros en función de las comprendidas dentro del rango de 66-82 K y

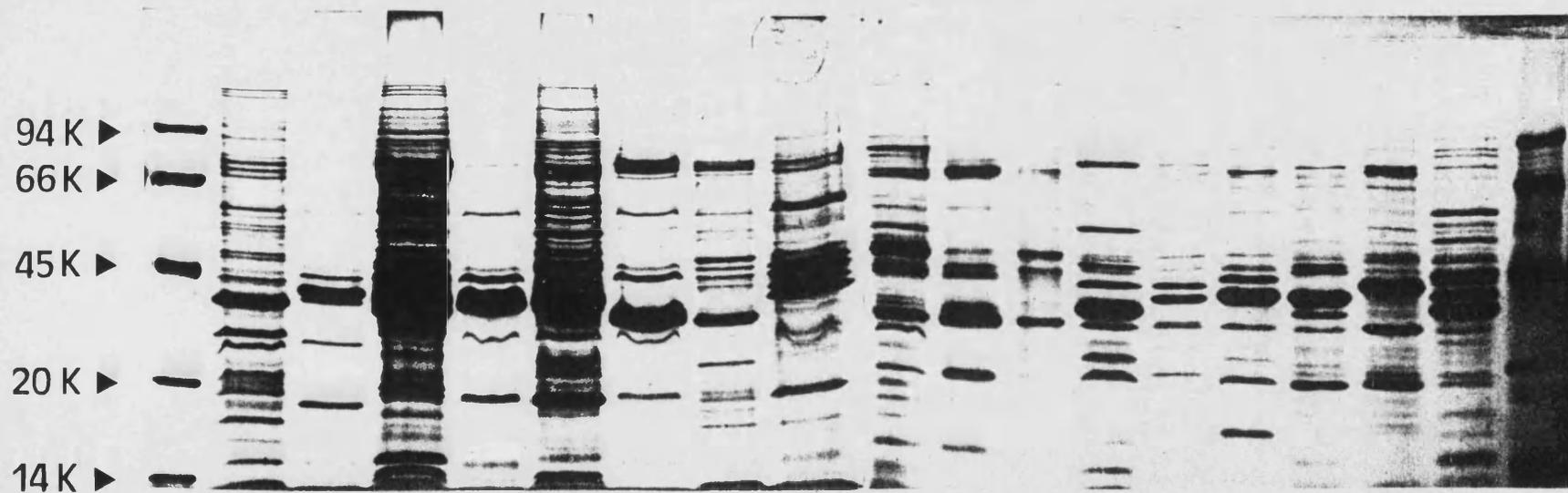


FIGURA 4.3. Electroforesis en geles SDS-poliacrilamida de las proteínas de la envoltura celular de cepas de Vibrio cholerae seleccionadas. Las proteínas utilizadas como marcadoras se indican con una flecha así como sus pesos moleculares. Todas las cepas fueron incubadas en AP y las células recogidas en fase logarítmica temprana de crecimiento, usándose la sonicación como método de disrupción celular.

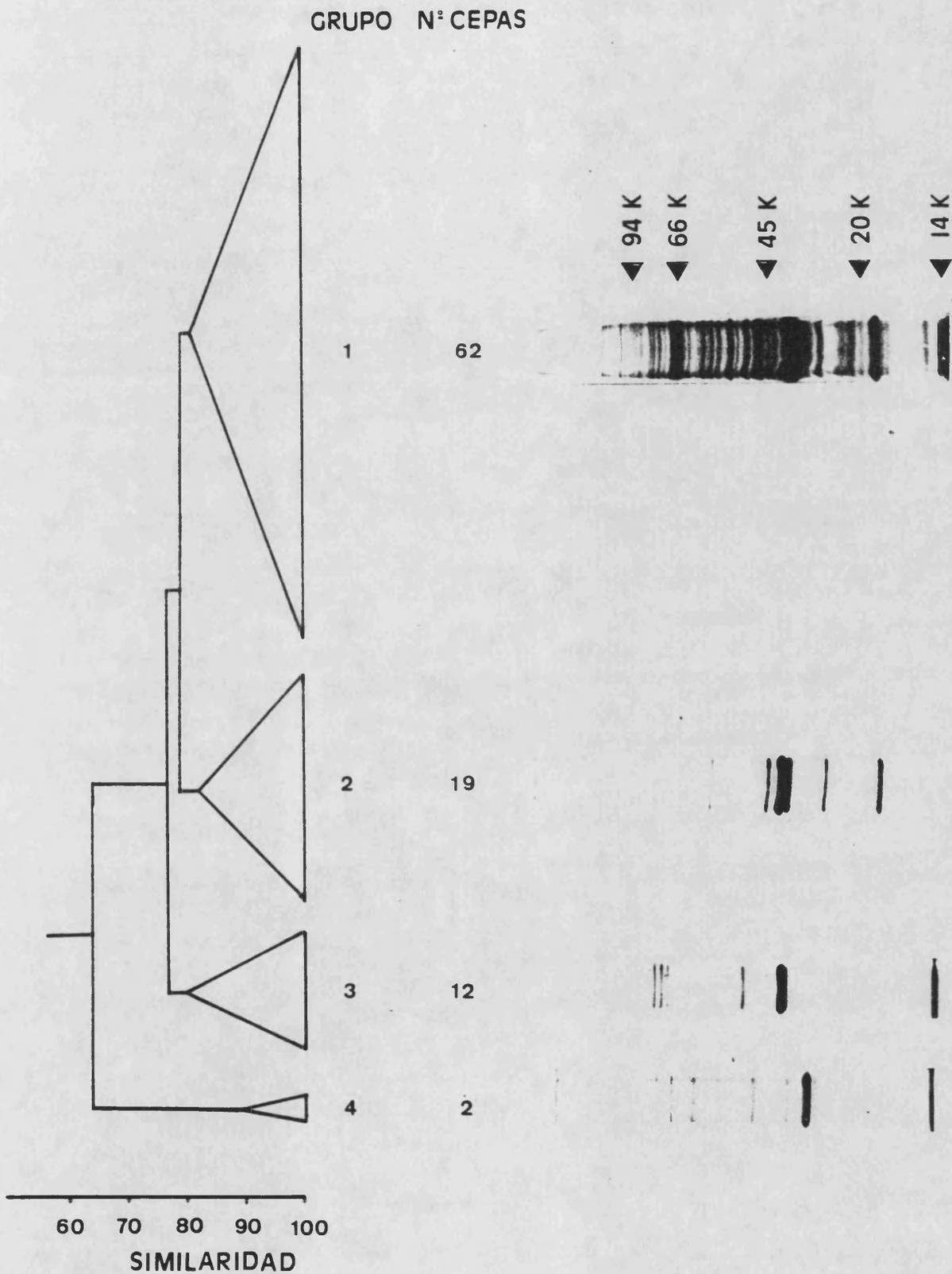


FIGURA 4.4. Dendrograma simplificado que muestra los grupos formados mediante el agrupamiento de las cepas (UPGMA, S_j) en función de los perfiles densitométricos obtenidos tras el análisis electroforético de las proteínas de la envoltura celular total.

GRUPO

CODIGO DE REPRESENTACION (ESCALA REDUCIDA DE 0 A 1):

[.00, .05) :	[.50, .55) :
[.05, .10) :	[.55, .60) /
[.10, .15) :	[.60, .65) /
[.15, .20) :	[.65, .70) +
[.20, .25) :	[.70, .75) +
[.25, .30) :	[.75, .80) ■
[.30, .35) :	[.80, .85) ■
[.35, .40) :	[.85, .90) ■
[.40, .45) :	[.90, .95) ■
[.45, .50) :	[.95, 1.00) ■

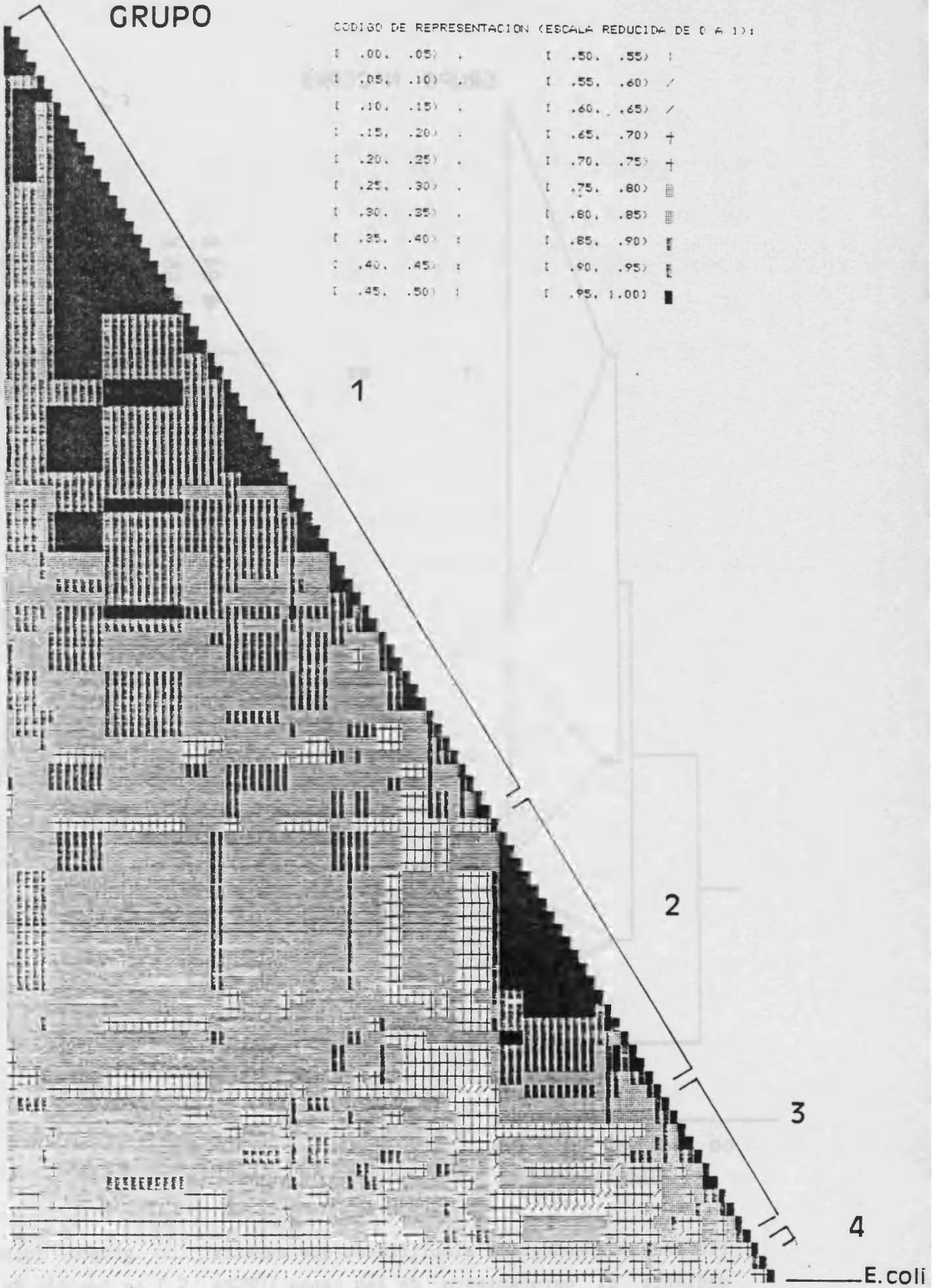


FIGURA 4.5. Hemimatriz sombreada, reordenada según los resultados del agrupamiento (UPGMA, S_j) de las cepas en función de la composición proteica de sus envolturas celulares totales.

19-28 K.

- El primer grupo queda definido a un nivel de similaridad de 82%. Comprende la mayor parte de las cepas ambientales de agua y plancton, 59 en total, dos cepas de colección de serotipo O1 (7254 y 569B) y una no-O1 (11195). Todas ellas se caracterizan por expresar proteínas de alto peso molecular, 82 K, 79 K, 75-74 K, y 70 K, cuyas frecuencias de aparición son del orden de 73%, 40%, 81% y 100% respectivamente. Una banda de 66 K se presenta en todas las cepas del grupo como minoritaria, salvo en un aislamiento de agua de mar donde se expresa como mayoritaria. Otro rasgo característico del grupo es la presencia de proteínas de bajo peso molecular, 28 K, 26 K, 23 K, y 18 K, cuya frecuencia de aparición es de 81%, 79%, 94% y 100% respectivamente.

- El segundo grupo está constituido por 19 cepas, 16 ambientales, tanto de agua como de plancton, y tres de colección O1 (8021, 7270 y 3661). Se forma al nivel de similaridad de 84% y se diferencia del anterior por la ausencia de bandas proteicas mayoritarias de alto peso molecular (66-82 K). Las cepas del grupo expresan también proteínas de bajo peso molecular 28 K, 26 K, 23 K y 19 K, con frecuencias de aparición de 94%, 62%, 94% y 100% respectivamente.

- El tercer grupo está formado por 12 cepas aisladas de agua dulce y salobre, unidas al nivel de similaridad de 78%. Se caracterizan por la ausencia de las proteínas de 82 K y 23 K, mientras

que el resto de bandas se presentan con frecuencias comprendidas entre el 20% (31 K) y el 100 % (59-60 K).

- El cuarto grupo está integrado por dos cepas de agua de lago unidas al nivel de similaridad del 88%. Se caracterizan por no expresar las bandas proteicas de peso molecular comprendido entre 66 y 82 K, 59 y 60 K, 23 y 26 K.

Separación de las proteínas de membrana externa e interna

Con el fin de obtener un método reproducible de separación de las proteínas de membrana interna y membrana externa, las envolturas totales de 39 cepas ambientales seleccionadas, pertenecientes a los cuatro grupos discriminados y una cepa de Escherichia coli K-12 (incluida como control), fueron tratadas con los detergentes no iónicos Tritón X-100 y Sarkosil, y las fracciones solubles e insolubles obtenidas comparadas, tras su análisis electroforético, entre sí y con las muestras de membrana total correspondientes.

- Tratamiento con Tritón X-100. Se utilizaron diferentes concentraciones y tiempos de incubación sin resultados satisfactorios en el caso de las cepas ambientales de Vibrio cholerae. En la Figura 4.6 aparecen dos ejemplos representativos. Al comparar los perfiles densitométricos de las envolturas celulares totales con los de las fracciones soluble e insoluble en Tritón X-100, para cada cepa, se observó: i) en las fracciones insolubles en Tritón X-100 permanecían

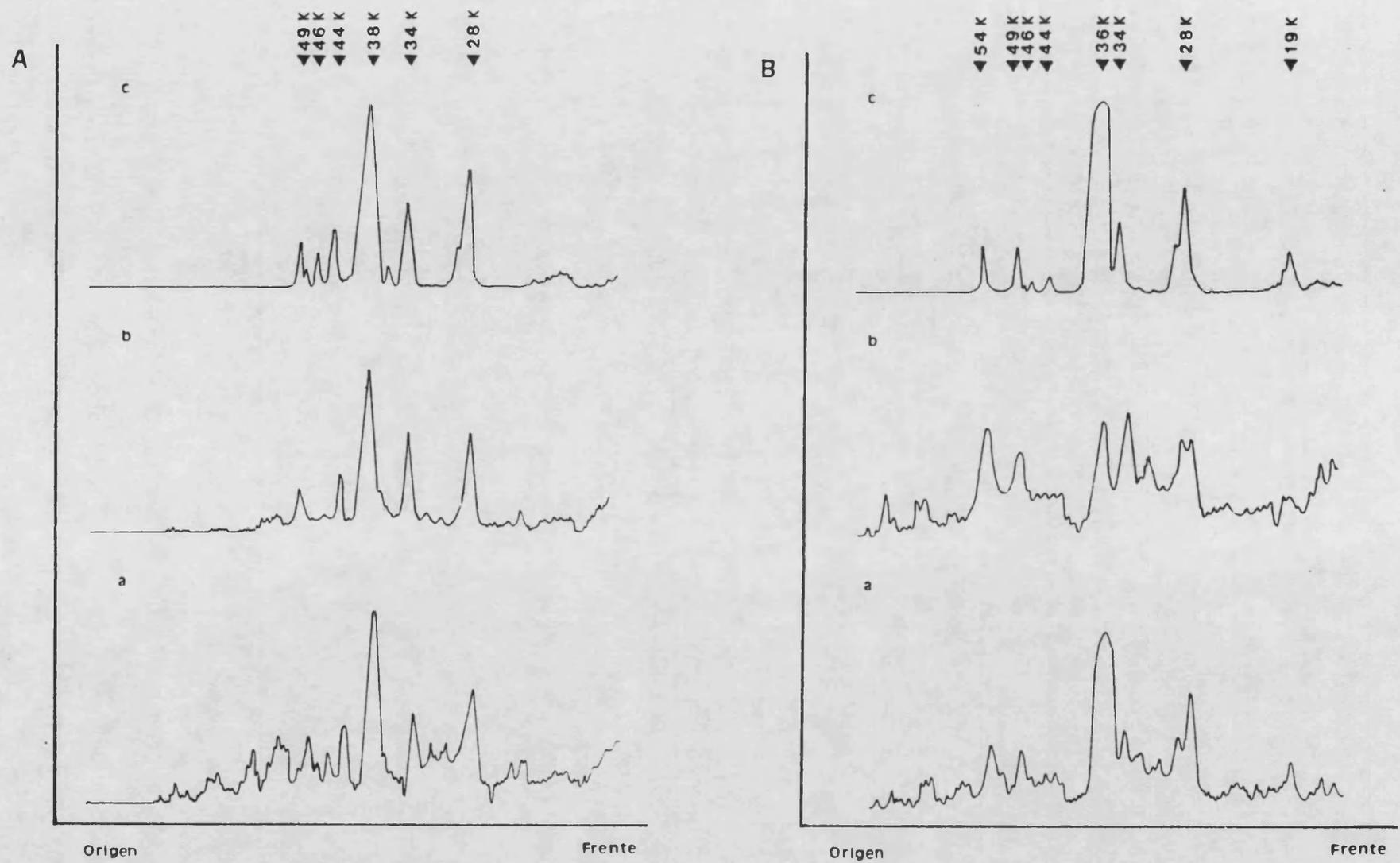


FIGURA 4.6. Densitometrías de los geles SDS-poliacrilamida de las fracciones proteicas crudas (a) e insolubles en Triton X-100 (b) y Sarkosil (c) de dos cepas de *V. cholerae* no O1. A, cepa 193; B, cepa 226.



FIGURA 4.7. Densitometrías de las proteínas de membrana total (a) y externa (b,c) de la cepa *E. coli* K-12 crecida en AP y recogida en fase logarítmica temprana de crecimiento. Las fracciones de membrana externa se obtuvieron por extracción con Tritón X-100 al 2% (b) y Sarkosil al 0.55% (c).

gran número de proteínas minoritarias (cantidad relativa inferior al 1% en las muestras de membrana total). ii) este detergente, sin embargo, solubilizó parte de la proteína mayoritaria más abundante en el 25% de las cepas, lo cual produjo una reducción del porcentaje relativo de esta proteína en relación al resto de las presentes en la fracción insoluble, entre el 5 y el 75%, según cepa y concentración ensayada. Este efecto se acusó generalmente a concentraciones superiores al 2%. iii) este detergente causó además la pérdida de parte de las proteínas mayoritarias de pesos moleculares comprendidos en el rango 40-50 K y 19-28K. Al comparar las fracciones soluble e insoluble en Tritón X-100 entre sí, se comprobó que las proteínas no observables o disminuídas en la fracción insoluble, aparecían como picos en los perfiles densitométricos de la fracción soluble.

- Tratamiento con Sarkosil. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar la concentración más baja (0.55%), ya que concentraciones superiores produjeron la pérdida de las bandas proteicas mayoritarias de pesos moleculares comprendidos entre 59-66 K. En algunos casos, y según revelaron los análisis electroforéticos de muestras tomadas a distintos tiempos de solubilización, se requirió una segunda extracción, durante 15 minutos y en las mismas condiciones. En general, los densitogramas de las fracciones insolubles en Sarkosil revelaron que, no sólo se mantenían los picos correspondientes a las bandas mayoritarias, sino que, además, sus proporciones relativas se conservaban, lo cual supone que no se produjeron fenómenos de solubilización preferencial de ninguna proteína mayoritaria en las condiciones y cepas ensayadas (Figura

4.6).

Por todo ello se seleccionó este detergente para la realización del resto de los ensayos. En la Figura 4.7 aparecen los resultados obtenidos con la cepa de Escherichia coli utilizada como control con uno y otro tratamiento. Puede observarse que en ambos casos y en contraste con lo encontrado en Vibrio cholerae, los perfiles fueron totalmente comparables.

Análisis de las proteínas de membrana externa de las cepas estudiadas

Las fracciones de membranas externas obtenidas fueron analizadas electroforéticamente y densitométricamente. El número y peso molecular de las bandas variaba de una cepa a otra, confirmándose como proteínas de membrana externa todas aquellas que habían sido consideradas como mayoritarias (cantidad relativa superior al 5%) en los geles de membranas totales y encontrándose además algunas minoritarias. En total pudieron discriminarse 20 bandas proteicas cuyos pesos moleculares fueron de 82 K, 79 K, 74 K, 72 K, 70 K, 66 K, 59 K, 52 K, 48 K, 46 K, 44 K, 41-42 K, 39 K, 37 K, 35 K, 31 K, 28 K, 26 K, 23 K, y 19 K. Los datos de presencia y ausencia de cada una de las bandas fueron codificados como 1 y 0 (puede consultarse la matriz de datos en el apéndice del capítulo) y las cepas agrupadas en función de su similaridad. Los resultados del análisis aparecen en las Figuras 4.8 y 4.9 en forma de dendrograma simplificado y hemimatriz sombreada respectivamente. Como resultado de la pérdida de gran parte

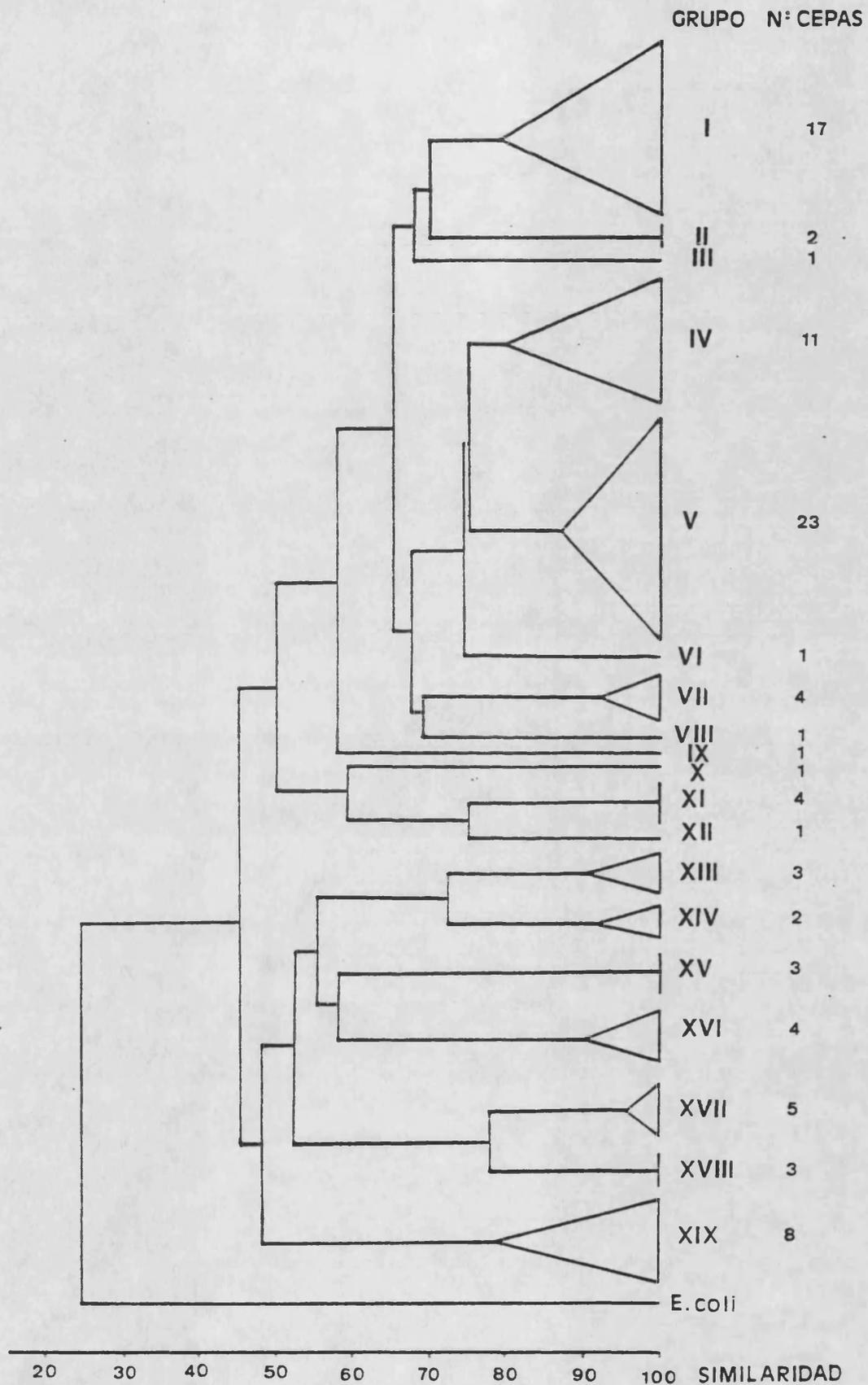


FIGURA 4.8. Dendograma simplificado que muestra los grupos formados mediante el agrupamiento de las cepas (UPGMA, S_j) en función de los perfiles densitométricos obtenidos tras el análisis electroforético de las proteínas de membrana externa.

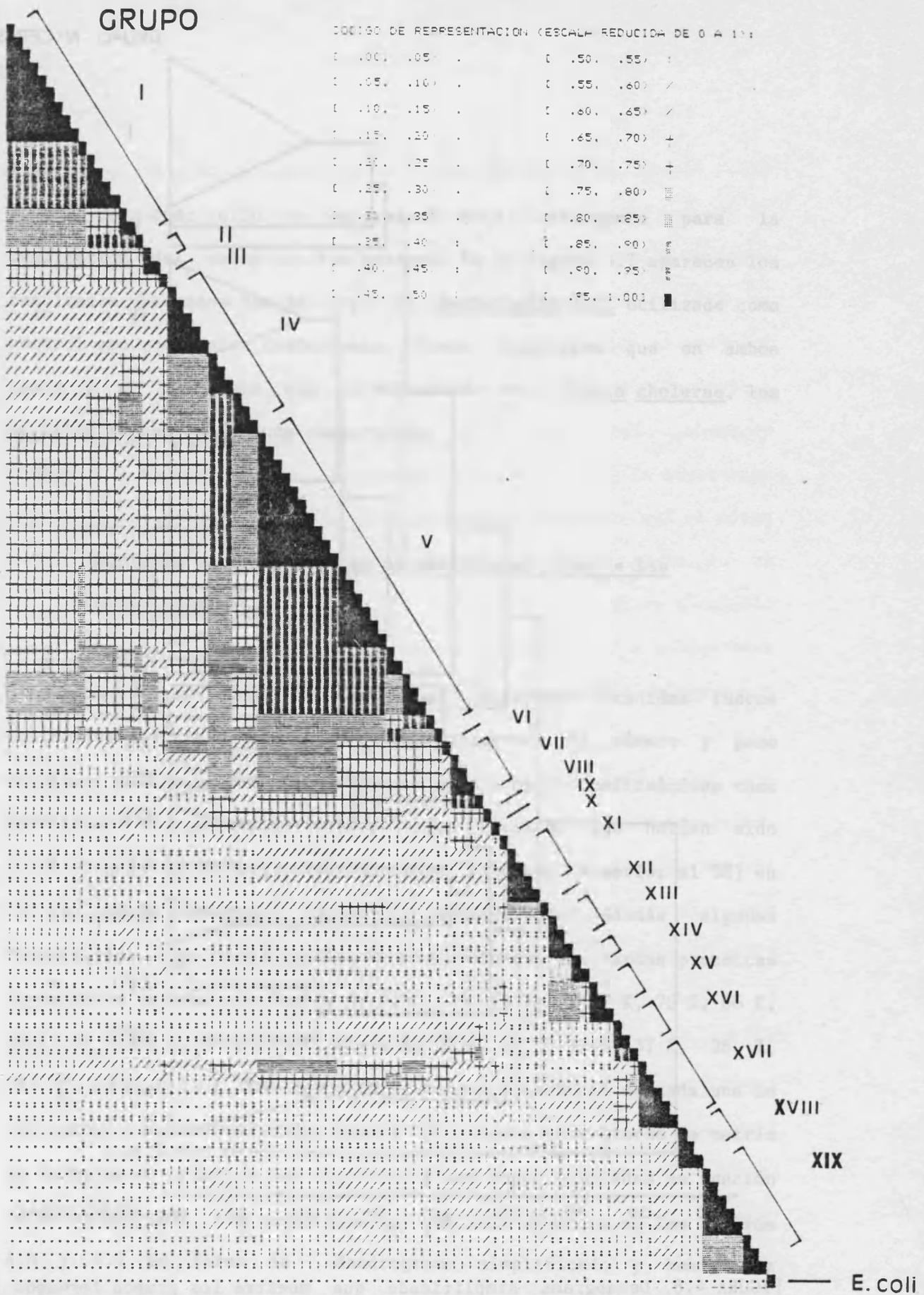


FIGURA 4.9. Hemimatriz sombreada, reordenada según los resultados del agrupamiento (UPGMA, S_j) de las cepas en función de la composición proteica de sus membranas externas.

de las proteínas minoritarias comunes (proteínas de membrana interna), el índice de similaridad entre todas las cepas disminuye y, a su vez, pueden discriminarse un mayor número de grupos. En total se describen 19 patrones diferentes de proteínas de membrana externa expresados por las cepas de Vibrio cholerae estudiadas, que aparecen esquematizados en la Figura 4.10. Cuatro de los grupos han quedado subdivididos en subgrupos en función de las cantidades relativas de las proteínas más abundantes. Las cepas de los grupos I-XIV, corresponden fundamentalmente al primer agrupamiento establecido a partir de los perfiles de proteínas de membrana total. Las cepas del grupo XVI pertenecen al cuarto agrupamiento y las cepas de los grupos XV y XVIII-XX al segundo agrupamiento, quedando las cepas del tercero distribuidas en los grupos I, V, XI, XV, XIX. Es de destacar que al introducir en la matriz de datos los resultados obtenidos para la cepa Escherichia coli K-12, ésta quedó, tras el análisis cluster, aislada del conjunto de los vibrios y relacionada con ellos al nivel de similaridad de 45% (ver Figura 4.8).

Si comparamos los distintos grupos establecidos (Figura 4.10), podemos observar que la proteína mayoritaria más abundante oscila entre 34 y 48 K, salvo en el caso de un aislamiento de mar en que fue la de 66 K. Todas las cepas expresan proteínas de 28-26 K (aparece como doblete en algunos grupos), 19 K y 48 K (aparece como doblete o triplete en la mayor parte de los grupos y está ausente en el grupo IX) y 34-35 K (ausente en el grupo II). A continuación se describen brevemente los grupos encontrados y se especifica la procedencia de las cepas y la actividad hemaglutinante encontrada en los miembros del grupo (ver Resultados del capítulo 3).

- Grupo I. Se forma a un nivel de similaridad de 79% y engloba 17 cepas ambientales de agua y plancton procedentes de ambos tipos de salinidades. Todas las cepas expresan una proteína mayoritaria de 39 K, pudiendo encontrarse a su vez en tres de ellas otra, también mayoritaria, de 41-42 K. Todos los aislamientos del grupo son hemaglutinantes (salvo uno) y expresan MSHA fundamentalmente activa frente a eritrocitos de pollo. Asimismo seis cepas del subgrupo a pueden expresar un tipo de hemaglutinación diferente de eritrocitos humanos (RHA o FSHA).

- Grupo II. Está formado por dos cepas procedentes de un mismo aislamiento de agua salobre con idéntico perfil proteico. Expresan dos proteínas mayoritarias de 44 y 46 K siendo asimismo hemaglutinantes y productores tanto de MSHA como de RHA.

- Grupo III. Está formado por un vibrio de agua salobre productor de MSHA cuya proteína de membrana externa mayoritaria tiene un peso molecular de 41 K.

- Grupo IV. Se forma a un nivel de similaridad de 80.5% y contiene 11 cepas de agua y plancton, la mayor parte de las cuales (73%) son de mar. Se han establecido tres subgrupos en función de la movilidad relativa y número de proteínas más abundantes que son de 37 K, 37 y 34 K, y 34 K respectivamente. La mayoría de los aislamientos (salvo uno) son hemaglutinantes, y al igual que ocurría con el grupo I, capaces de expresar MSHA y, dependiendo de la cepa, RHA o FSHA.

- Grupo V. Engloba 22 cepas ambientales de agua y plancton y la cepa 7254 de colección, unidas a un nivel de similaridad de 87.5% y divididas en tres subgrupos en función del peso molecular de la proteína de membrana externa más abundante, que resultó ser de 39, 34 y 37 K respectivamente. El 30% no presenta actividad hemaglutinante asociada a células y el resto expresa MSHA y/o FSHA.

- Grupo VI. Está formado por un vibrio de agua salobre débilmente hemaglutinante (RHA), cuya proteína mayoritaria es de 66 K.

- Grupo VII. Formado a un nivel de similaridad del 92%, engloba cuatro cepas de agua salobre y lacustre cuya proteína mayoritaria de membrana externa tiene un peso molecular de 37 K. Una de las cepas no es productora de hemaglutininas asociadas a células y el resto son productoras de MSHA y FSHA.

- Grupo VIII. Contiene un vibrio de agua salobre cuya proteína mayoritaria es de 41 K y que expresa hemaglutinación sensible a manosa.

- Grupo IX. Corresponde a una cepa aislada de plancton de mar, única que carece de la proteína de 48 K. Expresa una proteína mayoritaria de 41 K y es productor de MSHA.

- Grupo X. Formado por un vibrio de agua salobre, se diferencia de los anteriores agrupamientos por expresar dos proteínas

mayoritarias de 35 y 34 K; no produce actividad hemaglutinante asociada a células.

- Grupo XI. Engloba cuatro cepas aisladas de agua de lago, tres de ellas procedentes de un mismo aislamiento, a un nivel de similaridad del 100%. La proteína mayoritaria expresada es de 39 K y solamente una de las cepas produce MSHA.

- Grupo XII. Corresponde a la cepa de colección no 01 11195, cuya proteína mayoritaria es de 37 K, productora de una actividad hemaglutinante de tipo RHA.

- Grupo XIII. Formado por tres aislamientos de agua salobre unidos al nivel de similaridad del 90%. Expresan una proteína mayoritaria de 37 K y dos más de 48 y 46 K. Las cepas son productoras de MSHA FSHA y RHA.

- Grupo XIV. Engloba dos cepas ambientales de agua y plancton de mar productoras de RHA y MSHA, a un nivel de similaridad del 92%. La proteína mayoritaria del grupo es de 37K.

- Grupo XV. Está formado por tres vibrios de agua y plancton de mar no hemaglutinantes o débilmente hemaglutinantes, al nivel de similaridad del 100%. La proteína mayoritaria del grupo es de 34 K.

- Grupo XVI. Engloba dos cepas de agua dulce y las cepas de colección 3661 y 569B a un nivel de similaridad de 90%. La proteína

mayoritaria es de 41 K y la actividad hemaglutinante asociada es de los tipos FSHA y MSHA.

- Grupo XVII. Contiene cinco cepas, tres ambientales de agua y plancton y dos O1 de colección, unidas a un nivel de similaridad del 95%. Todas las cepas salvo la 8021 no producen hemaglutinina asociada a células y se caracterizan por la expresión de una proteína mayoritaria de 37 K.

- Grupo XVIII. Formado por tres vibrios de idéntico perfil proteico, procedentes de aislamientos de agua de mar y caracterizadas por la producción de RHA y por la expresión de una proteína mayoritaria de 48K.

- Grupo XIX. Corresponde a ocho cepas de agua y plancton, tanto de lago como de mar unidas a un nivel de similaridad de 78.5%. Todas expresan una proteína mayoritaria de 39 K y producen MSHA y FSHA/RHA.

Proteínas termomodificables y efecto del

2-mercaptoetanol

Con el fin de comprobar la presencia de proteínas termomodificables en la envoltura celular total de las cepas de Vibrio cholerae en estudio, las membranas totales de diez cepas seleccionadas, representativas de los grupos I, IV, V, VII, XI, XII,

XIII, XIV y XVII, fueron solubilizadas a 37 (1 h) y 100°C (5 min). Como puede observarse en la Figura 4.11, lo primero que llama la atención es la homogeneidad de los perfiles encontrados cuando se les compara con los anteriormente descritos para cada grupo. Ninguna de las proteínas mayoritarias de peso molecular comprendido entre 41 y 37 K aparecía en las muestras solubilizadas a 37°C, mientras que sí lo hacía una banda de aproximadamente 100 K que no se encontraba en las muestras hervidas a 100°C. El efecto del 2-mercaptoetanol fue estudiado hirviendo las muestras de membrana total en presencia y en ausencia de este agente. Como puede observarse en la Figura 4.12, el 2-mercaptoetanol parece no afectar la migración de ninguna de las proteínas de membrana externa.

Efecto del medio de crecimiento y la edad del cultivo

Se seleccionaron bacterias representativas de los diferentes grupos encontrados para estudiar el efecto del medio de crecimiento y edad del cultivo sobre la composición en proteínas de la membrana externa de las cepas ambientales de Vibrio cholerae. Los cultivos se realizaron en AP y NB y las células fueron recogidas en fase logarítmica temprana y en fase estacionaria de crecimiento. Los resultados, expresados como cantidades relativas (%) de las proteínas de membrana externa que mostraron algún tipo de variación, se reflejan en la Tabla 4.3. Dado que se encontró que el comportamiento de los miembros del grupo era bastante homogéneo, se consideró interesante calcular los valores relativos medios para cada uno de ellos a partir

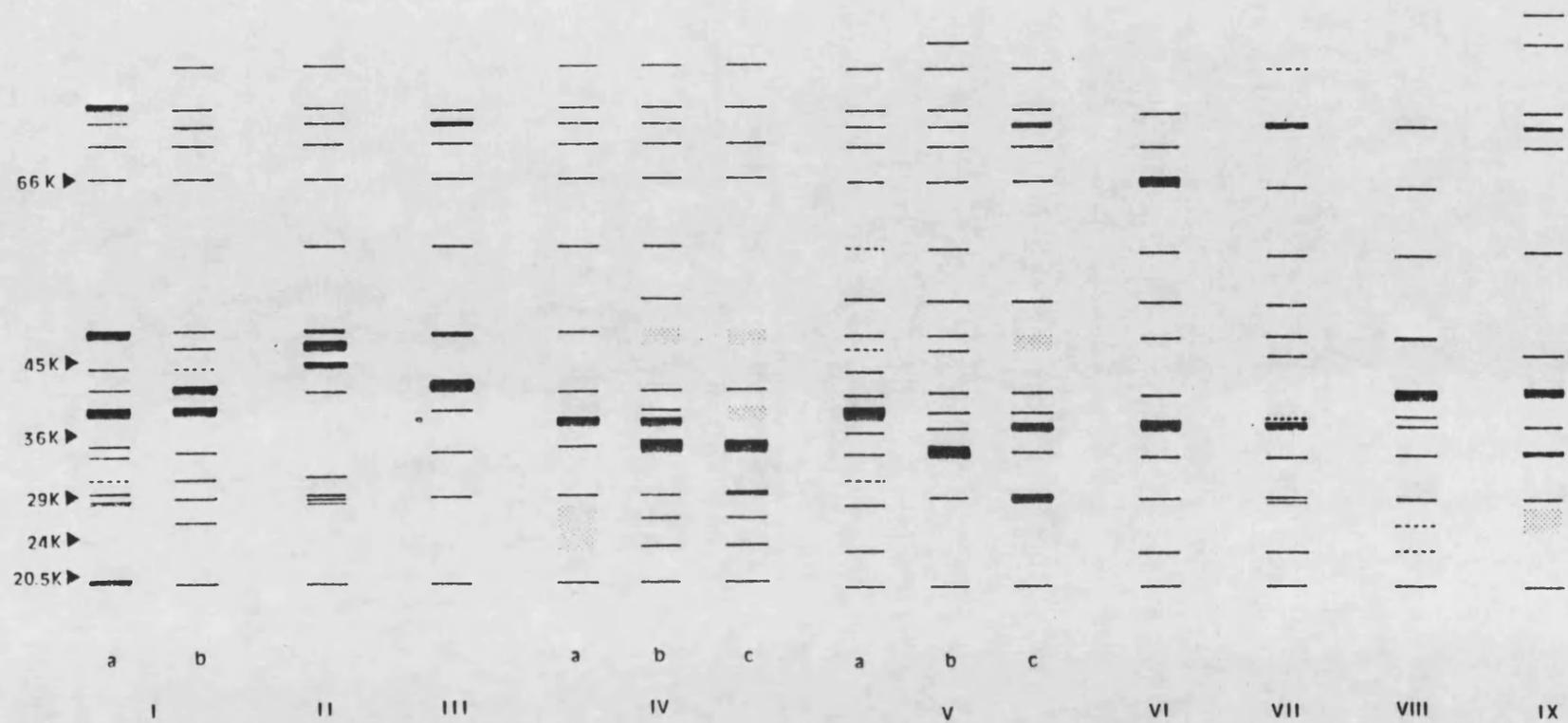


FIGURA 4.10. Representación esquemática de los perfiles proteicos de membrana externa característicos de cada uno de los grupos discriminados tras el análisis de agrupamiento (véase Figuras 4.8 y 4.9).

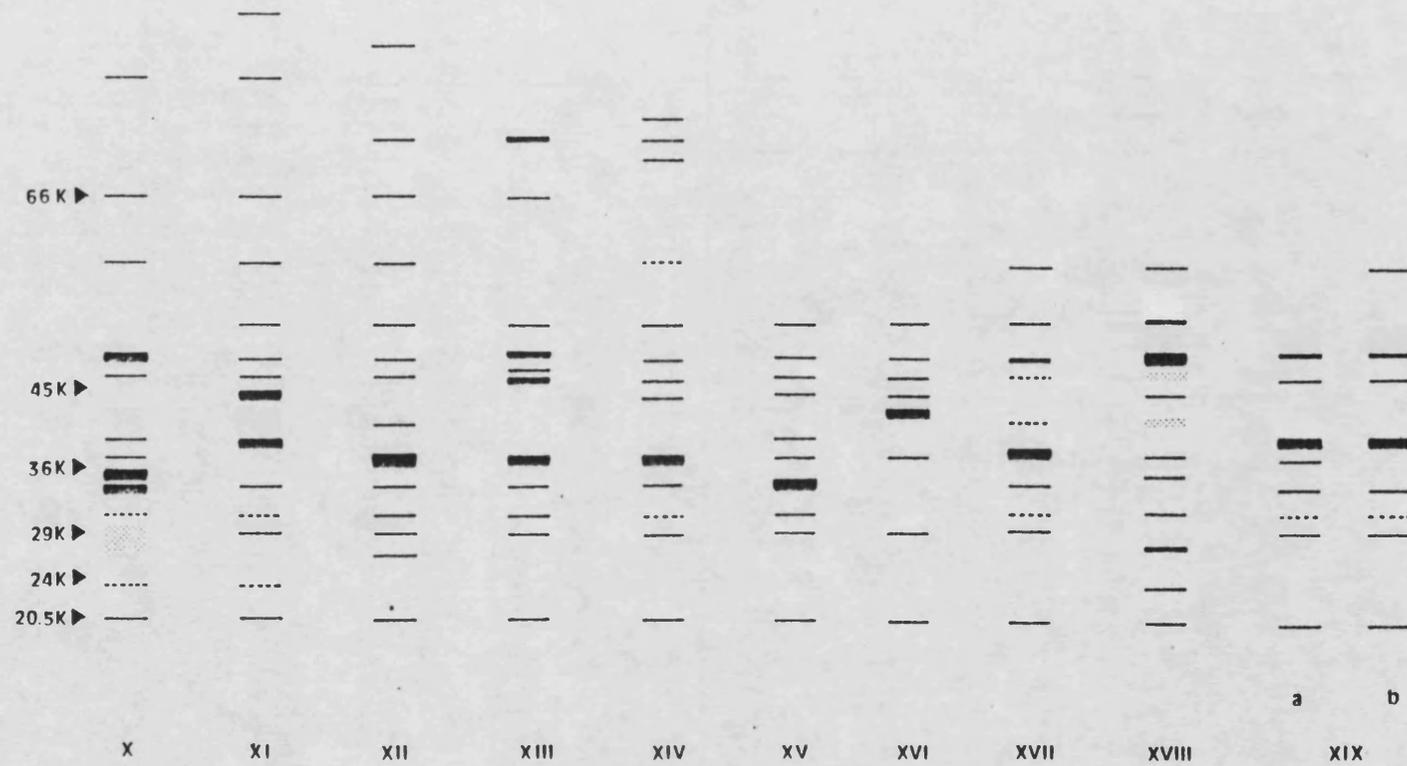


FIGURA 4.10. (continuación).

TABLA 4.3. Número de cepas (n) estudiadas de cada grupo y proporciones medias (% respecto al contenido proteico total de las envolturas externas) de las proteínas de membrana externa expresadas en diferentes medios de cultivo. Las células fueron recogidas en fase logarítmica temprana (f.l.t.) y estacionaria (f.e.). Las proteínas de idéntico comportamiento aparecen agrupadas y sus cantidades relativas acumuladas. Entre paréntesis se indica la desviación típica.

	n	Proteínas					
		70-79K	59-52 K	48-46 K	41 K	39-37 K	28-18 K
Grupo I							
sub a	3						
f.l.t.							
AP		3.5(0.8)	0.0	5.4(1.9)	4.7(2.0)	17.0(3.1)	6.7(2.0)
NB		1.1(0.1)	0.0	7.4(4.9)	4.7(1.6)	22.6(7.2)	10.2(2.9)
f.e.							
AP		4.5(2.4)	0.0	5.3(0.1)	1.9(0.4)	31.4(0.3)	2.8(0.2)
NB		1.1(0.3)	0.0	7.2(0.7)	2.6(0.2)	37.7(2.3)	6.3(1.2)
sub b	2						
f.l.t.							
AP		5.5(0.1)	0.0	5.9(0.3)	18.6(7.4)	27.6(2.0)	8.6(0.5)
NB		1.3(0.3)	0.0	7.6(0.3)	7.7(0.3)	34.1(1.2)	15.1(2.0)
f.e.							
AP		7.3(0.2)	0.0	5.3(0.5)	15.9(3.7)	31.6(3.0)	7.6(0.4)
NB		1.7(0.3)	0.0	7.2(0.4)	12.5(1.5)	46.0(5.2)	7.5(0.6)
Grupo II							
	1						
f.l.t.							
AP		3.2	4.5	27.5	4.3	5.6	2.7
NB		1.2	3.7	28.6	4.5	10.3	8.8
f.e.							
AP		5.3	3.6	26.0	1.6	4.8	1.2
NB		1.1	2.5	24.5	1.2	9.7	2.7
Grupo III							
	1						
f.l.t.							
AP		8.5	5.2	2.3	33.7	19.9	9.9
NB		0.2	9.4	6.7	17.9	32.2	20.7
f.e.							
AP		12.2	0.1	2.2	52.2	8.5	9.9
NB		0.3	0.4	6.6	49.8	6.5	20.6
Grupo IV							
sub a	3						
f.l.t.							
AP		2.2(1.0)	0.9(0.1)	2.2(0.8)	6.6(1.3)	50.4(9.9)	5.5(0.1)
NB		0.0	0.7(0.1)	4.6(0.5)	5.4(0.3)	50.5(3.2)	11.8(2.2)
f.e.							
AP		6.5(1.5)	0.0	6.3(0.5)	6.5(1.5)	36.0(8.5)	3.3(0.2)
NB		0.0	0.0	5.2(1.0)	4.4(0.2)	50.3(3.4)	7.2(1.6)

TABLA 4.3. (continuación).

	n	Proteínas, %					
		70-79K	59-52 K	48-46 K	41 K	39-37 K	28-18 K
Grupo IV							
sub b	2						
f.l.t.							
AP		1.3(0.2)	1.5(0.2)	3.6(0.2)	5.9(0.3)	65.0(5.5)	4.9(0.2)
NB		0.0	0.8(0.0)	4.4(0.5)	1.3(0.1)	59.0(0.1)	12.5(0.6)
f.e.							
AP		9.2(1.0)	0.0	4.0(1.3)	7.8(0.5)	57.6(5.3)	0.2(0.0)
NB		0.0	0.0	5.0(0.9)	3.0(0.1)	58.3(0.3)	1.2(0.1)
sub c	3						
f.l.t.							
AP		3.8(0.1)	0.0	4.7(0.4)	2.7(0.3)	4.0(1.5)	9.2(0.3)
NB		0.4(0.2)	0.0	10.6(1.0)	6.8(0.7)	6.6(0.3)	12.5(1.1)
f.e.							
AP		10.2(0.2)	0.0	0.2(0.1)	2.0(0.4)	2.1(1.1)	3.5(0.1)
NB		0.8(0.1)	0.0	3.5(0.3)	2.1(0.0)	2.0(0.3)	2.7(0.1)
Grupo V							
sub a	2						
f.l.t.							
AP		5.2(0.2)	1.4(0.4)	1.2(0.2)	3.9(0.7)	40.0(3.1)	13.7(2.1)
NB		0.2(0.0)	0.3(0.1)	0.0	6.0(0.4)	20.1(1.5)	18.2(1.1)
f.e.							
AP		10.1(1.1)	0.0	1.5(0.3)	2.1(0.2)	35.0(0.9)	3.0(1.2)
NB		0.4(0.0)	0.0	0.5(0.1)	8.1(2.1)	34.1(1.2)	4.2(1.1)
sub b	1						
f.l.t.							
AP		2.5	1.3	2.7	4.7	33.5	3.6
NB		0.0	1.9	2.8	4.6	27.8	10.2
f.e.							
AP		7.3	1.5	0.4	4.0	28.9	7.1
NB		0.9	2.3	0.2	3.2	22.4	0.8
sub c	1						
f.l.t.							
AP		7.1	0.1	5.4	5.0	24.0	5.7
NB		2.1	0.0	15.3	4.9	26.2	9.8
f.e.							
AP		-	-	-	-	-	-
NB		-	-	-	-	-	-
Grupo VII							
	3						
f.l.t.							
AP		2.6(0.2)	5.3(0.3)	9.2(0.5)	0.0	25.6(5.1)	4.3(1.2)
NB		0.0	4.5(0.4)	10.2(1.2)	0.0	35.2(4.5)	7.3(1.1)
f.e.							
AP		4.2(0.1)	4.3(1.0)	3.2(0.3)	0.0	36.0(3.7)	1.8(0.9)
NB		0.1(0.1)	3.9(0.2)	3.7(0.1)	0.0	38.2(3.9)	1.9(0.8)

TABLA 4.3. (continuación)

	n	Proteínas, %					
		70-79K	59-52 K	48-46 K	41 K	39-37 K	28-18 K
Grupo VIII							
	1						
f.l.t.							
AP		5.7	2.2	4.7	46.0	5.9	6.7
NB		0.0	3.1	8.5	38.4	1.5	10.0
f.e.							
AP		1.9	0.0	3.9	47.2	6.0	5.0
NB		0.0	0.0	8.4	45.4	0.1	4.5
Grupo IX							
	1						
f.l.t.							
AP		2.8	2.1	7.3	28.4	9.0	9.7
NB		0.0	1.2	5.7	30.5	10.5	17.3
f.e.							
AP		2.9	3.1	3.9	35.2	8.4	6.0
NB		0.0	0.0	2.4	35.4	7.7	7.5
Grupo XI							
	3						
f.l.t.							
AP		5.8(0.1)	4.7(0.2)	9.7(1.0)	8.4(0.5)	26.1(1.5)	7.9(0.9)
NB		0.0	4.2(0.1)	12.6(0.9)	9.2(0.9)	31.2(1.8)	12.4(0.8)
f.e.							
AP		-	-	-	-	-	-
NB		-	-	-	-	-	-
Grupo XII							
	1						
f.l.t.							
AP		0.6	1.2	1.7	4.8	28.0	8.9
NB		0.0	1.4	2.6	5.6	30.4	11.2
f.e.							
AP		1.9	0.0	0.9	4.2	27.2	3.1
NB		0.0	0.0	2.4	5.2	31.2	2.5
Grupo XIII							
	2						
f.l.t.							
AP		3.7(0.1)	0.6(0.2)	1.7(0.3)	0.0	65.9(4.5)	9.9(1.2)
NB		0.0	0.7(0.1)	3.5(0.2)	0.0	68.5(6.5)	16.8(2.5)
f.e.							
AP		-	-	-	-	-	-
NB		-	-	-	-	-	-
Grupo XIV							
	1						
f.l.t.							
AP		2.6	0.5	7.0	0.0	22.9	7.7
NB		0.0	0.2	8.2	0.0	22.4	11.0
f.e.							
AP		-	-	-	-	-	-
NB		-	-	-	-	-	-

TABLA 4.3. (continuación)

	n	Proteínas, %					
		70-79K	59-52 K	48-46 K	41 K	39-37 K	28-18 K
Grupo XV							
	2						
f.l.t.							
AP		0.0	2.4(0.1)	2.6(0.3)	1.0(0.1)	7.1(0.5)	8.6
NB		0.0	1.2(0.2)	4.4(0.4)	1.9(0.1)	7.5(1.5)	12.5(5.0)
f.e.							
AP		0.0	2.3(0.1)	3.0(0.2)	0.9(0.2)	11.0(3.0)	10.9
NB		0.0	1.1(0.2)	8.5(0.5)	0.4(0.1)	8.2(0.6)	10.5(0.3)
Grupo XVI							
	1						
f.l.t.							
AP		0.0	5.0	11.9	12.0	14.1	6.8
NB		0.0	2.1	9.3	15.6	14.9	9.1
f.e.							
AP		0.0	4.8	9.5	13.7	14.8	4.0
NB		0.0	2.2	8.4	13.9	14.1	5.5
Grupo XVII							
	3						
f.l.t.							
AP		0.0	7.5(1.0)	8.2(0.1)	4.9(0.1)	22.5(1.2)	8.2(0.2)
NB		0.0	5.8(0.5)	6.6(1.2)	5.1(0.2)	21.2(0.9)	10.0(0.1)
f.e.							
AP		0.0	5.3(0.8)	3.9(0.2)	6.8(0.4)	22.4(1.3)	10.0(0.2)
NB		0.0	5.9(0.4)	5.8(0.2)	6.0(0.3)	22.9(0.2)	9.4(0.9)
Grupo XVIII							
	2						
f.l.t.							
AP		0.0	11.7(1.7)	17.6(2.0)	8.6(1.9)	6.6(0.2)	7.8(0.2)
NB		0.0	12.4(2.1)	17.6(2.0)	8.5(0.1)	7.5(0.3)	8.1(0.3)
f.e.							
AP		-	-	-	-	-	-
NB		-	-	-	-	-	-
Grupo XIX							
sub a	1						
f.l.t.							
AP		0.0	0.0	6.2	0.0	45.0	9.0
NB		0.0	0.0	5.0	0.0	32.5	10.0
f.e.							
AP		0.0	0.0	3.9	0.0	52.5	7.0
NB		0.0	0.0	3.4	0.0	36.5	12.0
sub b	2						
f.l.t.							
AP		0.0	2.9(1.2)	7.6(1.1)	0.0	24.2(2.0)	11.2(1.2)
NB		0.0	0.6(0.3)	9.9(0.1)	0.0	34.7(2.1)	14.5(2.3)
f.e.							
AP		0.0	0.6(0.2)	7.0(1.2)	0.0	16.5(1.1)	9.1(0.9)
NB		0.0	0.0(0.2)	8.8(0.2)	0.0	30.3(1.3)	14.5(0.3)

de los resultados individuales obtenidos. En los casos en que sólo se estudió una cepa, el valor indicado en la Tabla 4.3 corresponde a la media establecida a partir de los datos de tres lecturas densitométricas diferentes (la desviación típica fue siempre inferior al 5%).

En general, la composición del medio de cultivo influyó marcadamente en la expresión de las proteínas de membrana externa de las cepas en estudio. Por un lado, y salvo alguna excepción, si bien la proteína mayoritaria se mantenía, podían detectarse diferencias de dos tipos: i) las cantidades relativas de algunas proteínas variaron; ii) en algunos casos se produjo la aparición de nuevas proteínas de membrana, generalmente de alto peso molecular, detectadas en las fracciones de membrana total y externa de las cepas crecidas en AP. Debido a ello, el número de proteínas en los extractos de membrana externa de las cepas cultivadas en AP fue mayor que el de las mismas cepas crecidas en NB, salvo en el caso de los grupos XV al XIX, en el que resultó idéntico. Este hecho supondría una reducción significativa en el número de grupos diferentes discriminados, caso de que el medio de cultivo utilizado en su crecimiento hubiese sido NB, o por extensión cualquiera de los medios ricos usualmente empleados en el crecimiento de las cepas 01 de colección (TSB o BHI). Por otro lado, la composición proteica cualitativa de las membranas externas estudiadas no resultó ser dependiente de la fase de crecimiento, aunque sí lo fue la proporción relativa de las mismas.

Para comprobar si la aparición o la mayor proporción de

proteínas de membrana de alto peso molecular podía estar relacionada con la riqueza o pobreza en nutrientes de los medios en estudio, se cultivaron 12 cepas seleccionadas en M9 (suplementado con casaminoácidos), constatándose que proteínas de alto peso molecular eran retenidas en las fracciones de membrana (ver Figura 5.9 del capítulo 5) y que las variaciones en el perfil proteico de un medio a otro (AP y CM9) eran mínimas. Estas proteínas de alto peso molecular variaron su proporción a lo largo del ciclo celular, de modo que en general ésta aumentó en las fracciones de membranas externas recogidas en fase estacionaria de crecimiento (ver Tabla 4.3). Otras proteínas cuyas proporciones relativas variaron de un medio a otro y a su vez a lo largo del ciclo vital, correspondieron a las de 59 K, 52 K, 48 K, 46K, 41 K, 39 K, 37 K, 28 K y 19 K. Algunas de ellas han sido agrupadas en la Tabla 4.3 puesto que su comportamiento resultó ser similar. Como pauta general, las proteínas de 28-19 K se expresaron en mayor proporción en NB, y a su vez decreció su expresión a lo largo del ciclo celular, mientras que en el resto de los casos se observaron diferentes comportamientos en función del grupo o cepa en estudio. En la Figura 4.13 se ilustran los ejemplos más representativos de los distintos cambios mencionados.

4.4. DISCUSION

Los componentes celulares asociados a la membrana externa juegan un papel esencial en la distribución de los microorganismos en su hábitat, ya que median los procesos de adhesión a partículas y a



FIGURA 4.11. Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida de las proteínas de la envoltura celular de cepas representativas de los distintos grupos de patrones de membrana externa discriminados. Las bacterias fueron crecidas en CM9, recogidas en fase log. temprana de crecimiento y sus membranas totales solubilizadas a 37°C, 1 h. Se indica con dos flechas a la derecha el rango de pesos moleculares correspondiente a las proteínas mayoritarias cuya presencia sólo se revela tras ebullición de las muestras 5 min (véase la Figura 4.10). A, grupo Ib; B, grupo II; C, grupo IVa; D, grupo IVb; E, grupo XI; F, grupo XV; G, grupo Ia; H, grupo XIII; I, grupo VII; J, grupo XIXb.

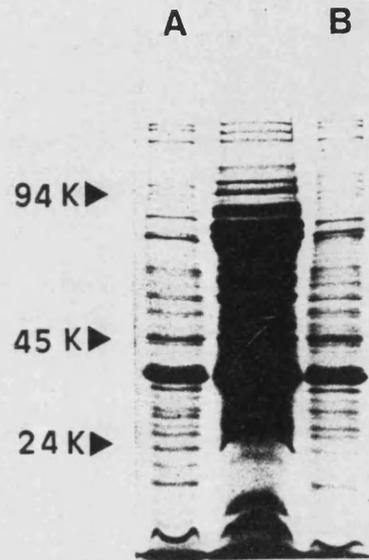


FIGURA 4.12. Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida de las proteínas de la envoltura celular de una cepa ambiental de *V. cholerae*. A, fracción solubilizada por ebullición en ausencia de 2-mercaptoetanol; B, fracción de membranas solubilizada en presencia de 3.3% de 2-mercaptoetanol.

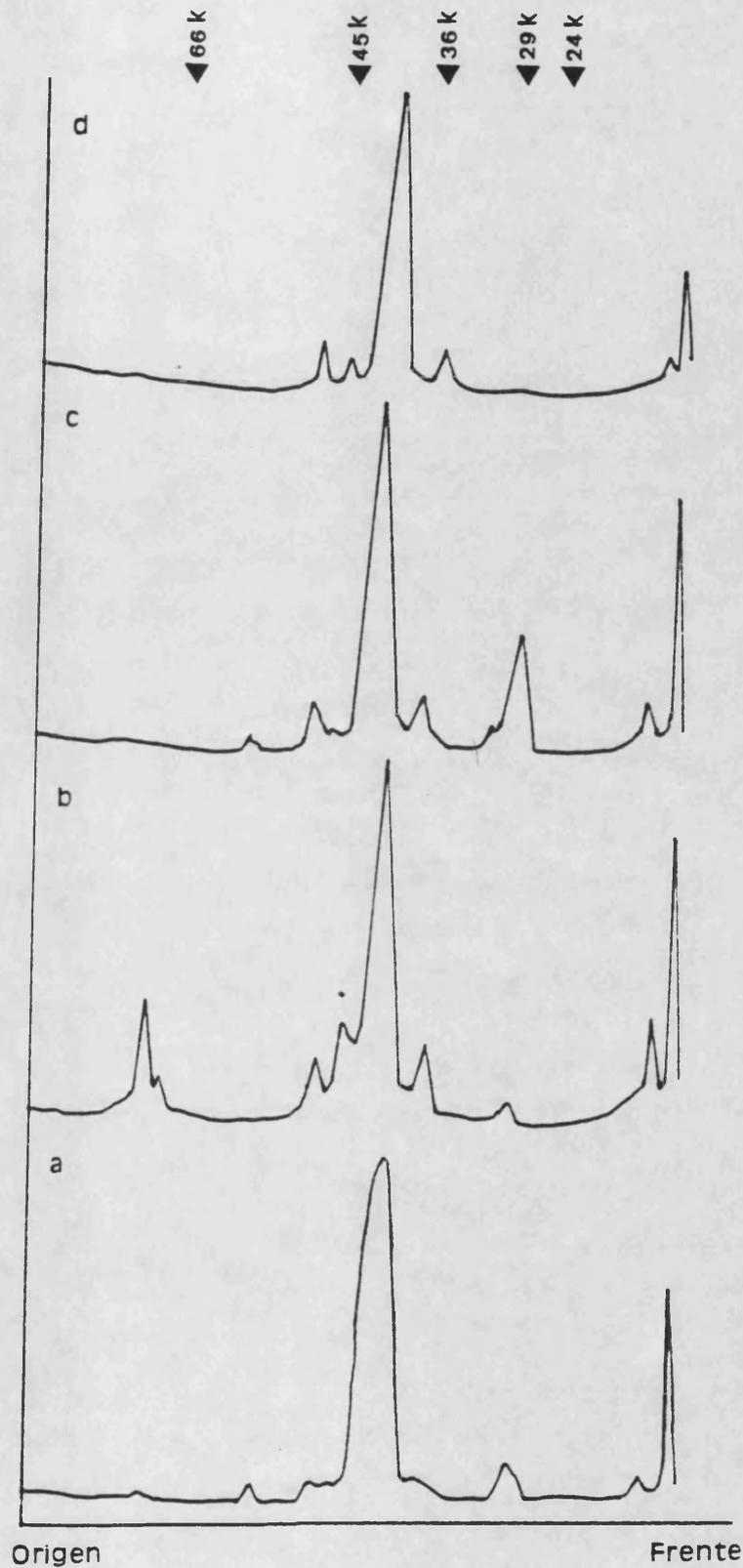


FIGURA 4.13. Perfiles densitométricos de las proteínas de membrana externa de la cepa de *V. cholerae* no 01 255 crecida en AP (a,b) y NB (c,d). Las células fueron recogidas en fase logarítmica temprana (a,c) y tardía (b,d) de crecimiento.

otros organismos (Dudman, 1977). Este hecho es particularmente importante en el caso de las bacterias que, como Vibrio cholerae, pueden encontrarse, tanto en el ambiente acuático como en el interior de distintas especies animales. Dentro del organismo, las membranas externas de los vibrios interaccionan con las células del huésped, permitiendo el asentamiento de la bacteria y, si ésta es patógena, el posterior desarrollo de la enfermedad (Beachey, 1980; Nikaido y Vaara, 1985). De todos los constituyentes de la membrana externa, son las proteínas las responsables de las funciones específicas de la misma y en consecuencia su conocimiento constituye el principal objetivo de éste tipo de estudios (Dirienzo y cols., 1978; Nikaido y Nakae, 1979; Osborn y Wu, 1980; Nikaido y Vaara, 1985).

Como se ha mencionado anteriormente, la mayor parte de los trabajos realizados sobre el tema en la especie Vibrio cholerae han sido realizados con cepas 01 de colección o no-01 procedentes de aislamientos clínicos, dándosele poca o nula importancia al conocimiento de los componentes de membrana externa de vibrios ambientales. Manning y cols., (1982) realizaron una caracterización preliminar de las proteínas de membrana externa de cepas de Vibrio cholerae, incluyendo en su estudio 5 cepas no 01. Los autores encontraron una gran variabilidad en el número y cantidad relativa de las proteínas mayoritarias, la más abundante de las cuales oscilaba entre 25-50 K, según la cepa no 01 estudiada. Los mismos resultados, en cuanto a heterogeneidad han encontrado Barja y cols. (1987) en un estudio reciente realizado con cepas ambientales de Bangladesh.

En el presente trabajo se han analizado los perfiles de

membranas totales y externas de un gran número de cepas de agua y plancton con el objeto de caracterizar la composición en proteínas de las cepas ambientales de la especie y, al mismo tiempo, intentar relacionar los cambios observados en el perfil proteico, bajo diferentes condiciones de edad y cultivo, con los cambios encontrados a nivel de las propiedades de superficie especificadas en el apartado 3 de la presente tesis.

Hasta el momento no se han encontrado referencias bibliográficas acerca de la eficiencia de distintas técnicas de rotura bacteriana en Vibrio cholerae no O1 de origen ambiental, por lo que la primera parte del trabajo consistió en seleccionar un método efectivo de disrupción celular. Aunque el tratamiento con lisozima y EDTA es utilizado de modo general en muchas bacterias gramnegativas (Aldea y cols., 1980), incluyendo miembros del género Vibrio (Koga y Kawata, 1983), en el presente estudio, gran parte de las cepas ambientales seleccionadas resultaron ser extremadamente sensibles al tratamiento, de modo que se producía la lisis celular sin que se llegasen a formar cantidades suficientes de esferoplastos. Además, en los casos en que se comparó el perfil proteico obtenido tras el choque osmótico de los esferoplastos formados, con el conseguido por sonicación, pudo comprobarse que el tratamiento producía la pérdida de parte del contenido proteico y un aumento de la fracción polipeptídica de bajo peso molecular (por debajo de 13 K). Schnaitman (1971a), en un extenso estudio realizado sobre el efecto de la lisozima y el EDTA sobre las paredes celulares aisladas de Escherichia coli, encontró picos de tamaño similar. El autor concluyó que en las

bacterias gramnegativas, la acción de la lisozima sobre el péptidoglicano, incluso en presencia de EDTA, no es completa, produciéndose una mezcla de fragmentos de varios tamaños a los cuales se encontrarían unidos una o más moléculas de aproximadamente 7 K (polipéptido mureína). Este hecho explicaría los picos observados, mientras que la pérdida de parte del contenido proteico podría ser debida a la acción del EDTA. En este sentido, ya Hasin y cols. (1975) y Matsushita y cols. (1978) sugirieron que el uso del EDTA en el aislamiento de las proteínas de membrana externa de algunas bacterias Gramnegativas, podía producir la alteración de la estructura y/o liberación de algunas proteínas, hallazgo que confirmaron por Kelley y Parker (1981) en una cepa de Vibrio cholerae O1 de colección. En contraposición, Sciortino y Finkelstein (1983), en un estudio que realizaron con cuatro cepas O1 de colección, concluyeron que el uso del EDTA en la obtención de los fragmentos de membrana no sólo no producía la liberación de proteínas, sino que además, combinado con detergentes, aumentaba la eficiencia en la extracción. En nuestro caso, si bien el rendimiento en la obtención de protoplastos en las cepas de colección fue mayor, tanto en éstas como en las cepas ambientales, los perfiles densitométricos revelaron sin lugar a dudas la pérdida de parte del contenido proteico. De este hecho puede deducirse que las interacciones de las proteínas con el lipopolisacárido necesariamente han de ser diferentes a las observadas en las enterobacterias, por lo menos en las cepas estudiadas por nosotros, y que ello, tal y como propusieron Manning y cols.(1982), podría ser debido a diferencias estructurales en sus LPS. En cualquier caso, la sonicación, debidamente controlada, se reveló como el método

más cómodo y eficaz de disrupción celular y fue utilizada en el análisis de las 96 cepas seleccionadas.

El uso de detergentes no iónicos en el aislamiento de las proteínas de membrana externa se basa en que solubilizan las proteínas citoplasmáticas, mientras que las de membrana externa pueden separarse de la fracción soluble tras una centrifugación diferencial. Los dos detergentes de uso más extendido son el Tritón X-100 y el Sarkosil (Schnaitman, 1971b; Filip y cols., 1973; Aldea y cols., 1980; Sigel y Payne, 1982; Witkowska y cols., 1982; Sciortino y Finkelstein, 1983; Squire y cols., 1984; Sterkenburg y cols., 1984; Aoki y Holland, 1985;), habiéndose utilizado ambos en las extracciones de las proteínas de membrana externa de cepas de Vibrio cholerae O1 de colección (Kabir, 1980, 1983; Sciortino y Finkelstein, 1983, Sciortino y cols., 1985). En los trabajos de Kabir, el procedimiento de extracción mediante el uso del detergente Tritón X-100, se describió como un método altamente eficaz de aislamiento de las proteínas de membrana externa. Sin embargo, Kelley y Parker (1981) y Manning y cols. (1982), concluyeron que el Triton X-100 solubilizaba también parte de las proteínas de membrana externa, sobre todo si su uso se combinaba con EDTA. Resultados similares fueron encontrados por Richardson y Parker (1985), quienes trabajaron con cuatro cepas O1 de colección y compararon el perfil de membrana externa obtenido por tratamiento con este detergente y el obtenido tras centrifugación en gradientes de sacarosa. Por otro lado, mientras Manning y Haynes (1984) recomiendan que las extracciones se hagan mediante centrifugación en gradientes de sacarosa, Sciortino y Finkelstein

(1983), describen como método más rápido y eficaz el uso del detergente Sarkosil a la concentración del 1% y en dos incubaciones consecutivas efectuadas a 37°C y a temperatura ambiente respectivamente. Barja y cols (1987) también han utilizado este último detergente en el aislamiento de las proteínas de membrana externa de cepas ambientales de Vibrio cholerae, aunque a una concentración ligeramente superior y mediante una única incubación efectuada a T° ambiente. Este último método es usado en el aislamiento de las proteínas de membrana externa de otros miembros del género Vibrio (Crosa y Hodges, 1981). Dada la controversia existente entre unos autores y otros, se consideró de interés evaluar la acción que ejercían diferentes concentraciones y tiempos de incubación de ambos detergentes sobre las proteínas de las envolturas celulares de las cepas de Vibrio cholerae seleccionadas. La extracción con el detergente Sarkosil resultó ser la más efectiva, siendo la concentración óptima de 0.55%. Concentraciones superiores llevaban a la solubilización de las bandas mayoritarias de 59-66 K. Este hecho fue también observado por Sciortino y Finkelstein (1983) en sus investigaciones, en las que, como hemos señalado antes, las extracciones se efectuaron a la concentración final del 1%. Sin embargo, dichos autores no modificaron su método limitándose a comentar que estas proteínas se volvían insolubles en Sarkosil si los organismos eran recogidos en fase estacionaria de crecimiento. El Tritón X-100 produjo la solubilización de parte de las proteínas mayoritarias de nuestras cepas y además en muchos casos, las fracciones insolubles en el detergente retenían gran cantidad de bandas minoritarias. Estas observaciones, junto con el hecho de que el

tratamiento con Tritón resultó ser efectivo en el aislamiento de las proteínas de membrana externa de una cepa de Escherichia coli utilizada como control, sugieren de nuevo que las interacciones de las proteínas con los lípidos y el LPS en la membrana de Vibrio cholerae deben ser diferentes de las observadas en las enterobacterias. En nuestro trabajo, el tratamiento con Sarkosil al 0.55% resultó el método de obtención de proteínas de membrana externa más eficaz, especialmente en el caso de las cepas ambientales y, en consecuencia, fue utilizado en el aislamiento de las proteínas de membrana externa.

El análisis del contenido proteico de las envolturas celulares totales de las cepas seleccionadas reveló la existencia de una considerable heterogeneidad entre las mismas, hecho ya observado por Manning y cols. (1982) y Barja y cols. (1987), si bien en nuestro caso la diversidad aparente era mucho mayor, dado el elevado número de cepas estudiadas. Por todo ello se consideró imprescindible el procesamiento de la información de la manera más objetiva posible, con el fin de minimizar las diferencias debidas a posibles errores de interpretación. Para conseguir este objetivo se compararon, además de los geles, los perfiles densitométricos, ya que éstos son cuantificables y permiten una estimación más segura y precisa, tanto de las movilidades relativas de las proteínas problema, como de la cantidad relativa de las mismas. Además, para el cálculo de los pesos moleculares, se incluyeron en todas las electroforesis patrones comerciales de movilidad electroforética conocida, realizándose dos tipos de ajuste. La comparación de las reestimaciones de los pesos moleculares de las bandas conocidas mediante los dos ajustes

matemáticos empleados nos permitió, a la hora de considerar el conjunto completo de datos, conocer de modo aproximado el error de la estima y minimizarlo. Por otra parte, una vez discriminadas las bandas proteicas, se consideró interesante agrupar las cepas con el fin de facilitar la interpretación de los resultados. Si se evalúan las similitudes atendiendo a los datos de presencia/ ausencia de bandas e ignorando la cantidad relativa de las mismas, las cepas quedan distribuidas en cuatro grupos mayoritarios, encontrándose la mayor variabilidad en las proteínas de alto y bajo peso molecular. Es de destacar que las cepas de colección 01 y no 01, utilizadas como control, no quedaron separadas del resto de los vibrios, lo que sugiere la existencia de relaciones entre las cepas ambientales y las de colección, independientemente de su origen.

El tratamiento de las membranas con Sarkosil, aumentó a 19 el número de grupos encontrado, debido fundamentalmente a la pérdida de las bandas proteicas de membrana interna comunes. Del total de bandas proteicas discriminadas en el conjunto de cepas estudiado, sólo se tomaron en consideración aquellas que fueron comunes a más de dos cepas, con el fin de eliminar las posibles bandas minoritarias que, identificadas aisladamente sobre la superficie celular, pudieran representar especies transitorias secretadas por el organismo o proteínas expuestas por alguna célula lisada en los cultivos. En total se han comparado 20 bandas proteicas diferentes entre 82 y 19-18 K, encontrándose que la proteína de membrana externa mayoritaria oscilaba entre 34 y 48 K. En trabajos previos, realizados con proteínas de membrana externa de cepas 01 de colección, se calculó un peso

molecular para la banda mayoritaria que oscilaba entre 37.8 K (Resnik y Berry, 1981), 42-45 K (Manning y cols., 1982; Sciortino y Finkelstein, 1983; Manning y Haynes, 1984) y 48 K (Kabir, 1980, 1983; Kelley y Parker, 1981). Por otro lado, Manning y cols., (1982) observaron que la banda proteica mayoritaria de los vibrios no 01 oscilaba entre 25 y 50 K. En nuestro estudio incluimos una cepa de colección 01 (569B) que había sido utilizada por otros autores. El peso molecular estimado para la proteína de membrana externa mayoritaria fue de aproximadamente 41 K, resultado que es similar al encontrado por Sciortino y Finkelstein (1983) en la misma cepa. Sin embargo, tanto en el resto de las cepas de colección, como en la mayoría de los cepas ambientales, la movilidad relativa de la proteína de membrana externa mayoritaria fue de 37-39 K, valor similar al encontrado por Resnik y Berry (1981) y al de las bandas mayoritarias de otras bacterias gramnegativas, incluyendo tanto miembros del género Vibrio (Buckley y cols., 1981; Crosa y Hodges, 1981; Koga y Kawata, 1983) como bacterias de otros géneros (Sterkenburg y cols., 1984; Nikaido y Vaara, 1985. Lodge y cols., 1986). Las diferencias en la estimación del peso molecular de unos autores a otros han sido sistemáticamente achacadas al uso de diferentes técnicas de aislamiento, medios de cultivo y patrones de pesos moleculares, por los distintos investigadores. Sin embargo, si bien parte de las discrepancias pueden ser explicadas por estos motivos, también hay que considerar que existen diferencias de unas cepas a otras, como pone de manifiesto el presente trabajo al analizar un elevado número en idénticas condiciones de experimentación. Richardson y Parker (1985), utilizando métodos de marcaje de la superficie celular en una cepa 01

de colección, llegaron a demostrar la presencia de 16 polipéptidos diferentes de 110 K, 80 K, 72 K, 70 K, 62 K, 58 K, 52 K, 48 K, 47 K, 46 K, 44 K, 40 K, 34 K, 31 K, 18 K, y 14 K. En nuestro caso, no se visualizaron las bandas de 110 y 14 K, esta última por estar en el límite de resolución del sistema de geles empleado, pero el resto coinciden prácticamente con las detectadas en las fracciones de membranas externas del conjunto de cepas estudiado, junto con proteínas adicionales, no encontradas en el mencionado estudio. Una de estas proteínas es de 28-26 K y se hallaba presente en todas las cepas estudiadas. Manning y Haynes (1984), describieron una proteína que denominaron OmpV y que parece ser la única común entre todas las cepas O1 y no O1 por ellos estudiadas. Dicha proteína tiene un peso molecular de 26.2 K y podría corresponder perfectamente a la proteína que en nuestros geles migró con una movilidad relativa de 28-26 K. Barja y cols. (1987), tras el análisis electroforético de las membranas externas de cepas no O1 ambientales, concluyeron que, aparentemente, la única proteína común a todas las cepas era de aproximadamente 25 K. De lo expuesto se puede concluir que no existe un único patrón proteico asociado con las membranas externas de la especie Vibrio cholerae y que éste es especialmente variable en el caso de que las cepas estudiadas sean ambientales.

Se ha sugerido que las comparaciones entre los patrones proteicos de membrana externa de cepas de una misma especie, pero de distintos orígenes, pueden ser útiles en la discriminación de diferentes clones bacterianos que no podrían ser distinguidos en base a otras características fenotípicas (Buckley y cols., 1981). Hasta la fecha han sido descritos al menos 31 patrones de proteínas de membrana

externa diferentes en cepas de Escherichia coli pertenecientes a un sólo serotipo (Achtman y cols., 1986). Si tenemos en cuenta que el rango de variabilidad es mucho mayor entre los miembros de la especie Vibrio cholerae (Manning y cols., 1982; Manning y Haynes, 1984; Richardson y Parker, 1985; Sciortino y cols., 1985; Barja y cols., 1987), y que las cepas estudiadas pertenecen a serotipos diferentes, el número de patrones distintos encontrados, no parece ser excesivamente alto. Por otra parte, el hecho de que, tanto cepas procedentes de un mismo muestreo, como cepas de agua y plancton de diferentes salinidades, queden dentro del mismo grupo, apoyaría la hipótesis, sugerida en el primer capítulo, de que se trata de una misma población de bacterias, que, dependiendo de las condiciones ambientales, se encuentra en forma libre o asociada al plancton, siendo vertida periódicamente al mar en función del régimen de compuertas.

Se ha realizado un estudio preliminar en cepas seleccionadas, sobre el efecto que el calor y el 2-mercaptoetanol tienen sobre la movilidad de las proteínas de membrana. Schnaitman (1973) fue el primero en observar que la migración de ciertas proteínas de membrana externa de Escherichia coli se ve afectada por la temperatura a la cual la preparación es solubilizada en presencia de SDS. Así, el efecto del calor, produce dos tipos de cambios: i) disociación de oligómeros, ii) cambios conformacionales de polipéptidos simples. En Vibrio cholerae se han descrito, por diferentes autores y en cepas O1, los dos tipos de modificaciones. Richardson y Parker (1985)

encontraron una proteína de 100 K presente en las muestras solubilizadas a 37°C, que demostraron era un oligómero disociable a 100°C en tres proteínas de 110 K, 80 K y 39 K. Sciortino y cols.(1985), hallaron una proteína de 112 K que se disociaba por el calor dando tres proteínas de 48-47 K. Por su parte, Alm y cols. (1986), encontraron en sus cepas una proteína de 35 K, cuya migración era afectada por la T°, de modo que si la muestra se solubilizaba a 37°C, la proteína migraba como un polipéptido de 28 K. En nuestro estudio, las bandas proteicas mayoritarias de 41-37 K (según el grupo) no aparecieron en las muestras solubilizadas a 37°C, así como las proteínas no mayoritarias de 48-46. En su lugar se observaron proteínas de alto peso molecular, lo cual se puede relacionar con los resultados obtenidos por Sciortino y cols. (1985) y Richardson y Parker (1985). Sin embargo, si bien la proteína no mayoritaria de 34 K parecía no estar presente en los extractos calentados a 37°C, no se pudo encontrar la relación entre su desaparición y la aparición de una banda de 28 K, debido al elevado número de bandas presentes en la zona. Lo que más llama la atención es la homogeneidad de las muestras cuando no son calentadas a 100°C, lo que sugeriría que la mayor parte de las diferencias encontradas entre cepas estribaría en la naturaleza de las proteínas oligoméricas, proteínas que en otras especies son de naturaleza porínica (Osborn y Wu, 1980; Dirienzo y cols., 1978; Nikaido y Nakae, 1985; Hancock, 1987). En cualquier caso, demostrar si estas proteínas son o no son porinas, requiere ulteriores estudios. Lo que sí puede afirmarse es que los puentes disulfuro, no parecen jugar un papel significativo en el mantenimiento de la estructura secundaria de las proteínas de membrana externa de las cepas estudiadas, resultado

en concordancia con el encontrado por Richardson y Parker (1985).

El estudio comparado del efecto medio de crecimiento/ edad del cultivo, permite concluir que ambos influyen en la composición en proteínas de la membrana externa de las cepas en estudio, resultado en concordancia con los encontrados por otros autores en ésta y otras especies bacterianas (Aldea y cols., 1980; Kabir, 1980; Sigel y Payne, 1982; Kogo y Kawata, 1983; Sterkenburg y cols., 1984; Wright y cols., 1986). El medio de crecimiento afectó, tanto cualitativa (n° de bandas) como cuantitativamente (cantidad o porcentaje relativo de las mismas) la composición proteica de la membrana externa, mientras que la edad del cultivo sólo influyó produciendo el segundo tipo de cambios. En general, las cepas pudieron dividirse en dos grupos en función de la expresión o no de nuevas proteínas de membrana en medios de cultivo pobres en nutrientes, pero no limitantes. Por otro lado, todas las cepas variaron la cantidad relativa de sus proteínas a lo largo del ciclo vital, pudiéndose agrupar las especies proteicas en función de la respuesta mayoritaria dada:

- Aquellas que aumentaron en porcentaje relativo, a lo largo del ciclo celular. En este grupo se incluyen las de alto peso molecular.

- Aquellas que permanecieron aproximadamente constantes a lo largo del ciclo. En este grupo quedarían incluidas las proteínas de 31 y 34-35 K, la mayor parte de las proteínas mayoritarias más abundantes y las de 66 y 82 K

- Aquellas cuyo porcentaje relativo disminuyó de forma más o menos drástica a lo largo del ciclo celular. Comprende las proteínas

de 48-46 K y 28-18 K. El hecho de que las proteínas de peso molecular comprendido entre 70 y 79 K, aumenten su expresión a lo largo del ciclo puede relacionarse con el efecto limitante en nutrientes que se produce en la fase estacionaria de los cultivos. Ello, unido a que precisamente estas proteínas se expresaron de nuevo o de modo más abundante en medios pobres de cultivo, permite relacionarlas con la captación de nutrientes. Por otra parte, no todas las cepas son capaces de producirlas, en las mismas condiciones, lo que podría tener relación con la variabilidad de necesidades o requerimientos en nutrientes que pueden presentar cepas diferentes de una misma especie para crecer (Schwyn y Neilands, 1987). Resultados similares encontraron Sterkenburg y cols. (1984) en Klebsiella aerogenes. En el apartado siguiente se tratará de la relación entre proteínas de alto peso molecular y crecimiento en condiciones limitantes en hierro.

Por otra parte, los cambios cuantitativos sufridos por las proteínas expresadas en ambos medios a lo largo del ciclo celular pueden relacionarse, además, con variaciones en las propiedades de superficie, como son actividad hemaglutinante e hidrofobicidad.

Como se comentó en el apartado 3, no se conoce la naturaleza exacta del mecanismo de adherencia desarrollado por Vibrio cholerae. Si bien se ha sugerido que algunos componentes de la membrana externa pueden estar relacionados con la adhesión de las cepas a diferentes tipos de células animales (Kabir y Alí, 1983; Sciortino y cols., 1985), no se han encontrado referencias sobre estudios en que se demuestre de una forma más directa este tipo de relación. Faris y cols. (1982) propusieron que estructuras similares a pili actuarían

como mediadoras del proceso, mientras que Finkelstein y Hanne (1982b), emitieron la hipótesis de que la asociación del vibrio con los diferentes sustratos sería el resultado de una interacción más directa entre ambas superficies. En nuestro estudio, los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con esta última idea y, además, el hecho de que la actividad hemaglutinante e hidrofóbica se pierda por calentamiento a 80 °C, nos permite suponer que los componentes de superficie implicados en el proceso, habrían de ser de naturaleza proteica. No ha podido relacionarse, sin embargo, la expresión de una actividad hemaglutinante concreta con la posesión de un patrón de proteínas de membrana específico, ya que cepas con distintos tipos de actividad eran encontradas en los mismos grupos. Sin embargo, el estudio efectuado a lo largo del ciclo celular, nos permite relacionar varias proteínas con las propiedades de superficie de las cepas. En primer lugar, se da un paralelismo importante entre la hidrofobicidad de los vibrios estudiados, medida por el SAT, y la expresión de la proteína de 28 K, cuya cantidad es mayor en NB y cuyo porcentaje decrece significativamente a lo largo del ciclo celular. En segundo lugar, en lo que respecta a los cuatro tipos de actividades hemaglutinantes encontrados, RHA, MSHA, FSHA y GSHA, sólo ha podido relacionarse claramente una proteína de 48 K y la actividad RHA de las cepas, de modo que su proporción relativa es mucho mayor en las cepas altamente hemaglutinantes (representantes del grupo XVIII) y disminuye significativamente en las cepas que no presentan este tipo de actividad. El hecho de que esta proteína siga en muchas cepas un comportamiento bastante similar al de la proteína de 28 K, a lo largo del ciclo celular, podría explicar la relación entre hidrofobicidad de

superficie y actividad RHA mencionada en el apartado 3 del trabajo. En lo que respecta al resto de actividades hemaglutinantes descrito, los datos de variaciones del perfil proteico, no son lo suficientemente concluyentes como para relacionar claramente una proteína con una hemaglutinina concreta. Sin embargo, sí se ha observado a lo largo del ciclo vital un comportamiento paralelo entre éstas y las proteínas de 34-39 K, pareciendo existir una cierta variabilidad en función de la cepa en estudio. Una situación similar ha sido definida en Neisseria gonorrhoeae, donde se ha demostrado la relación entre una proteína de membrana externa, cuyo peso molecular varía en función de la cepa estudiada, y la actividad de adhesión a las células epiteliales del tracto urogenital (Heckels, 1982). En cualquier caso, la variabilidad encontrada en la composición proteica de las envolturas externas de las cepas en estudio, está en concordancia con los múltiples tipos de actividades hemaglutinantes expresados quedando la relación exacta entre estructura y función pendiente de futuros estudios.

5. SISTEMA DE CAPTACION DE HIERRO DE ALTA AFINIDAD: SIDEROFOROS Y PROTEINAS DE MEMBRANA RELACIONADAS

5.1. INTRODUCCION

El hierro es un elemento esencial en el metabolismo energético de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, ya que forma parte integral de las moléculas de enzimas que participan en la cadena de transporte electrónico (citocromos) y de otros enzimas imprescindibles para el crecimiento microbiano, como son; peroxidasas, catalasas, algunas formas de superóxido dismutasas, los complejos enzimáticos nitrogenasa y ribonucleótido reductasa etc. (Torres, 1985). A pesar de ser uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, en condiciones aeróbicas se encuentra en forma oxidada (ión férrico), la cual presenta una elevada afinidad por los aniones hidroxilo con los que forma polímeros de hidróxido férrico (FeOOH) altamente insolubles ($K_s=10^{-38}$) (Bullen, 1981). Esto hace que la solubilidad del Fe(III) en condiciones aeróbicas y a pH 7.0 sea de 10^{-15} M, lo que significa que se encuentra en los ecosistemas naturales, en forma libre y accesible a los microorganismos, a una concentración varias órdenes de magnitud por debajo de la necesaria para su crecimiento y supervivencia (Cooper y cols., 1978; Raymond y Carrano, 1979). En consecuencia, los microorganismos han desarrollado un sistema de captación, denominado de "alta afinidad", que solubiliza y transporta el ión férrico al interior de la célula. Dicho sistema incluye la producción y excreción al medio de agentes quelantes de

bajo peso molecular (sideróforos) y la síntesis de los receptores de membrana celular específicos del complejo Fe(III)-sideróforo, así como de todas aquellas proteínas involucradas en el proceso de transporte e interiorización del Fe(III) (Neilands, 1981, 1982; Crosa, 1984).

a) Los sideróforos (del griego sideros; hierro y phorein; transportar) son compuestos producidos por gran variedad de microorganismos, cuyo peso molecular, en los casos caracterizados (Neilands, 1981), está comprendido entre 500 y 1500 daltons. Se unen específicamente al hierro con una estequiometría de reacción 1:1, mediante el establecimiento de seis enlaces de coordinación entre el número correspondiente de átomos de oxígeno y la molécula de hierro (Monzik y Crumbliss, 1979). Dado que los átomos de oxígeno pueden considerarse como bases fuertes y que el hierro se comporta como un ácido fuerte, la interacción que se establece entre ellos es tan intensa que se forman complejos con constantes de estabilidad del orden de 10^{23} - 10^{52} , según el tipo de sideróforo del que se trate (Neilands, 1981). La mayor parte de sideróforos conocidos pueden agruparse en dos clases principales, en función del grupo al que pertenezcan los oxígenos implicados en la formación de los enlaces de coordinación con el hierro (Figura 5.1):

- Fenolatos-catecolatos; Los enlaces se establecen entre el Fe(III) y los oxígenos del ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHBA).

El ejemplo más característico es el del sideróforo cíclico producido por las bacterias entéricas Escherichia coli y Salmonella typhimurium, denominado enterobactina (trímero cíclico de 2,3-dihidroxibenzoilserina)(Figura 5.1) (Salama y cols., 1978).

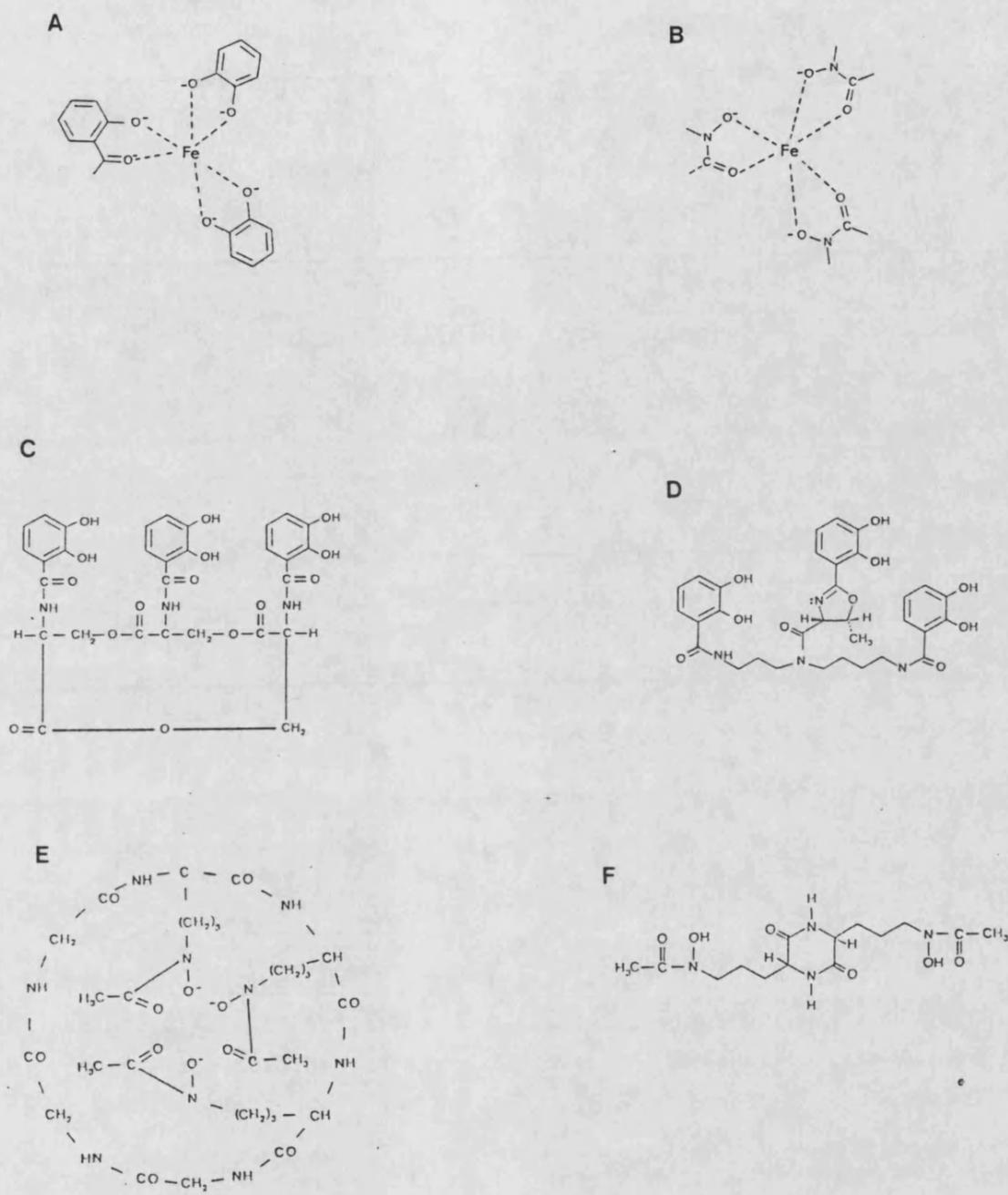


FIGURA 5.1. Grupos implicados en el establecimiento de los enlaces de coordinación con el Fe(III): A, grupos fenolato-catecolato; B, grupos hidroxamato. Ejemplos de sideróforos de los dos tipos conocidos: C, enterobactina y D, agrobactina (tipo fenolato-catecolato); E, ferri-cromo y G, ácido rodotorúlico (tipo hidroxamato).

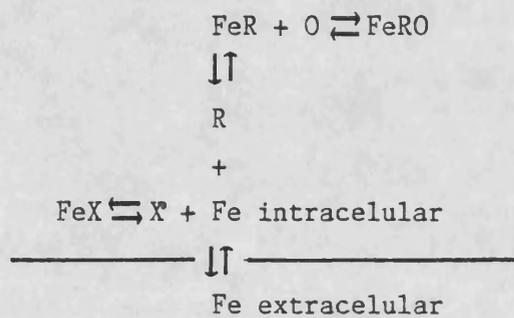


FIGURA 5.2: Modelo de regulación en Escherichia coli K-12: R;Proteína represora: O;operón: Fe;hierro correpresor: X;proteína de almacenamiento: FeRO; complejo operador-represor-correpresor no transcrito. (Neilands, 1981)

- Hidroxamatos; Los enlaces se establecen entre el Fe(III) y los oxígenos de grupos hidroxamatos. Como ejemplo tenemos los ferricromos de bacterias y hongos, los derivados del ácido rodotorúlico y la aerobactina de Escherichia coli (Figura 5.1) (Neilands, 1981; Crosa, 1984).

Ambos tipos de sideróforos difieren en sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, productos de hidrólisis, absorción máxima, estructura...) y en sus constantes de estabilidad con el ión Fe^{+++} , siendo generalmente mayores las de los sideróforos de tipo fenolato-catecolato (Neilands, 1981). Ambos son químicamente detectables por ensayos colorimétricos que se utilizan ampliamente en la caracterización preliminar de estos compuestos (Arnou, 1937; Atkin y cols., 1970). Sin embargo, recientemente se han descrito sideróforos como el ácido mugineico y la rizobactina, que, al utilizar grupos amino, alcohol y carboxilato como centros de unión para el Fe(III), no pueden ser detectados mediante este tipo de procedimientos y en consecuencia, ser adscritos a uno u otro grupo en una caracterización preliminar (Schwyn y Neilands, 1987).

b) Los receptores son proteínas de membrana externa de alto peso molecular que se unen específicamente al complejo Fe(III)-sideróforo y lo transportan al interior de la célula, mediante un proceso activo dependiente de energía y, por tanto, del producto del gen tonB (Nikaido y Nakae, 1985). En Escherichia coli y Salmonella typhimurium se han descrito algunas proteínas (IRMPs) cuya síntesis es regulada por el nivel de Fe(III) en el medio, y que, además de participar en este proceso, actúan como puntos o zonas de adhesión a

fagos, antibióticos y bacteriocinas. Sólo en muy pocos casos ha podido demostrarse el papel de estas proteínas en el transporte activo del hierro (Neilands, 1982). En la Tabla 5.1 se resume el estado actual de conocimientos en la especie Escherichia coli.

Se postula que en un ambiente deficiente en hierro, la síntesis de sideróforos e IRMPs relacionadas oscila entre estado de inducción- estado de represión hasta satisfacer los requerimientos en Fe(III) celulares (Neilands, 1982).

En la Figura 5.2 se esquematiza el modelo de transporte de hierro de alta afinidad propuesto para Escherichia coli K12 (Neilands, 1981). Según el modelo, el receptor de membrana y los enzimas implicados en la síntesis del sideróforo están codificados por cinco genes situados en un mismo operón, el cual está regulado por el nivel de hierro intracelular.

Cuando la concentración de Fe(III) en el interior de la célula es suficiente, éste se encuentra almacenado en forma combinada con una proteína supuestamente similar a la ferritina, aunque no de tipo hemínico. Parte del metal, además, se combina con una proteína represora dando un complejo con elevada afinidad por la región operadora de los genes anteriormente mencionados. Cuando la concentración de Fe(III) intracelular disminuye suficientemente, la forma libre del represor es la que domina, dándose la transcripción de los genes y, por tanto, la inducción del sistema de transporte de alta afinidad (Klebba, 1982; Neilands, 1982). De esta forma se produce la síntesis coordinada de los enzimas que catalizan la formación del

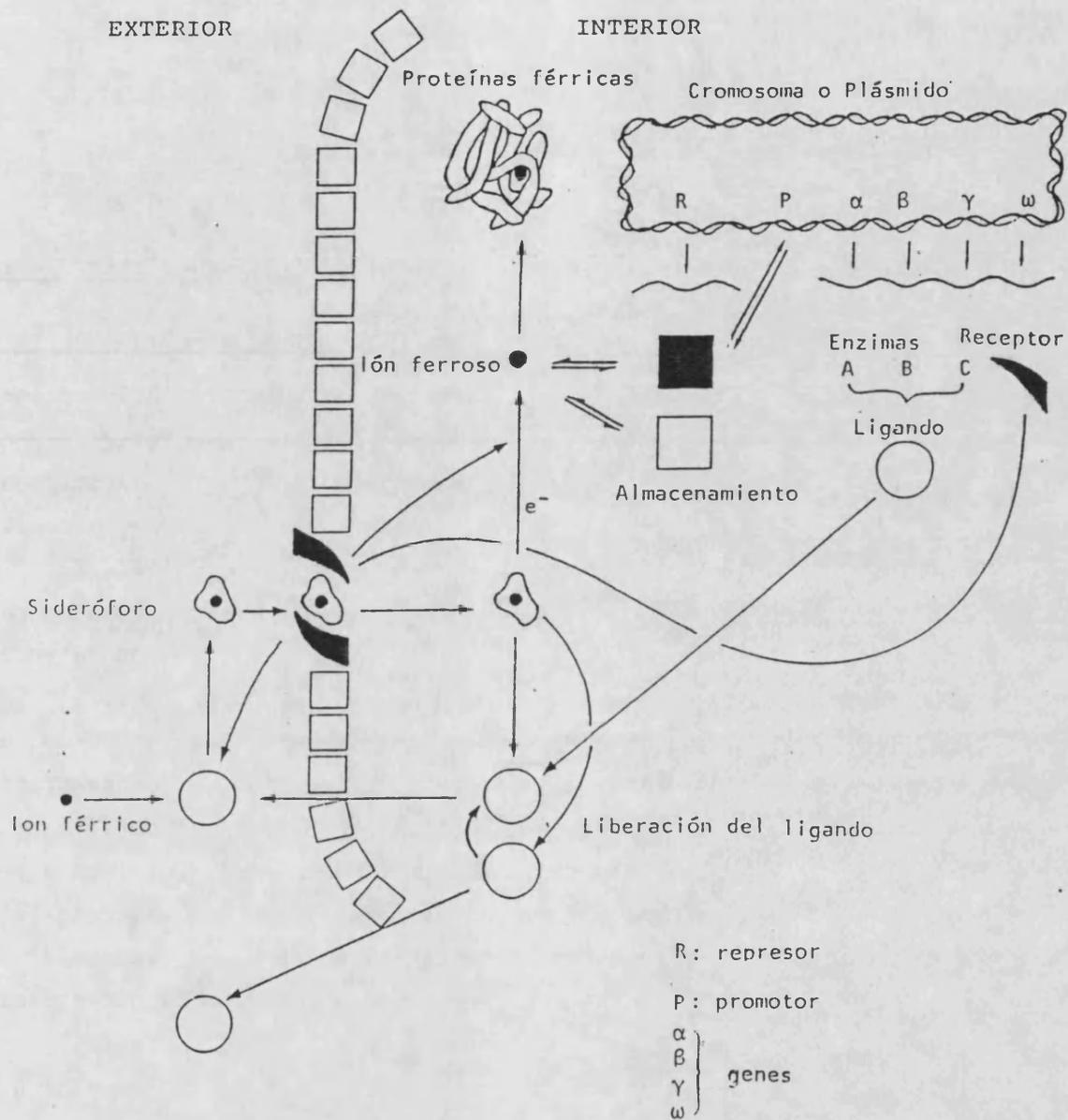


Figura 5.3. Modelo de transporte de hierro por el sistema de alta afinidad (Neilands, 1982) con modificaciones minoritarias (Torres, 1985).

TABLA 5.1. Proteínas de la envoltura celular de Escherichia coli K-12 relacionadas con el hierro (Neilands, 1982).

Proteína (peso molecular)	Gen	Función	Propiedades
90 K	-	Almacenamiento	Reprimida a baja concentración de Fe(III)
83 K	-	?	Inducida a baja concentración de Fe(III)
FepA (81 K)	fep	Receptor de la Enterobactina férrica	Inducida a baja concentración de Fe(III)
FecA (80.5 K)	fecA	Receptor del citrato-Fe(III)	Inducida por el citrato-Fe(III)
FhuA (78 K)	fhuA	Receptor del ferricromo	Inducida a baja concentración de Fe(III)
Cir (74 K)	cir	?	Inducida a baja concentración de Fe(III)
TonB (36 K)	tonB	Transporte del sideróforo a la membrana interna	No regulada por la concentración de hierro
25 K y 18 K	?	?	Reguladas por el nivel de hierro en el medio

quelante y de las IRMPs. El sideróforo se libera al exterior y se combina con el Fe(III) extracelular formando un complejo que es reconocido por el receptor a nivel de membrana externa. La molécula sideróforo-Fe(III) es altamente estable, por lo que el desacoplamiento del Fe(III) requiere la actuación combinada de elementos genéticos adicionales y es dependiente del ATP. Recientemente se ha demostrado que en el caso de la enterobactina, el complejo hierro-sideróforo se acumula en el espacio periplásmico (Ecker y cols., 1986; Matzanke y cols., 1986), y el hierro es liberado mediante un mecanismo que implica la reducción de Fe(III) a Fe(II), bien por la acción de una reductasa, bien por protonación reductiva (Lee y cols., 1985). Otros autores proponen que la liberación del hierro se produce por degradación parcial de la enterobactina gracias a la acción de una esterasa (Greenwood y Luke, 1978). En el primer caso, el sideróforo intacto puede volver al exterior atravesando la membrana y repetir el ciclo de acontecimientos descrito. Finalmente, cuando la célula ha satisfecho sus necesidades en Fe(III), se incrementa su nivel intracelular y se produce su combinación con la proteína que actúa como represora del sistema. Un esquema del modelo se presenta en la Figura 5.3.

Los vibrios exhiben una considerable diversidad en su capacidad para utilizar y secretar compuestos quelantes de Fe(III) (Andrus y cols., 1983), siendo algunas cepas de Vibrio vulnificus productoras de sideróforos de los dos tipos descritos (Simpson y Oliver, 1983). Vibrio cholerae es una bacteria que puede vivir y desarrollarse en gran multiplicidad de nichos ecológicos. Como microorganismo autóctono de aguas, ha de vivir en un medio donde el

hierro se encuentra en forma insoluble y por tanto no asimilable. Como patógeno intestinal, ha de multiplicarse en un hábitat donde el Fe(III) se halla combinado con proteínas tales como la transferrina de la sangre y la lactoferrina de las secreciones, dando complejos tan sumamente estables que reducen su solubilidad a 10^{-18} M. Payne y Finkelstein (1978) propusieron que, en condiciones de limitación en hierro, Vibrio cholerae O1 desarrolla un sistema de alta afinidad que comprende un sideróforo de tipo fenolato-catecolato y proteínas relacionadas. Ha sido parcialmente caracterizado el sideróforo producido por una cepa de origen clínico, denominándosele vibriobactina (Griffiths y cols., 1984). Sin embargo su papel durante la infección no está bien definido (Sigel y cols., 1985). No se han encontrado trabajos relativos a la producción de sideróforos por cepas no O1 de origen ambiental, aunque estos microorganismos han de desarrollar, necesariamente, un sistema de captación del Fe(III) que les permita sobrevivir en los ecosistemas donde éste se encuentre en condiciones limitantes.

5.2. MATERIAL y METODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas de Vibrio cholerae de origen ambiental, seleccionadas para el estudio, y las procedentes de colecciones de cultivo aparecen en la Tabla 5.2. Las cepas de otras especies, utilizadas como controles en los ensayos, así como su origen aparecen

recogidas en la Tabla 5.3. Previamente a todos los ensayos que se indican, las cepas se inocularon, a partir del medio de conservación, en tubos conteniendo 10 ml de medio mínimo con casaminoácidos (CM9) y se incubaron a 28 y 37°C (según la cepa) durante 18 h.

Crecimiento en condiciones de limitación en hierro:
concentraciones mínimas inhibitorias de EDDA.

Se ensayó la capacidad de las cepas para crecer en condiciones de limitación en hierro, mediante siembra, en la proporción 1/100, de cultivos de 18 h en CM9, en matraces conteniendo 10 ml del mismo medio, suplementado con ácido etilén-diamino-dihidroxifenil-acético (EDDA) a la concentración final de 10 μ M. La incubación se efectuó a 37°C durante 18-36 horas y en agitación (200 rpm). El EDDA, agente quelante ampliamente utilizado en la inducción de las condiciones de limitación en hierro (Miles y Khimji, 1975; Payne, 1980; Wright y cols., 1986; Schwyn y Neilands, 1987), se preparó previamente en soluciones stock, esterilizadas por filtración, a la concentración de 5 mM (pH 7-7.5) y se almacenó a 4°C en oscuridad. Una vez comprobada la capacidad de crecimiento de las cepas en estas condiciones, se determinó la concentración mínima inhibitoria de EDDA, tanto en medio líquido como en medio sólido (CM9 + 1.2% agar), mediante siembras consecutivas de los cultivos en medio suplementado con concentraciones crecientes de EDDA. El volumen de inóculo utilizado fue del 1/100 en el primer caso y de 10 μ l en el segundo, y las incubaciones se efectuaron a 37°C con y sin agitación. Una vez conocidas las CMI's de

EDDA; se seleccionaron cepas representativas de los distintos rangos establecidos y cada una de ellas se sembró en dos matraces conteniendo 100 ml de CM9 y 100 ml de CM9 suplementado con EDDA a 1/5 de su CMI. La incubación tuvo lugar en agitación (200 rpm) y a 37°C, realizándose un seguimiento de su crecimiento mediante la toma periódica de 0.5 ml de muestra, cuya absorbancia a 660 nm se determinó en un espectrofotómetro Beckman DU-7.

Detección de sideróforos.

Se ensayó mediante un nuevo método descrito por Schwyn y Neilands (1987), el cual utiliza el colorante cromoazurol S (CAS) junto con el bromuro de hexadecil trimetilamonio (HDTMA) para formar un complejo estable que cambia de color en presencia o ausencia de hierro. En el método se describen dos variantes: a) detección en medio sólido y, b) detección en los sobrendantes de cultivo. En el primer caso el reactivo se incorpora directamente en el medio de cultivo, en el segundo, éste se prepara por separado y se añade a los sobrenadantes de las cepas crecidas, según se indica a continuación. Todo el material de vidrio utilizado se lavó con HCl 6M y se enjuagó con agua bidestilada y desionizada. Asimismo, se utilizó agua de las mismas características en la elaboración de los medios de cultivo y en la preparación de las soluciones y reactivos (véase el último apartado de Material y Métodos). En cada caso se incluyeron tanto controles positivos como negativos, que se consiguieron cultivando de modo paralelo las cepas conocidas como productoras y mutantes no

productores (Tabla 5.3).

a) Detección de sideróforos en medio sólido. Se realizó mediante siembra en superficie de placas de agar azul (AA), a partir de placas de agar MM9 crecidas durante toda la noche. La lectura se efectuó a las 18 y 36 horas detectándose la producción de sideróforo por cambio de coloración alrededor de las colonias. Con el fin de realizar una estimación más objetiva y comparable de la producción de compuestos quelantes de hierro por parte de las cepas en estudio, se calculó en cada caso, como media de dos determinaciones independientes, la relación entre el diámetro de halo producido y el diámetro colonial (Hsu y cols., 1981).

b) Detección de sideróforos en medio líquido. Dado que la adición de agentes quelantes al medio de cultivo interfiere en la sensibilidad del método (Schwyn y Neilands, 1987), las cepas se incubaron en MM9 (CM9 bajo en fosfatos) exento de Fe(III), de la forma que se indica en el anexo del capítulo, y medio de Dye (Torres y cols., 1986) modificado por nosotros del siguiente modo:

- Se tamponó con TrisHCl 50 mM para evitar la variación del pH a lo largo del ciclo celular, puesto que ésta interfiere en la producción de sideróforos (Schwyn y Neilands, 1987).

- El pH fue ajustado al óptimo (6.8) descrito por Schwyn y Neilands (1987).

- Se sustituyó el glicerol, utilizado como fuente de carbono en el medio original, por succinato sódico, por las razones que se indican en el correspondiente apartado de Resultados.

El medio de Dye modificado se considera mínimo en hierro porque su contenido en este elemento, calculado a partir de las impurezas férricas de sus componentes, es inferior a 0.1 ppm (Torres, 1985).

Cultivos de 18 h de las cepas, se inocularon en la proporción 1/100 en el mismo medio con y sin $10\mu\text{M}$ de FeCl_3 , para constatar la inhibición del crecimiento en ausencia de Fe(III) . Cuando las células alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento, se mezclaron 0.5 ml de sobrenadante de cultivo (18 h) con 0.5 ml de solución CAS y se preparó paralelamente la mezcla de referencia (0.5 ml de medio no inoculado + 0.5 ml de solución CAS). Una vez alcanzado el equilibrio, visible por cambio de coloración, se midió la absorbancia a 630 nm y se cuantificó la producción de sideróforos mediante la relación A/A referencia (630 nm) (Schwyn y Neilands, 1987). Si el viraje se produce muy lentamente (más de 12 h), la reacción puede acelerarse sustituyéndose la solución CAS por la solución "CAS shuttle" (CASS). En este último caso la lectura a 630 nm debe efectuarse en un periodo no superior a 6 h, dado que por encima de este intervalo se produce la precipitación del colorante.

Se realizó un análisis de regresión entre los datos cuantitativos, sin transformar, obtenidos por uno y otro método, mediante el uso del programa de regresión lineal 2R del paquete estadístico BMDP

Espectros de absorción y detección de sideróforos de tipo hidroxamato.

Las cepas se cultivaron en medio de Dye modificado, en presencia y en ausencia de Fe(III) ($10\mu\text{M FeCl}_3$) a 37°C hasta alcanzar la fase estacionaria. El seguimiento del crecimiento bacteriano en este medio se realizó por medida de la absorbancia a 600 nm, ya que a esta longitud de onda las sustancias que componen el medio de cultivo y las liberadas por las bacterias, no muestran absorbancia (Torres, 1985). Se obtuvieron los espectros de absorción de los sobrenadantes de los cultivos frente a los correspondientes medios sin inocular, utilizados como blancos, en un espectrofotómetro Beckman DU-7. Asimismo, se realizó el espectro de absorción de los sobrenadantes de las cepas crecidas en condiciones de limitación de hierro, mezclándose, inmediatamente antes de la medida, 1 ml de cultivo (libre de células) con 1 ml de solución de perclorato férrico 5mM en 0.14 M de ácido perclórico. La presencia de hidroxamatos en el sobrenadante se detecta por el cambio en la A a 480 nm y, paralelamente, por viraje de la coloración de la mezcla a marrón rojizo (Atkin y cols., 1970).

Bioensayos.

Se utilizaron para detectar la producción y secreción, por parte de las cepas en estudio, de compuestos transportadores de Fe(III) biológicamente activos, es decir, capaces de estimular el crecimiento de cepas no productoras, pertenecientes tanto a la misma

como a otras especies.

Las cepas indicadoras utilizadas fueron de dos tipos:

- microorganismos incapaces de sintetizar sideróforos pero que expresan los receptores de membrana correspondientes, pudiendo utilizar compuestos químicamente similares producidos por otras cepas. Se trata de los mutantes de Salmonella tiphymurium enb1 y enb7 (Pollack y cols., 1970) así como de la cepa de Vibrio anguillarum 775 curada (Crosa, 1980b). Esta última carece del plásmido pJM1 y en consecuencia es incapaz de sintetizar tanto la anguibactina como su receptor, sin embargo sí sería capaz de producir los receptores del segundo sistema de captación de hierro propuesto por Lemos y cols. (1987) para V. anguillarum.

- cepas de Vibrio cholerae seleccionadas como no productoras con el método de Schwyn y Néilands (1987) y cepas de Vibrio cholerae productoras, cuya capacidad de crecimiento fue inhibida mediante el uso de EDDA a la CMI correspondiente. En este último caso se seleccionaron las cepas de CMIs más bajas con el fin de evitar interferencias con las cepas cuya producción de sideróforos activos se ensaya.

Se incluyeron en los ensayos cepas pertenecientes a distintas especies del mismo género y géneros afines (Tablas 5.6 y 5.7) al objeto de comprobar si eran capaces de estimular, o ser estimuladas por el crecimiento de las cepas de Vibrio cholerae no 01 utilizadas como indicadoras y productoras respectivamente.

Los cultivos de las cepas indicadoras y cepas a ensayar se

obtuvieron de la forma siguiente: Las cepas indicadoras se sembraron en CM9 y se incubaron durante toda la noche a su temperatura óptima de crecimiento (37°C para las cepas de Vibrio cholerae y Salmonella tiphymurium, y 28°C para el resto de las cepas). A continuación, se efectuó una resiembra en el mismo medio y los cultivos se incubaron en las mismas condiciones hasta que las células alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento. Por otro lado, las cepas a ensayar se sembraron en placas de agar CM9 y se incubaron a su temperatura óptima durante 18 h.

Asímismo, se preparó CM9 agar suplementado con la CMI de EDDA correspondiente a la cepa indicadora, que fue almacenado a 4°C 24 h antes de su uso.

El bioensayo se realizó mediante inclusión de 0.2 ml de cultivo de cepa indicadora en agar CM9 suplementado con EDDA, fundido y enfriado previamente a 44°C y, una vez solidificada la mezcla, se sembraron en superficie las cepas en las que se quería determinar la producción de sideróforos. En estas condiciones, la concentración de EDDA inhibe el crecimiento de la cepa indicadora y este efecto se invierte en presencia de sideróforos afines, difundidos en el agar a partir de las cepas productoras estimuladas en estas condiciones. En todos los experimentos se sembró en superficie, de la forma anteriormente descrita, cepas control productoras (Vibrio anguillarum RV22, 775 y Salmonella tiphymurium LT2) y no productoras (Salmonella tiphymurium enb1 y enb7, Vibrio anguillarum 775 curada). Las placas se examinaron tras 18-36 h de incubación a 28°C y 37°C, dándose como resultado positivo la aparición de zonas de crecimiento de la cepa indicadora alrededor de las colonias.

Análisis de las proteínas de membrana.

Se estudió la inducción de proteínas de membrana en condiciones de limitación de hierro mediante comparación de los patrones electroforéticos de las cepas crecidas en CM9, CM9 + 10 μM de FeCl_3 y CM9 suplementado con 1/5 de la CMI de EDDA correspondiente. El procedimiento seguido en la obtención de los extractos de membrana total y externa así como en su análisis electroforético, se describe en el apartado de Material y Métodos del capítulo 4. Asimismo se analizó el perfil proteico de cepas seleccionadas crecidas a concentraciones crecientes (1/5, 2/5 y 3/5 de su CMI) de EDDA. En todos los casos, se compararon las densitometrías correspondientes a una misma cepa crecida en las distintas condiciones de cultivo mencionadas.

Medios de cultivo, reactivos, productos y procedimientos

- Medios utilizados en el crecimiento de las cepas

a) Medios generales

Medio CM9 (Maniatis y cols., 1982)

Descrito en el anexo a Material y Métodos del capítulo 4.

Agar CM9

Mezclar las soluciones previamente esterilizadas de la manera descrita en la preparación del M9:

Sales M9 10X	10 ml
Glucosa 50%	1 ml
Casaminoácidos 20%	1 ml
CaCl_2 10 mM- MgSO_4 100mM	0.1 ml

Añadir 1.5 g de agar bacteriológico disuelto en 87.9 ml de agua destilada en condiciones de esterilidad.

b) Medios mínimos en hierro

Medio MM9 (Schwyn y Neilands, 1987)

Medio CM9 con contenido en fosfatos reducido a 0.03% tamponado con Tris-HCl 50 mM pH 6.8.

Medio MM9 exento de hierro

Medio MM9 preparado a partir de las soluciones patrón de glucosa y casaminoácidos (Difco) desferradas por extracción con 8-hidroxiquinoleína al 3% (p/p) en cloroformo.

Medio de Dye (Torres y cols., 1986) modificado

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.13%
KCl	0.026%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.026%
Succinato sódico (Merck)	1%

El medio se tampona con Tris-HCl 50 mM a pH 6.8

Esterilización: 121°C, 20 min.

Agar MM9

Mezclar las soluciones previamente esterilizadas de la manera descrita en la preparación del M9:

Sales MM9 10X	10%
Glucosa 50%	1%
Casaminoácidos 20%	1%
CaCl_2 10 mM-MgSO ₄ 100mM	0.1%

Añadir 1.5 g de agarosa tipo II (Sigma) disuelta en 87.9 ml de agua destilada en condiciones de esterilidad.

Agar azul (AA) (Schwyn y Neilands, 1987)

Agua bidestilada	75 ml
Solución de sales MM9 10X	10 ml
PIPES	3.02 g
Solución de NaOH 50%	1.2 g
Agarosa tipo II (Sigma)	1.5 g
pH 6.8	

Esterilizar 121 °C, 20 min.

Añadir en condiciones estériles

Glucosa 50% 1 ml

Casaminoácidos 20% 1 ml

CaCl₂ 10 mM + MgSO₄ 100mM 0.1 ml

Estas tres últimas soluciones esterilizadas por filtración. Añadir lentamente y en agitación 25 ml de solución CAS-HDTMA II y verter en placas. Este medio se utiliza en la detección de sideróforos en medio sólido.

- Reactivos y productos

- a) Implicados en la detección de sideróforos (Schwyn y Neillands, 1987)

Cromo azurol S (CAS) (Fluka Chemical Company)

Bromuro de hexa-decil-trimetil-amonio (HDTMA) (Fluka Chemical Co.)

Piperazina anhidra (Sigma)

Acido 5-sulfosalicílico (Sigma)

Pipes (libre de ácido)(U.S. Biochemical Corporation)

- b) Implicados en la obtención de membranas y en su análisis electroforético

Descritos en el apartado correspondiente de Material y Métodos del capítulo 4.

- c) Utilizados en la captación del Fe(III) contenido en los medios de cultivo

Acido etilén-diamino-dihidroxifenil-acético (EDDA) (Sigma)

8-hidroxiquinolefina (Merck).

- Soluciones

- a) Soluciones a añadir a los medios de cultivo

Solución patrón de EDDA (5 mM)

EDDA 1.1801 g

agua bidestilada 75 ml

Añadir NaOH 1N hasta su completa disolución y aforar

con agua bidestilada a 100 ml. Esterilizar por filtración y guardar en oscuridad a 4°C. Se utiliza en la inducción de las condiciones mínimas en hierro.

Solución patrón de Cl_3Fe (10mM)

$\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.27 g
agua destilada	100 ml

Esterilizar por filtración

Se utiliza en la reversión de las condiciones de limitación en hierro.

b) Soluciones empleadas en la detección de sideróforos (Schwyn y Neilands, 1987)

Todas las soluciones se preparan con agua bidestilada

Solución CAS-HDTMA I: usada en la detección de sideróforos en sobrenadantes de cultivo

Solución A: HDTMA 10 mM

Solución B: $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM + ClH 10 mM

Solución C: CAS 2mM

Solución D: HCl 12 M

Solución E: 4.307 g de Piperazina en 20 ml de agua.

En un matraz aforado se vierten 6 ml de sol. A, 1.5 ml de sol. B y 7.5 ml de sol. C. Paralelamente se mezcla la sol. E con 6.25 ml de sol. D y se añade al matraz aforándose la mezcla a 100 ml con agua bidestilada.

Solución CAS-HDTMA II: usada en la detección de sideróforos en medio sólido

Solución F: 60.5 mg de CAS en 50 ml de agua

Solución G: sol F + 10 ml de sol. B

Solución H: 72.9 mg de HDTMA en 40 ml de agua

Añadir lentamente y agitando la sol. G a la sol. H

Esterilización: 120°C, 20 m.

Solución CAS "shuttle" (CASS): usada para acelerar la reacción

Solución CAS-HDTMA I + ácido 5-sulfosalicílico 4 mM

La preparación se guarda en oscuridad.

5.3. RESULTADOS

Crecimiento en condiciones de limitación en hierro: CMI de EDDA.

Todas las cepas de Vibrio cholerae ensayadas fueron capaces de crecer en las condiciones de limitación de hierro impuestas por el agente quelante EDDA a la concentración final de 10 μM . Seguidamente se determinó la mínima concentración de EDDA que inhibía el crecimiento bacteriano, mediante siembra en presencia de concentraciones crecientes de EDDA. Para obtener un valor reproducible, los ensayos se efectuaron por duplicado en medio líquido y las CMI's obtenidas se confirmaron mediante siembra en agar CM9 suplementado con la cantidad de EDDA que había resultado inhibitoria. Los valores estimados para las 146 cepas estudiadas oscilaron entre 2000 500 y 15 5 μM , existiendo una sola cepa que no creció a ninguna de las concentraciones ensayadas (8021 NCTC). En la Tabla 5.2 los vibrios se agrupan en función de su origen y de las CMI's obtenidas. En general, las cepas ambientales resistieron concentraciones de EDDA más elevadas que las cepas de origen clínico, a excepción de la 11195 ATCC cuya CMI se encontró dentro de los rangos más altos estimados. Esta cepa, al igual que los vibrios ambientales, es de serotipo no O1. Los valores de CMI más frecuentes fueron de 0.350 0.050 y 0.150 0.050, correspondiendo a más del 50% del total de cepas analizadas. Es de destacar que no existieron diferencias en las CMI's de las cepas ambientales en función del origen de la muestra, de modo que se detectaron en los cuatro tipos estudiados (agua dulce, agua de mar,

TABLA 5.2. Grupos de cepas de Vibrio cholerae establecidos en razón de su origen y de su concentración mínima inhibitoria de EDDA (CMI). Asimismo se presenta la frecuencia del grupo con respecto al total de cepas estudiadas.

Cepas constitutivas, de cada grupo	Frecuencia, (%)	Origen	CMI EDDA, mM ^a
72,78,252,57	2.74	agua salobre	2.000(0.500)
152,193,248	2.06	agua dulce	2.000(0.500)
11195 ATCC	0.69	clínico	1.900(0.100)
70A	0.69	plancton mar	1.500(0.100)
94,230,240,242,243	3.42	agua dulce	1.000(0.100)
114A	0.69	plancton lago	1.000(0.050)
267	0.69	agua salobre	0.800(0.010)
73A	0.69	plancton lago	0.750(0.010)
5,178,182,187,189, 192,194,222,239	6.16	agua dulce	0.750(0.050)
71A,83A	1.37	plancton mar	0.700(0.050)
134,195	1.37	agua salobre	0.650(0.050)
210,211,212,214,220,E,D,3,35	6.16	agua dulce	0.650(0.050)
269	0.69	agua salobre	0.550(0.050)
221	0.69	agua dulce	0.490(0.010)

Tabla 5.2 (continuación)

Cepas constitutivas, de cada grupo	Frecuencia, (%)	Origen	CMI EDDA, mM ^a
111,112,114,116,147,142 ₂ ,148, 199,204,154,155,256,257,261, 263,270	10.96	agua salobre	0.350(0.050)
123,161,162,164,165,166,167, 188,192,216,217,218,225,226, 237,11,37	11.64	agua dulce	0.350(0.050)
74A,75A,93A,94A,140A,141A,142A	4.79	plancton lago	0.350(0.050)
84A	0.69	plancton mar	0.350(0.050)
7254 NCTC	0.69	clínico	0.300(0.020)
137,196,197,245,254,258,260, 262,265,266,47	7.44	agua salobre	0.150(0.050)

a. Se indica entre paréntesis la desviación típica de la CMI media del grupo.

plancton de lago, plancton de mar) representantes de los distintos rangos de CMI's encontrados. Asimismo se determinó la CMI de las cepas utilizadas como controles positivos y negativos en los ensayos que se indican a continuación. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.3.

Se ensayó el efecto inhibitor del EDDA sobre el ciclo vital de cepas representativas de los distintos grupos de vibrios establecidos, mediante comparación de las curvas de crecimiento obtenidas por incubación en presencia y ausencia de EDDA. Dado que la CMI de este agente osciló entre amplios márgenes en función de la cepa en estudio, se estandarizó la concentración de EDDA a 1/5 de la CMI, independientemente de su valor. En todos los casos estudiados, el EDDA retardó el crecimiento bacteriano, de forma que, no sólo la fase lag se prolongaba durante más tiempo, sino que, además, la fase estacionaria se alcanzaba mucho más tarde y la densidad máxima de células obtenida era mucho menor. Este efecto inhibitorio resultó ser más o menos drástico en función de la cepa en estudio. En la Figura 5.4 se representan los ejemplos más ilustrativos.

Detección de sideróforos.

Las cepas se sembraron sobre la superficie de placas de agar azul, incluyéndose en todos los casos controles positivos y negativos (Tabla 5.3). El medio lleva incorporado el reactivo CAS-HDTMA, el cual se combina con el Fe(III) dando un complejo ternario de color azul,

altamente estable y, por tanto, inductor de condiciones limitantes en hierro. Cuando la cepa es productora de sideróforos, éstos compiten con el CAS-HDTMA por la posesión del Fe(III), de modo que si la molécula producida tiene "alta-afinidad" por el ión Fe^{+++} , éste se disocia del complejo y se combina con el sideróforo, dándose un cambio en la coloración alrededor de las colonias (Schwyn y Neilands, 1987). En nuestro estudio, el viraje se produjo de azul-verdoso a amarillo anaranjado, respondiendo las distintas tonalidades encontradas a diferencias en el volumen de AA vertido por placa y a pequeñas oscilaciones en el pH final del medio (6.8 ± 0.1). En la Figura 5.5 se presenta un ejemplo, pudiendo apreciarse claramente las diferencias entre las cepas productoras y no productoras. En todos los casos se realizó una estimación objetiva de la producción de sideróforos, calculándose la relación entre los tamaños de los halos y las colonias bacterianas (Hsu y cols., 1981) y comparándose los valores obtenidos para las cepas problema con los detectados para las cepas utilizadas como controles positivos y negativos. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 5.4 y 5.5.

Previamente a la detección de sideróforos en los sobrenadantes de cultivo, hubo de seleccionarse un medio de crecimiento adecuado, ya que en este caso, las condiciones de limitación en hierro no deben ser impuestas por agentes quelantes exógenos. Las cepas se cultivaron en dos medios alternativos: MM9 exento de hierro (Schwyn y Neilands, 1987) y Dye (Torres y cols., 1986) modificado, según se indica en el apartado de Material y Métodos. La razón de la sustitución del glicerol por el succinato sódico estribó en que en el primer caso el

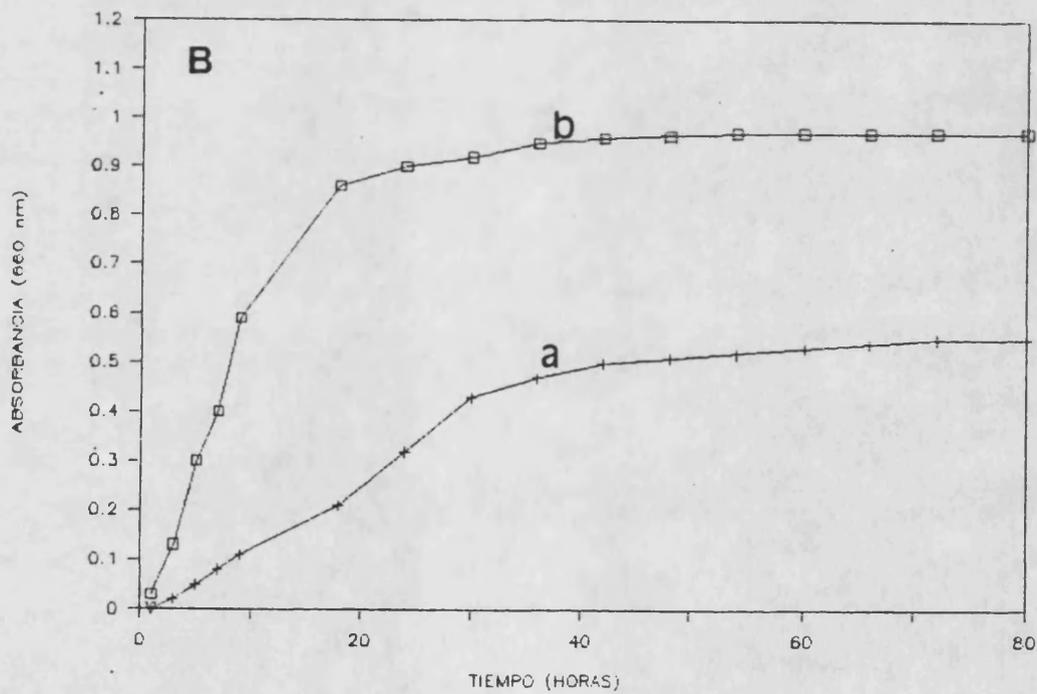
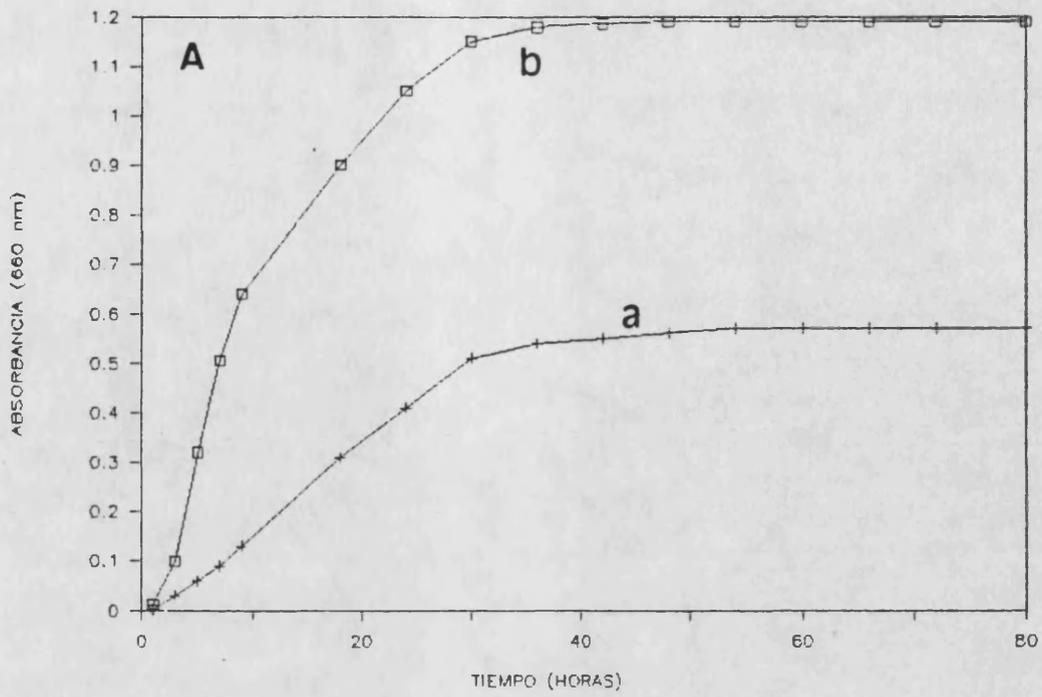


FIGURA 5.4. Curvas de crecimiento de dos cepas de *V. cholerae* ambientales, crecidas en CM9 en presencia (a) y ausencia (b) de EDDA. A, cepa 78; B, cepa 142A.

TABLA 5.3. Origen de las cepas utilizadas como controles en los ensayos, producción de sideróforos y CMI de EDDA expresada en μM . Entre paréntesis se indica el tipo de sideróforo producido.

Cepa	Producción, Sideróforos	Procedencia	CMI, EDDA
<u>Salmonella typhimurium</u> LT2	+(enterobactina)	Dr. M.L. Lemos	800
<u>Salmonella typhimurium</u> enb1	-	Dr. M.L. Lemos	150
<u>Salmonella typhimurium</u> enb7	-	Dr. M.L. Lemos	150
<u>Vibrio anguillarum</u> 775	+(anguibactina)	Dr. M.L. Lemos	50
<u>Vibrio anguillarum</u> 775 curada	-	Dra. A.E. Toranzo	10
<u>Vibrio anguillarum</u> RV22	+(ND)	Dr. M.L. Lemos	800
<u>Vibrio cholerae</u> 569B	+(vibriobactina)	ATCC	75
<u>Escherichia coli</u> 185	+(enterobactina)	Dr. M.L. Lemos	1000

ND, no determinado.

TABLA 5.4. Producción de sideróforos por las cepas de Vibrio cholerae analizadas según las dos variantes del método de Schwyn y Neilands (1987). La detección en medio sólido fue utilizada en todos los casos, mientras que se indican con un (*) las cepas sometidas a la detección en medio líquido.

Cepas	Producción, siderof. ^b	Detección de sideróforos ^a	
		Medio sólido	Medio líquido
114(*),161(*),165(*)	+++	6.38(0.18)	0.194(0.009)
166,167(*),263	+++	5.20(0.42)	0.197(0.008)
37,116(*),156(*)	+++	4.27(0.09)	0.236(0.004)
98A,142A(*)	+++	3.45(0.05)	0.360(0.004)
164,178,192,216,235,239(*),141A	+++	3.02(0.05)	0.373(0.009)
11,172,228,267(*),269(*)	++	2.53(0.07)	0.401(0.018)
E(*),57,111,123,148,189,192 ₂ 194,204,209,240,248,84A	++	2.24(0.08)	0.496(0.002)
47,72,78(*),162,214,217,220,237, 242,258,261,73A,162A,234,121A,76A	++	1.99(0.07)	0.420(0.005)
30,147,142 ₂ ,151,182,187,213,218, 238,244,266,268,74A(*),83A	+	1.78(0.04)	0.543(0.012)
D, 5,18,110,112,152,153,154,155, 160,188,195,199,210,211,219,221, 222,223,225,226,229,230,233,243, 262,265,270,66A,67A,70A,75A,93A, 94A,114A,140A,3661 NCTC	+	1.57(0.07)	ND

Tabla 5.4. (continuación)

Cepas	Producción, siderof. ^b	Detección de sideróforos ^a	
		Medio sólido	Medio líquido
3, 24,33, 35,94,113,127,134,212, 197,224,231,241,246,247,252,254, 260,71A,120A,155A,115A,159A 11195 ATCC	+	1.20(0.02)	ND
137,158,173,190,215,227,236,251, 257,264,7254 NCTC	-	1.10(0.05)	0.892(0.002)
569B ATCC,8021 NCTC	?	NC	NC
170,196,245,256(*),7270 NCTC,	-	NC	0.899(0.003)

a. La cuantificación se realizó: i) medio sólido; diámetro del halo/ diámetro colonial. Los valores corresponden a la media y la desviación típica de cada grupo. Cada valor individual es la media de dos determinaciones independientes. ii) medio líquido; A/A ref (630 nm). Los valores corresponden a la media y desviación típica de las cepas analizadas (*) de cada grupo. Cada valor individual es la media de tres lecturas espectrofotométricas. ND, no determinado; NC, no crecimiento.

b. La estimación se realizó del modo siguiente: +++, diámetro halo/diámetro colonial ≥ 3.00 , A/A ref. ≤ 0.381 ; ++, $1.93 >$ diámetro halo/diámetro colonial < 3.00 , $0.383 >$ A/A ref. < 0.415 ; +, $1.24 <$ diámetro halo/diámetro colonial < 1.93 , $0.531 <$ A/ref. < 0.880 ; -, diámetro halo/ diámetro colonial 1.15 , A/Aref. 0.89 .

crecimiento obtenido era prácticamente nulo (A máxima (660nm) =0.06-0.1). Para ello se realizó un estudio comparativo de las curvas de crecimiento de 5 cepas, utilizándose diferentes intermediarios del ciclo de Krebs (a excepción del citrato) como fuentes de carbono, y seleccionándose el succinato por rendir las tasas de crecimiento más elevadas (Figura 5.6).

Las cepas se sembraron en ambos medios, con y sin FeCl_3 (5 y $10 \cdot \mu\text{M}$), para constatar que efectivamente se trataba de medios mínimos en hierro, encontrándose que la tasa de crecimiento era dependiente de la cantidad de Fe presente (Figura 5.6). Los mejores rendimientos celulares se obtuvieron con el medio de Dye modificado, por lo que se seleccionó para la detección de los sideróforos en los sobrenadantes.

El viraje en la coloración de los sobrenadantes de cultivo, tras la adición de la solución CAS-HDTMA I, se produjo en todos los casos positivos estudiados, incluyendo las cepas control, en un periodo no superior a 15-30 min. Es de destacar que sólo cuando la cepa rendía sobre AA una relación halo/colonia superior o igual a 3, se detectó un cambio en la coloración de azul a naranja, que en el resto de los casos fue a color vino. Se cuantificó la cantidad de sideróforo producido por las cepas estudiadas mediante la relación A/A referencia a 630 nm y se comparó con las obtenidas para las cepas control (Swchyn y Neilands, 1987). Los resultados se reflejan en las Tablas 5.4 y 5.5.

Las estimaciones cuantitativas obtenidas con una y otra variante del método fueron sometidas a un análisis de regresión obteniéndose un coeficiente de correlación de 82%, significativo al

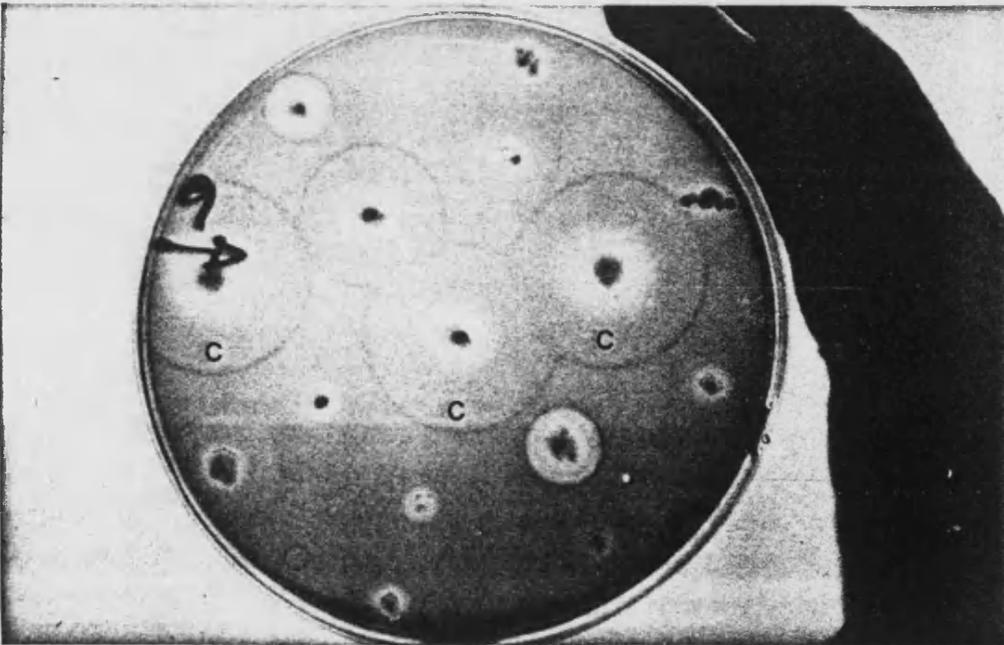
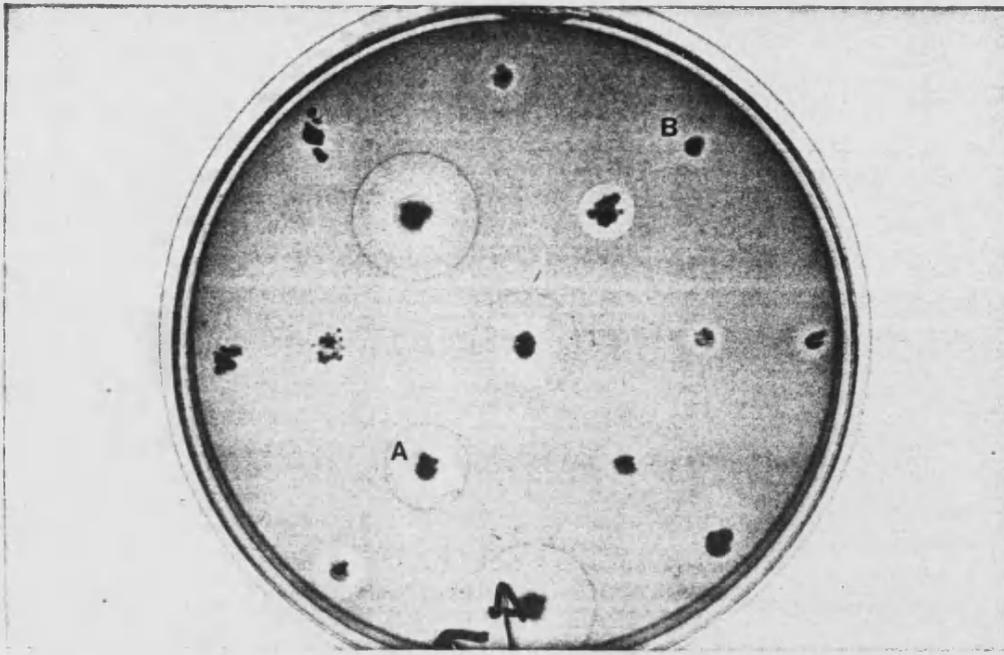
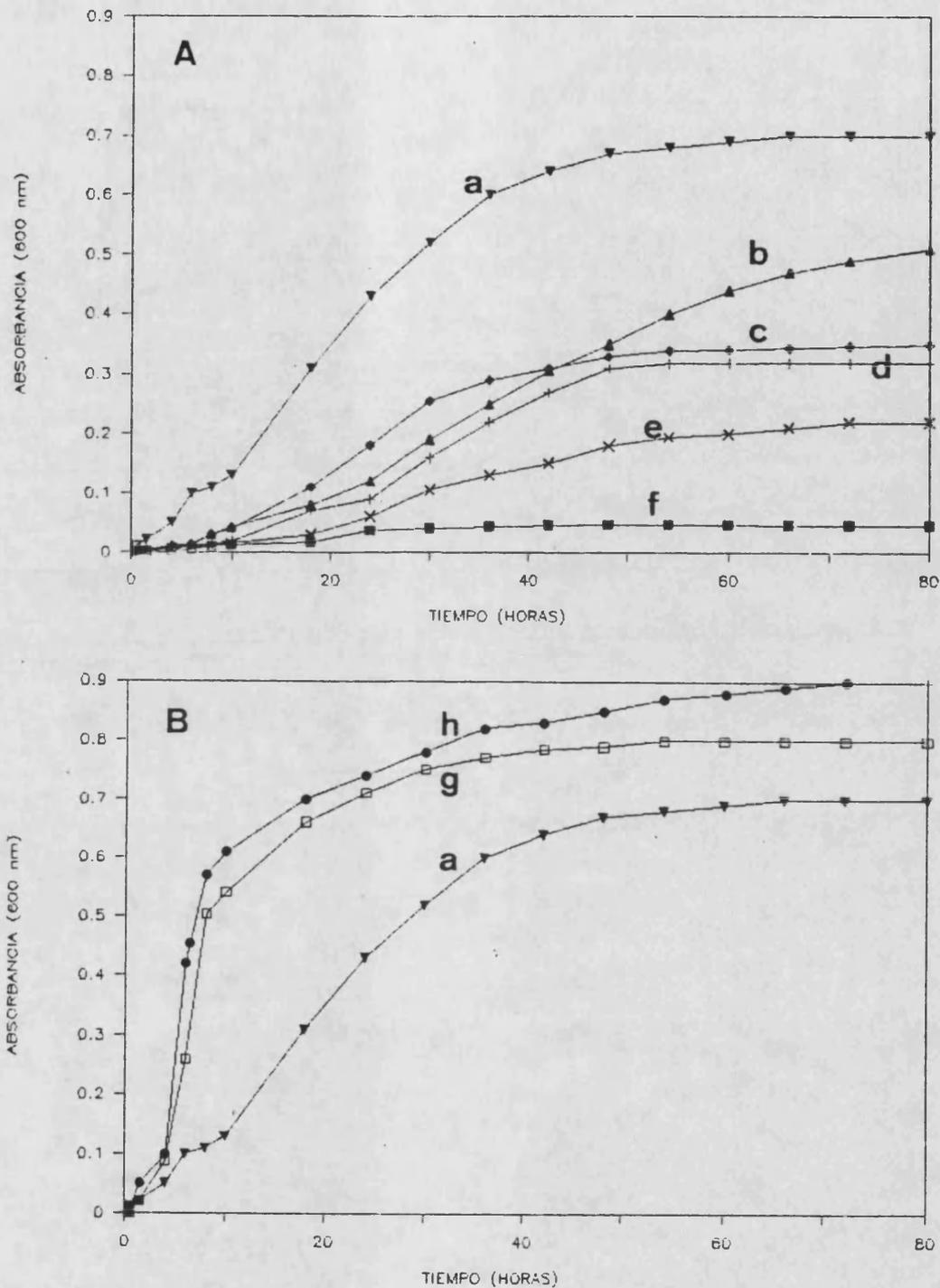


Figura 5.5. Placas de agar azul (Schwyn y Neilands, 1987) mostrando la zona de viraje alrededor de las colonias productoras de sideróforos. A, control positivo (*S. typhimurium* LT2); B, control negativo (*V. anguillarum* 775 curada). C, cepas de *V. cholerae* no O1 ambientales, altas productoras de sideróforos (véase Tabla 5.4).



FIGGURA 5.6. Curvas de crecimiento de la cepa ambiental de *V. cholerae* no 01 82A, crecida en medio de Dye modificado. A, efecto comparativo de la utilización de diferentes fuentes de carbono: a, succinato; b, oxalacetato; c, acetato; d, malato; e, fumarato; f, glicerol. B, efecto producido por la adición de Fe₃Cl al medio a distintas concentraciones: g, 5 μM; h, 10 μM.

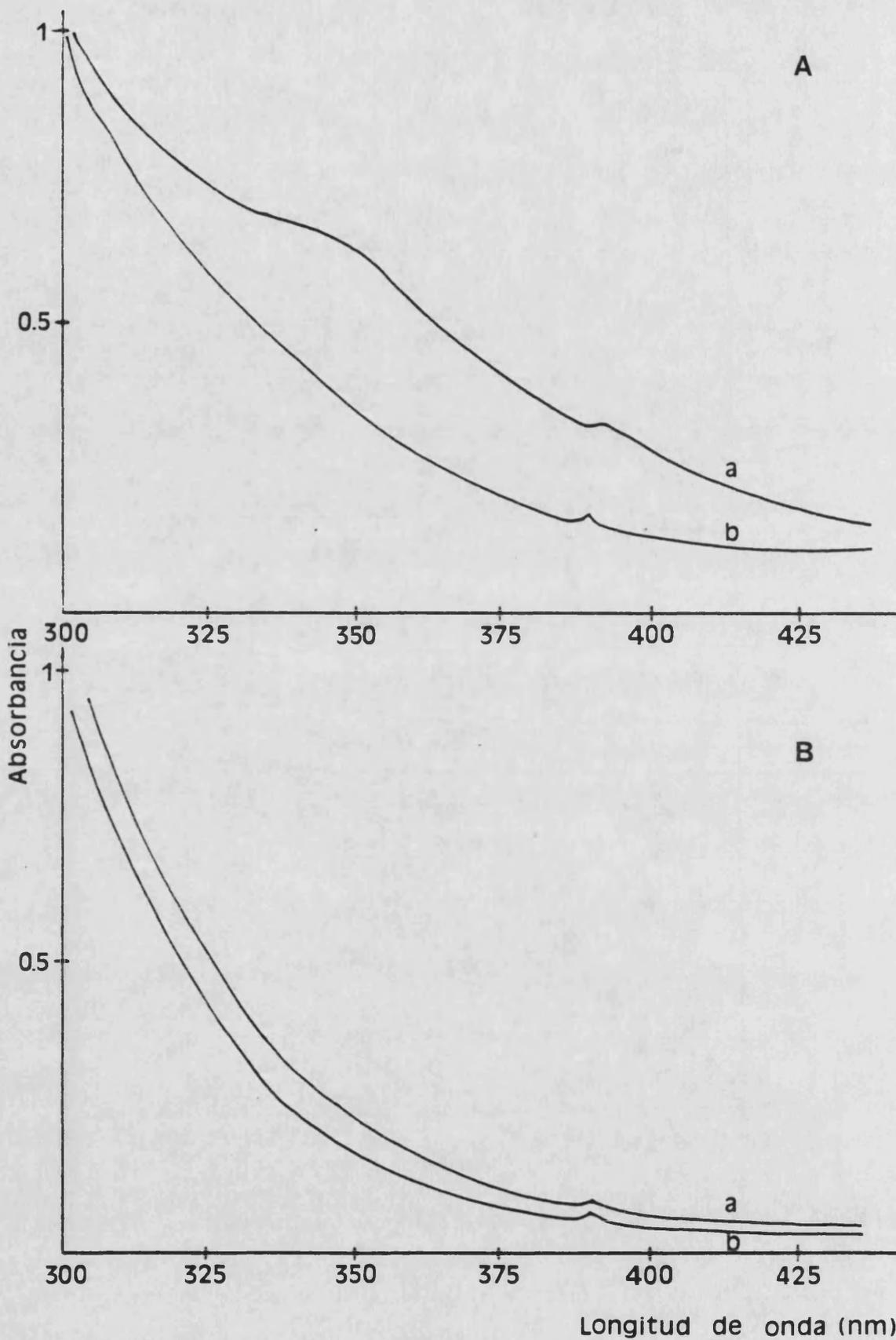


FIGURA 5.7. Espectros de absorción de los sobrenadantes de cultivo de dos cepas de *V. cholerae* no O1, crecidas en medio de Dye modificado (a) y en el mismo medio suplementado con $FeCl_3$ $10 \mu M$ (b). A, cepa 82A (productora de sideróforos): B, cepa 137 (no productora de sideróforos)

TABLA 5.5. Detección de sideróforos según las dos variantes del método de Schwyn y Neilands en las cepas utilizadas como controles en los ensayos.

Cepas	Producción, siderof.	Detección de sideróforos ^a	
		Medio sólido	Medio líquido
<u>Salmonella typhimurium</u> LT2	+	2.43(0.05)	0.366(0.001)
<u>Salmonella typhimurium</u> enb7	-	1.09(0.01)	0.899(0.001)
<u>Salmonella typhimurium</u> enb1	-	1.10(0.02)	NC
<u>Vibrio anguillarum</u> 775	+	2.28(0.02)	ND
<u>Vibrio anguillarum</u> 775 curada	-	1	NC
<u>Vibrio anguillarum</u> RV22	+	3.00(0.10)	0.354(0.001)

a. La cuantificación se realizó: i) medio sólido; diámetro del halo/ diámetro colonial. Los valores corresponden a la media y la desviación típica de dos determinaciones independientes. ii) medio líquido; A/A ref (630 nm). Los valores corresponden a la media y desviación típica de tres lecturas espectrofotométricas. ND, no determinado; NC, no crecimiento.

nivel $p < 0.01$.

Del total de cepas de Vibrio cholerae analizadas, sólomente dos no crecieron en ninguno de los medios de cultivo (AA y Dye) utilizados en el estudio, siendo una de ellas la cepa de colección 569B. El 7.6% de cepas no produjo, en las condiciones ensayadas y con la metodología empleada, ningún compuesto específico para la captación del Fe(III). El resto de las cepas liberó al medio, aunque en cantidad y/o efectividad variable, compuestos capaces de competir con el complejo HDTMA-CAS por la posesión del ión férrico y, por tanto, fueron consideradas como productoras de sideróforos. Es de destacar que el 6.76% de las cepas productoras rindió en los ensayos del orden de 2 a 3 veces más cantidad de sideróforos que los sintetizados por las cepas utilizadas como controles positivos.

Espectros de absorción y detección de sideróforos
de tipo hidroxamato.

Se efectuó un análisis espectrofotométrico de barrido, en el rango 300- 500 nm, de los sobrenadantes de cultivo de cepas seleccionadas crecidas en medio de Dye modificado en presencia y ausencia de $10 \mu\text{M}$ de FeCl_3 . Como puede observarse en la Figura 5.7, la ausencia de Fe en el medio de cultivo indujo la secreción de metabolitos que absorbieron en el rango 300-350 nm, pero no a 400-475, lo cual está en consonancia con la producción de sideróforos de tipo fenolato-catecolato y sus productos de hidrólisis (Williams, 1978). No

se detectaron, sin embargo, variaciones de este tipo, cuando se analizaron los sobrenadantes de las cepas dadas como no productoras de sideróforos por el método de Schwyn y Neilands (1987) (Figura 5.7). Asimismo, no se observaron cambios en la coloración de los sobrenadantes de las cepas crecidas en medio mínimo, tras la adición del reactivo de Atkin (Atkin y cols., 1970), ni modificación de la absorbancia a 480 nm.

Bioensayos.

Las cepas utilizadas en los bioensayos como productoras e indicadoras aparecen reflejadas en las Tablas 5.6 y 5.7. También se indica su CMI de EDDA, valor que ha de tenerse en consideración, puesto que este agente, añadido al medio como inductor de las condiciones de limitación en hierro, ha de estar a una concentración que inhiba el crecimiento de la cepa indicadora pero no el de la ensayada. En estas condiciones, el hierro o compuestos transportadores biológicamente activos (sideróforos), pueden invertir el efecto inhibitorio del EDDA y promover el crecimiento de la cepa indicadora (Figura 5.8). En la Tabla 5.8 se resumen los resultados de los experimentos, que fueron efectuados por triplicado. Todas las cepas de Vibrio cholerae no O1 ensayadas fueron capaces de estimular a las cepas de la misma especie, de uno y otro serotipo, y, además, a cepas pertenecientes a otras especies. Este es el caso de Vibrio mediterranei, especie de descripción reciente (Pujalte y Garay, 1986),

TABLA 5.6. Cepas utilizadas en los bioensayos como productoras de sideróforos^a.

Cepas	Origen	n	CMI, EDDA(mM)
<u>V. cholerae</u> 01 569B	humano	1	0.075
<u>V. cholerae</u> no 01	plancton	4	0.35-0.7
<u>V. cholerae</u> no 01	agua	14	0.09-0.8
<u>V. parahaemolyticus</u>	mejillón	2	0.8
<u>V. anguillarum</u>	peces enfermos	9	ND
<u>V. anguillarum</u> 775	peces enfermos	1	ND
<u>V. mediterranei</u>	ambiental	1	0.1
<u>A. hydrophila</u>	peces enfermos	2	ND
<u>S. thyphimurium</u>	ambiental	21	10.0
<u>S. thyphimurium</u> LT2	humano	1	0.8
<u>Citrobacter</u> sp	ambiental	1	ND
<u>E. coli</u> 185	-	1	ND

a. Detección según el método de Schwyn y Neilands. La cepa de Vibrio cholerae 569B no creció en los medios utilizados para la determinación de sideróforos, se dio como positiva por estar descrita en la bibliografía como productora de vibriobactina.

TABLA 5.7. Cepas utilizadas en los bioensayos como indicadoras.

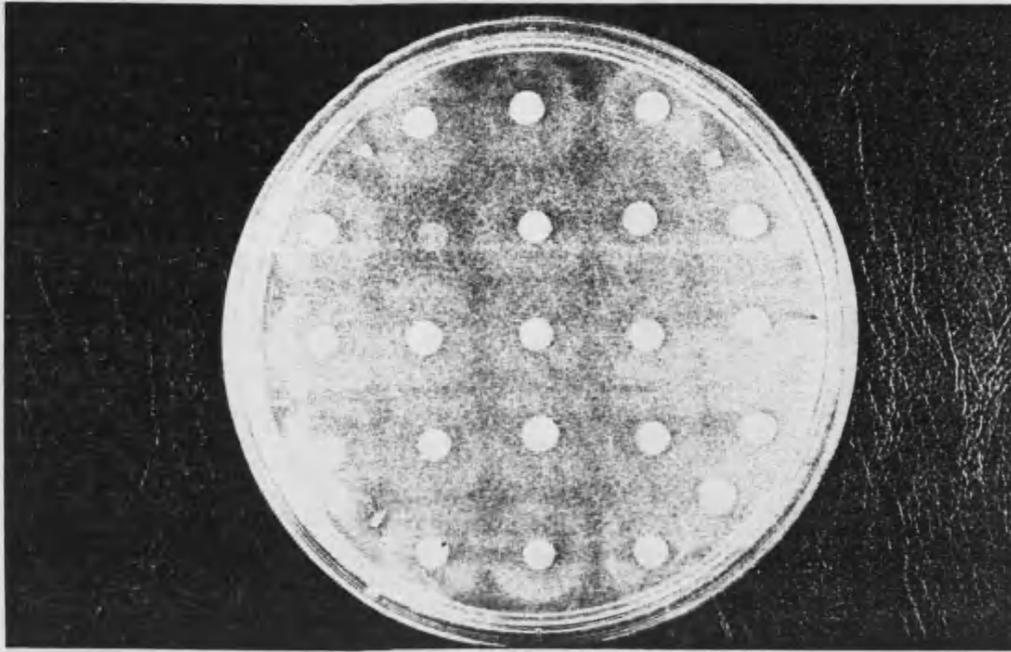
Cepas	Origen	n	CMI, EDDA(mM)	Producción, ^a Sideróforos
<u>V. cholerae</u> 01 569B	humano	1	0.075	+
<u>V. cholerae</u> no 01	agua	3	0.015-0.070	+
<u>V. cholerae</u> no 01	agua	4	0.060-0.150	-
<u>V. cholerae</u> no 01	plancton	1	0.060	+
<u>V. anguillarum</u> 775 cur.	laboratorio	1	0.020	-
<u>V. mediterranei</u>	agua	1	ND	-
<u>S. typhimurium</u> enb1	laboratorio	1	0.150	-
<u>S. typhimurium</u> enb7	laboratorio	1	0.150	-
<u>Citrobacter</u> sp.	agua	1	0.500	-

a. Detección según el método de Schwyn y Neilands (1987).

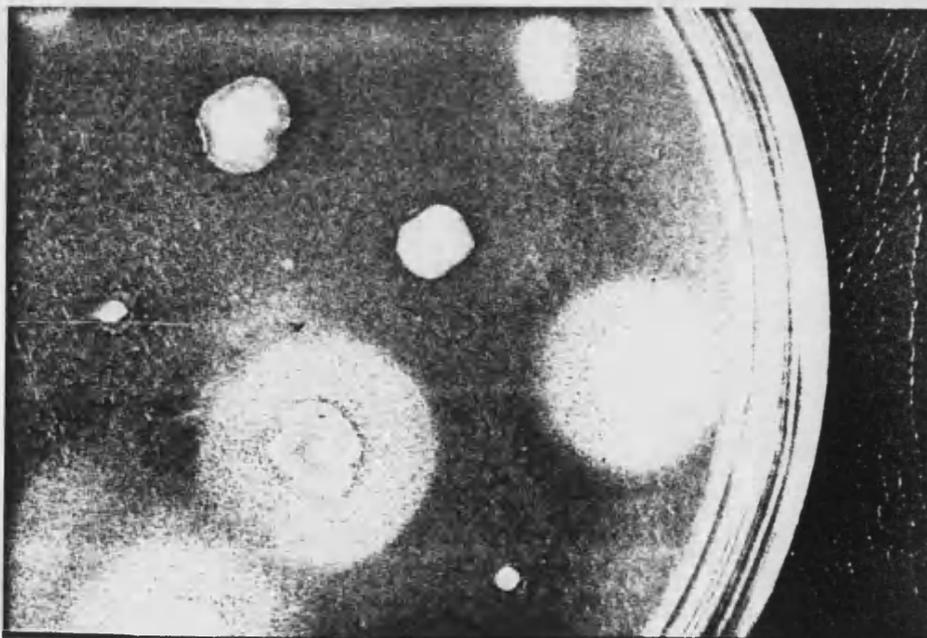
TABLA 5.8. Resultados de los Bioensayos.

	<u>V.anguillarum</u> 775 curada	<u>V. medite-</u> <u>rranei</u>	<u>S.typhimurium</u> <u>enb1</u>	<u>S.typhimurium</u> <u>enb7</u>	<u>V. cholerae</u> 01	<u>V. cholerae</u> no 01	<u>Citrobacter</u> sp.
1	-	-	-	+	-	+	ND
2	+	-	+	+	-	+	-
3	+	-	+	+	-	+	+
4	-	-	+	+	-	+	+
5	-	+	-	+	+	+	+
6	-	-	-	-	+	+	ND
7	-	-	-	+	+	+	ND
8	-	+	-	+	-	+	ND
9	+	ND	-	-	ND	+	+
10	+	ND	-	-	ND	+	ND

1. V. anguillarum 775, R82, RT32, TM14, S086-3, RP13
2. V. anguillarum 96 F, RV22, 43F
3. S. typhimurium LT2
4. S. typhimurium y Citrobacter sp. de origen ambiental
5. V. cholerae no 01
6. V. cholerae 01 569B
7. V. parahaemolyticus
8. V. mediterranei
9. E. coli 185
10. A. hydrophila



A



B

FIGURA 5.8. Placas de CM9 agar + EDDA utilizadas en los bioensayos: A, cepa indicadora V. cholerae 569B y cepas ensayadas V. cholerae no O1 ambientales y S. thyphimurium LT2 (única que no presenta halo de turbidez): B, detalle del bioensayo efectuado con la cepa ambiental de V. cholerae 137 mostrando la zona de estimulación del crecimiento alrededor de S. thyphimurium LT2, V. cholerae 569 y V. cholerae no O1 167.

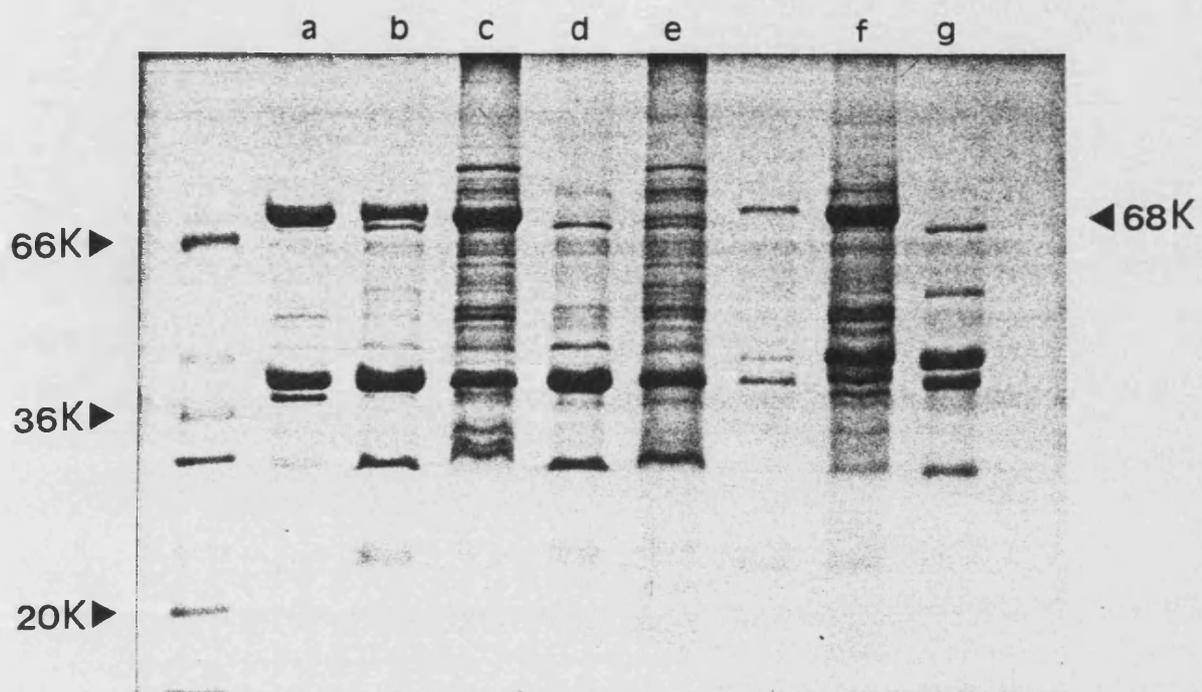


FIGURA 5.9. Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida de tres cepas de *Vibrio cholerae* no O1. A la derecha se indica el peso molecular de la proteína común inducida. Las cepas fueron crecidas en CM9 + 5 μ M de FeCl_3 (d,e,g,) y CM9 + 1/5 de la CMI correspondiente de EDDA (a,b,c,-f). Cepa 166: Membrana externa (a); Cepa E: Membrana total (e,c) y externa (b,d). Cepa 78: Membrana total (f) y externa (g).

Salmonella typhimurium y Citrobacter sp. Asimismo, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio mediterranei, Aeromonas hydrophila, Escherichia coli, Salmonella typhimurium y Vibrio anguillarum estimularon el crecimiento de las cepas de Vibrio cholerae no 01. Es de destacar que Vibrio cholerae 569B, cepa descrita por Griffiths y cols. (1984) como productora de vibriobactina, sólo estimuló el crecimiento de las cepas de la misma especie y, en condiciones inhibitorias, fue capaz de utilizar los sideróforos producidos por Vibrio parahaemolyticus y Vibrio cholerae. Las cepas de Vibrio cholerae no 01 utilizadas en el presente estudio fueron capaces de estimular al mutante Salmonella typhimurium enb7 pero no al enb1, resultado que se comentará en el apartado de discusión.

Inducción de proteínas de membrana en condiciones de limitación de hierro.

Se estudió el efecto de la limitación en hierro sobre las proteínas de la envoltura celular de 12 cepas representativas de los distintos rangos de tolerancia al EDDA establecidos. Con el fin de que el efecto inhibitorio del quelante fuese comparable en todos los casos, las cepas se cultivaron en M9 suplementado con 1/5 de su CMI, independientemente de su valor. Asimismo, se analizaron las membranas de las cepas crecidas tanto en presencia como en ausencia de FeCl_3 . Todas las cepas productoras de sideróforos estudiadas, independientemente de su CMI de EDDA, expresaron nuevas proteínas de membrana de alto peso molecular en condiciones de limitación de

TABLA 5.9. Variación en la cantidad relativa (%) de la proteína de 68 K producida por cepas de Vibrio cholerae no 01 a diferentes concentraciones de EDDA

Cepa	Medio de crecimiento		
	CM9+10 μ M FeCl ₃	CM9 + EDDA	
		1/5 CMI	3/5 CMI
161	0.0	15.5%	28.4%
167	0.0	24.5%	35.3%
114	0.0	24.0%	53.0%

hierro, observándose también cambios en el porcentaje relativo de otras proteínas, en general, de menor peso molecular (Figura 5.9). La única proteína común a todas las cepas estudiadas fue de 68 K, estando su expresión en función de la accesibilidad de Fe(III) en el medio, como lo reveló el análisis efectuado en las cepas 167, 114 y 161 crecidas a concentraciones crecientes de EDDA (Figura 5.10 y Tabla 5.9). En la Tabla 5.10 se presentan los cambios en porcentaje relativo de las proteínas de membrana externa de las 12 cepas crecidas en CM9 + 10 μ M de Fe Cl₃ y CM9 + 1/5 CMI de EDDA.

5.4. DISCUSION

La mayor parte de los estudios realizados sobre el desarrollo de sistemas de transporte de alta afinidad por bacterias, se han centrado en Escherichia coli, Salmonella typhimurium y Klebsiella pneumoniae (Pollack y cols., 1970; Williams, 1979; Neilands, 1981, 1982; Lodge y cols., 1986). Estas tres especies desarrollan un mecanismo de captación de hierro común que engloba el sideróforo enterobactina y su receptor de membrana, y sólo algunas cepas expresan un sistema alternativo, que en Escherichia coli reside en el plásmido ColV, y consta del sideróforo aerobactina y su receptor específico (Crosa, 1984; Ecker y cols., 1986). Parece ser que los microorganismos del género Vibrio son capaces de producir sideróforos de tipo fenolato

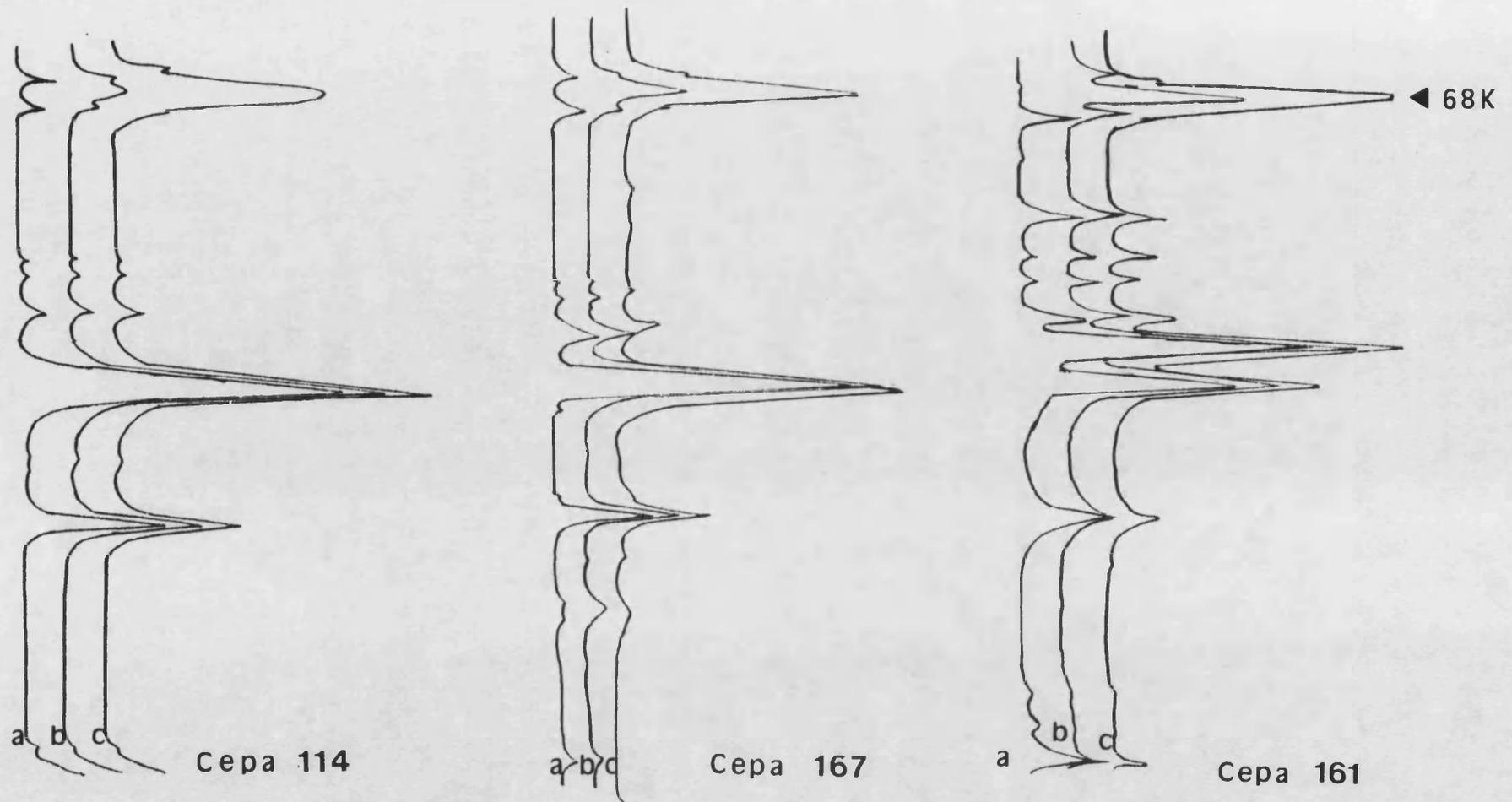


FIGURA 5.10. Perfiles densitométricos de las proteínas de membrana externa de tres cepas ambientales de *V. cholerae* crecidas en CM9 + 10 μM FeCl_3 (a), CM9 + 1/5 CMI de EDDA (b) y CM9 + 3/5 CMI de EDDA (c). Se señala a la derecha el peso molecular de la proteína común inducida en medio mínimo en hierro.

TABLA 5.10 Cantidad relativa de las proteínas de membrana externa (% respecto al total) de las cepas crecidas en presencia y ausencia de 1/5 de la CMI de EDDA.

Cepa	Medio	Proteínas									
		74K	71K	68K	66K	62K	48K	42K	39K	34K	28K
E	M9	-	1.9	0.0	2.6	-	1.5	0.7	3.8	26.2	41.6
	M9+EDDA	-	2.0	14.7	3.1	-	7.1	1.4	3.9	21.5	18.6
5	M9	0.0	0.0	0.0	0.5	-	2.0	1.9	43.1	4.2	15.5
	M9+EDDA	1.6	1.5	5.2	0.3	-	1.9	9.5	35.9	1.5	15.0
18	M9	-	2.1	0.0	2.1	-	3.2	1.2	31.2	4.9	23.8
	M9+EDDA	-	2.8	19.5	1.9	-	2.8	0.7	40.5	1.7	11.3
33	M9	-	4.1	0.0	3.5	-	1.5	3.2	2.9	23.5	33.1
	M9+EDDA	-	2.7	9.8	1.2	-	1.8	3.6	5.6	23.7	18.1
35	M9	-	2.5	0.0	3.2	0.0	6.9	2.6	3.2	17.8	28.5
	M9+EDDA	-	2.6	30.0	3.6	2.5	7.0	2.1	3.3	15.5	21.5
78	M9	1.0	0.1	0.0	2.3	1.2	1.9	2.6	53.0	8.9	8.0
	M9+EDDA	4.9	2.9	2.9	1.6	1.1	2.0	2.4	58.0	1.2	8.9
114	M9	-	2.5	0.0	1.4	-	2.8	1.7	68.5	3.8	17.1
	M9+EDDA	-	2.5	27.5	1.5	-	2.5	1.5	44.0	2.1	3.5
153	M9	-	0.2	0.0	0.6	0.0	4.6	17.5	34.8	21.1	7.8
	M9+EDDA	-	2.4	16.5	0.8	1.3	0.1	14.8	26.5	15.3	14.5
161	M9	-	3.7	0.0	1.5	-	4.4	5.3	33.4	19.9	13.4
	M9+EDDA	-	3.6	15.5	1.6	-	8.5	4.8	21.6	12.4	2.9

Tabla 5.10 (continuación)

Cepa	Medio	Proteínas									
		74K	71K	68K	66K	62K	48K	42K	39K	34K	28K
167											
	M9	0.0	1.4	0.0	0.8	-	2.5	4.5	63.1	0.6	17.2
	M9+EDDA	0.0	1.5	24.5	1.1	-	2.5	3.9	38.9	0.7	4.8
263											
	M9	0.0	1.8	0.0	0.1	-	2.6	4.7	35.4	18.4	19.3
	M9+EDDA	6.0	10.3	11.1	0.2	-	3.0	9.3	34.6	13.4	5.3
11195 ATCC											
	M9	0.0	0.0	0.0	0.0	-	8.0	23.5	5.0	19.6	20.1
	M9+EDDA	0.5	1.2	10.9	4.3	2.9	1.8	10.0	2.0	13.1	22.0

catecolato, aunque existen diferencias entre especies e incluso entre cepas de una misma especie (Sigel y Payne, 1982; Andrus y cols., 1983; Lemos y cols., 1987). La mayor parte de trabajos se ha centrado en el patógeno de peces Vibrio anguillarum, donde se ha demostrado la relación entre la posesión de un plásmido de 65 Kb, designado pJM1, y el fenotipo altamente virulento de determinadas cepas de la especie. Dicho plásmido codifica un sistema de captación de hierro altamente eficiente que permite a la bacteria crecer en las condiciones de limitación impuestas por las proteínas séricas del huésped (Walter y cols., 1983; Crosa, 1984). Muy recientemente, Lemos y cols. (1987) han propuesto que en Vibrio anguillarum existen, al menos, dos sistemas de transporte diferentes, y que ambos son expresados por la cepa patógena de peces RV22, incluida en el presente estudio. Determinadas cepas de V. vulnificus son capaces de producir dos clases de sideróforos, uno del tipo fenolato- catecolato y otro de naturaleza química desconocida pero que parece ser de tipo hidroxamato, cuya producción se relaciona con el carácter virulento de las cepas (Simpson y Oliver, 1983). Vibrio cholerae O1 sintetiza, en condiciones de limitación en hierro, un sideróforo de tipo fenolato- catecolato, que ha sido identificado como una catecolamida, cuyo esqueleto es una molécula de N-(3-aminopropyl)- 1,3diaminopropano- norespermidina (Griffiths y cols., 1984). Asimismo se ha demostrado que algunas cepas de la especie son capaces de producir proteínas de membrana externa reguladas por el nivel de Fe(III) en el medio, pero cuyo peso molecular es variable de unas cepas a otras y de unos autores a otros (Sigel y Payne, 1982; Sciortino y Finkelstein, 1983; Barja y cols., 1987), no habiéndose identificado ninguna de ellas como el receptor de

la vibriobactina.

No se han encontrado, hasta la fecha, estudios sobre producción de sideróforos o compuestos relacionados por las cepas no O1, por lo que el objetivo del presente trabajo ha sido la caracterización preliminar del sistema de captación de Fe(III) desarrollado por las cepas no O1 ambientales de la especie Vibrio cholerae. Se han incluido, además, como control, cepas O1 y cepas de diferentes especies donde el sistema ha sido caracterizado.

Para abordar este trabajo se ha considerado interesante realizar cuatro tipos de aproximaciones:

1. Estudio sobre la inhibición del crecimiento por el agente quelante EDDA.
2. Detección y cuantificación de sideróforos por el método de Schwyn y Neilands (1987).
3. Determinación del potencial biológico de los sideróforos producidos mediante bioensayos.
4. Análisis comparativo de las proteínas de membrana inducidas en condiciones de limitación en hierro.

El EDDA es un agente quelante no asimilable por las bacterias, cuya constante de asociación con el ión Fe^{+++} es de $10^{33.9}$. En consecuencia, su adición al medio de cultivo produce una reducción en la concentración de hierro libre que es proporcional a la cantidad de EDDA añadida (Miles y Khimji, 1975). Cuando se trabaja con el medio

mínimo CM9, una concentración de 10 μM de EDDA es suficiente para inducir las condiciones de limitación en hierro (Crosa, 1980a, 1980b). Por lo tanto, una medida indirecta de la expresión de sistemas de captación de alta afinidad sería la estimación de la concentración mínima de EDDA que inhibe el crecimiento bacteriano (Miles y Khimji, 1975). En nuestro estudio, todas las cepas no O1 fueron capaces de crecer en presencia de EDDA a la concentración final de 10 μM , y las CMI's determinadas oscilaron entre amplios márgenes siendo los valores más frecuentes similares a los descritos por otros autores para ésta y otras especies del género Vibrio (Sigel y Payne, 1982; Andrus y cols., 1983). En general, las cepas no O1 presentaron mayor rango de tolerancia a este quelante, lo que en principio debe suponer que, o bien el sistema que expresan es más eficiente, o bien es sintetizado en mayor cantidad. La comparación de las curvas de crecimiento en presencia y ausencia de EDDA, así como en presencia de sales de hierro añadidas a distintas concentraciones, confirma que realmente el efecto inhibitorio es debido a la disminución en la concentración de hierro libre presente en el medio.

Para constatar que las cepas eran capaces de producir compuestos quelantes del ión férrico se seleccionó el método desarrollado por Schwyn y Neilands (1987) por ser descrito como altamente sensible y de aplicación universal. A pH neutro la estabilidad del complejo CAS-HDTMA-Fe(III) se encuentra exactamente en el mismo rango que la estimada para los polímeros de hidróxido férrico, por lo que se considera este método como el ideal para detectar cualquier tipo de sistema de captación de alta afinidad

(Schwyn y Neilands, 1987). Puesto que el ensayo se basa en la competencia efectiva por el Fe(III) entre el complejo CAS-HDTMA y los compuestos captadores excretados por las células, únicamente se producirá el viraje en la coloración cuando se trate de sideróforos capaces de reaccionar con el Fe(III) con una estequiometría de reacción 1:1 y con una afinidad por el metal mayor que la del complejo (Schwyn y Neilands, 1987). El 92.4% de las cepas dio positivo sobre agar azul, resultado que se confirmó por comparación con los controles positivos y negativos sembrados sobre la misma placa. Dado que es razonable suponer que el tamaño del halo alrededor de las colonias debe ser proporcional a la cantidad de sideróforo difusible excretado, se consideró interesante, a efectos comparativos, calcular la relación diámetro halo/ diámetro colonia. Paralelamente se determinó la producción de sideróforos en una serie de cepas seleccionadas según la segunda variante del método de Schwyn y Neilands (1987). Dichos autores establecen una relación lineal entre la A/A ref. (630 nm) y la concentración de sideróforo presente en el sobrenadante, independientemente del tipo de que se trate. En nuestro estudio no fue posible la realización de una recta patrón construída con los datos A/A ref. frente a concentraciones conocidas de sideróforos purificados. Sin embargo, puesto que los resultados se expresan en unidades relativas, la comparación de nuestros datos con los obtenidos por Schwyn y Neilands (1987) permitiría asignar a los vibrios positivos una producción de sideróforos del orden de $10 \pm 5 \mu\text{M}$. En cualquier caso, tras comprobar mediante un análisis de regresión que la cuantificación sobre medio sólido se correlacionaba con la derivada de la relación A/A ref., lo que sí pudo establecerse es una estimación

relativa de la cantidad producida mediante comparación de los resultados obtenidos para nuestras cepas y para las cepas control. De esta forma se puede concluir que la producción de sideróforos por las cepas no O1 es generalmente mayor que la de las O1, y que parte de las cepas ambientales excretan del orden de 2 a 3 veces más cantidad que los controles positivos de otras especies incluidos en el estudio.

La detección en el sobrenadante de cultivo, tiene la ventaja de que se puede relacionar la tasa de cambio del Fe(III) entre el sideróforo producido y el complejo CAS-HDTMA con la estructura del mismo (Schwyn y Neilands, 1987). En nuestro caso, los virajes se produjeron en unos pocos minutos por lo que se trataría de sideróforos de tipo fenolato-catecolato (Schwyn y Neilands, 1987). Los estudios se completaron con la determinación de la concentración de hierro que reprime la síntesis de sideróforos. Para ello, se incubaron las cepas ambientales altamente productoras y las cepas control en medio de Dye y medio de Dye suplementado con concentraciones crecientes de Fe_3Cl , realizándose la determinación en los sobrenadantes de cultivo. En general, el sistema se reprimía, en el caso de los aislamientos ambientales ensayados, a mayor concentración de Fe_3Cl (20-50 μM) que en el caso de las cepas control (5-10 μM), lo que supondría que las cepas ambientales requieren más Fe(III) para crecer que los aislamientos clínicos. Este resultado concuerda con el obtenido por Sigel y Payne (1982) al detectar que la producción de sideróforos por 5 cepas O1 de origen clínico se reprimía a menor concentración de Fe(III) que la estimada para una cepa O1 de origen ambiental.

El hecho de que tanto los controles negativos Salmonella

typhimurium enb1 y Salmonella typhimurium enb7 como los vibrios no productores, resistan una cierta concentración de EDDA, se relacionaría con la excreción de metabolitos tipo citrato, DHBA o cualquier otro agente quelante de naturaleza desconocida capaz de competir con el EDDA por el Fe(III) pero no con el complejo CAS-HDTMA-Fe(III). De hecho, en condiciones de "stress", los microorganismos excretan al medio sustancias capaces de unirse al Fe(III) mediante el establecimiento de 2 ó 4 enlaces de coordinación (Neilands, 1981). Sin embargo, sólomente los ligandos que poseen en su estructura los átomos electronegativos necesarios para el establecimiento de seis enlaces de coordinación con el Fe(III), forman parte de los sistemas de captación denominados de "alta afinidad", capaces de reaccionar con la estequiometría de reacción 1:1 que los clasifica como verdaderos sideróforos (Neilands, 1981).

Los espectros de absorción de los sobrenadantes de cultivo revelaron la presencia de metabolitos de tipo fenolato-catecolato y sus productos de hidrólisis (Williams, 1979), pero no la de productos de tipo hidroxamato, como lo confirmó el método de Atkin y cols. (1970). Este resultado está de acuerdo con los obtenidos por Payne y Finkelstein (1978), Sigel y Payne (1982) y Griffiths y cols. (1984) en las cepas 01 de la especie.

Otro método para examinar la síntesis y utilización de sideróforos activos biológicamente, es ensayar la capacidad de las cepas positivas para estimular el crecimiento de bacterias, de la misma y de otras especies. Al mismo tiempo, los bioensayos ponen de

manifiesto el tipo de sideróforo excretado en función de su utilización por cepas productoras de sistemas conocidos, inhibidas por EDDA o defectivas en la síntesis de ligando. En el presente trabajo se han utilizado como controles, la cepa de Vibrio cholerae 569B, cuyo crecimiento se ha inhibido añadiendo al medio EDDA 90µM, las cepas de Salmonella typhimurium enb1 y enb7 y una cepa de Vibrio anguillarum defectiva en la síntesis de anguibactina y sus receptores específicos. En todos los casos se controló la marcha de los experimentos sembrando en superficie la cepa salvaje y confirmándose, tras la incubación, la presencia de halos de crecimiento alrededor de las colonias de Salmonella typhimurium LT2 y Vibrio anguillarum RV22. El hecho de que las cepas de Vibrio cholerae ensayadas sean capaces de estimular el crecimiento de la cepa de colección O1, confirma que el sideróforo excretado es la vibriobactina. Además, nuestras cepas no estimularon a la cepa Vibrio anguillarum 775 curada, lo cual supone que no son productoras del sistema propuesto por Lemos y cols. (1987). Un resultado aparentemente contradictorio, fue que los vibrios ambientales promovieron el crecimiento del mutante de Salmonella typhimurium enb7 pero no del enb1. Las dos últimas son cepas defectivas en la síntesis de enterobactina por bloqueo de la ruta biosintética en dos puntos distintos (Pollack y cols., 1970). El mutante enb1 acumula DHBA en el medio por estar bloqueado el paso siguiente de la ruta mientras que el mutante enb7 es incapaz de transformar el ácido corísmico en DHBA. Si en un bioensayo se utiliza como indicador el mutante enb7 y se siembra en superficie al mutante enb1, o viceversa, éste último liberaría DHBA que podría ser utilizado por la cepa enb7 como precursor de la enterobactina la cual

estimularía, a su vez, el crecimiento del primero, formándose un halo de turbidez alrededor de las colonias. Si se sigue esta línea de razonamiento, se puede explicar porqué nuestras cepas estimularon el crecimiento del mutante enb7 y no el del mutante enb1. Los sideróforos de tipo fenolato- catecolato descritos poseen en común parte de su ruta biosintética, de modo que la mayoría de las cepas pueden excretar al medio metabolitos intermedios, como es el caso del DHBA y cepas de Escherichia coli, Salmonella typhimurium y Aerobacter aerogenes (Pollack y cols., 1970). En nuestro estudio, los vibrios ambientales probablemente estimularon el crecimiento del mutante enb7 por liberación de intermediarios o productos de hidrólisis del sideróforo producido, similares al DHBA, los cuales pudieron ser utilizados por el mutante en la síntesis de enterobactina. Sin embargo, puesto que el sideróforo final producido es diferente, éste no pudo ser utilizado por el mutante enb1 y en consecuencia no se estimuló su crecimiento. Rabsch y cols. (1986) encontraron resultados similares en bioensayos efectuados con cepas de Salmonella typhimurium defectivas en la síntesis de enterobactina y el mutante enb7, concluyendo que el efecto estimulador observado era debido a la excreción de DHBA más que a la liberación de un verdadero sideróforo. Esta hipótesis concuerda con la detección de compuestos relacionados con el DHBA en los sobrenadantes de cultivo de una cepa de Vibrio cholerae 01, de colección, por Andrus y cols. (1983).

En nuestro estudio, las cepas de Vibrio cholerae no 01, a diferencia de la 569B, fueron capaces de estimular el crecimiento de Vibrio mediterranei, Salmonella typhimurium enb7 y Citrobacter sp., lo cual se puede relacionar con la liberación de metabolitos similares al

ya mencionado o, lo que es más improbable, con la compartición de un sistema de transporte diferente, aún por caracterizar. A su vez, las cepas ambientales fueron estimuladas por todas las cepas ensayadas lo que indica que no sólo liberan estos productos sino que, además, pueden utilizar los producidos por otras especies, la mayor parte de las cuales proceden del mismo ecosistema.

Paralelamente se estudió la variación en la expresión de las proteínas de membrana en medio mínimo en hierro y medio suplementado con concentraciones variadas de FeCl_3 . En los extractos de ME de todas las cepas estudiadas, tanto de origen clínico como ambiental, se encontró una proteína de aproximadamente 68 K, cuya expresión era dependiente de la accesibilidad del ión Fe(III) en el medio. El resto de proteínas de alto peso molecular, fueron de expresión variable en función de la cepa estudiada y muchas de ellas aparecieron en los aislamientos ambientales en condiciones aparentemente no limitantes en Fe(III) . Los cambios observados en las proteínas de menores pesos moleculares, pueden deberse a diferencias en la edad del cultivo, como ya se comentó en el capítulo 4 de la presente tesis, o a reordenaciones de tipo topológico encaminadas al mantenimiento estructural de la membrana (Neilands, 1982). Los resultados de la comparación de los perfiles proteicos de las cepas crecidas en diferentes medios de cultivo (capítulo 4) indican que la variabilidad encontrada en las proteínas de alto peso molecular (70K, 72K, 74K, 77K, 82K) no puede ser achacada a las condiciones mínimas en hierro de los medios de cultivo, ya que son observadas en algunas cepas cuando son cultivadas en AP y NB. Sin embargo, también es cierto que

el concepto de "limitación en hierro" parece ser diferente en el caso de las cepas ambientales, ya que éstas requieren mayores concentraciones de Fe(III) para reprimir el sistema. En cualquier caso, sí se produce en medio mínimo en Fe(III) la aparición de una nueva proteína que nosotros proponemos sería el receptor del sistema expresado por las cepas de Vibrio cholerae estudiadas.

En conclusión, las cepas ambientales no O1 de la especie Vibrio cholerae expresan, al menos, un sistema de captación de hierro de alta afinidad en condiciones limitantes en el metal, junto con otro sistema no específico en el que probablemente se halla implicado un compuesto similar al DHBA. Estos agentes quelantes son excretados en menor cantidad por las cepas O1 de la especie y por las cepas control de otras especies. La razón podría radicar en que el hierro en su hábitat natural se encuentre mucho más inaccesible al microorganismo que en el interior del intestino de los huéspedes de donde proceden los aislamientos clínicos estudiados. Efectivamente, el elevado pH registrado en todos los puntos de la Albufera, de donde proceden los vibrios estudiados, reduciría drásticamente la solubilidad del hierro en el medio (Neilands, 1981), de modo que los microorganismos han desarrollado un sistema de captación que parece ser mucho más efectivo que el de las cepas O1 de la especie. Si éste es o no un factor más de virulencia es algo que permanece por dilucidar. Lo que sí que parece ser obvio es que la capacidad de crecimiento de los vibrios ambientales positivos estudiados, en el interior del intestino de los supuestos huéspedes, no podría ser inhibida por la limitación en hierro impuesta por las proteínas séricas del mismo.

6. ESTUDIO DE LOS FACTORES R Y DE SU CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA

6.1. INTRODUCCION

En los últimos años ha aumentado el número de bacterias resistentes a agentes antimicrobianos aisladas de ecosistemas acuáticos, siendo multirresistentes un considerable porcentaje de las mismas. Estos microorganismos, pertenecientes a especies y géneros muy diversos (incluyendo el género Vibrio), han sido recuperados, tanto de aguas con elevados índices de contaminación, como de ambientes naturales aparentemente desprovistos de presión selectiva. Así, se han encontrado en los efluentes de hospitales, granjas, mataderos, aguas residuales domésticas etc. (Niemi y cols., 1983; Alcaide y Garay, 1984; Walter y Vennes, 1985), en aguas limpias, dulces (ríos y lagos), estuarinas y marinas (Mc Nicol y cols., 1980, Hada y Sizemore, 1981, 1984; Baya y cols., 1986), en aguas de bebida (Armstrong y cols, 1981; Calomiris y cols., 1984), en sedimentos (Goyal y Adams, 1984), en peces (Toranzo y cols., 1984) e incluso en ambientes tan extremos como las aguas heladas del Antártico (Kobori y cols., 1984).

Esta elevada incidencia de bacterias resistentes a antibióticos en los ecosistemas acuáticos puede deberse principalmente a dos factores:

1. al uso indiscriminado de antibióticos, tanto en medicina como en la alimentación animal
2. a la capacidad de las cepas resistentes para intercambiar

el material genético que codifica estas resistencias.

Para poder comprender el proceso de diseminación de los determinantes de resistencia en los ecosistemas, hay que referirse a la naturaleza del material genético que los codifica y al modo en que éste se intercambia entre bacterias. En primer lugar, la adquisición de resistencias por selección de mutantes cromosómicos espontáneos, si bien es factible, no explicaría la aparición cada vez más frecuente de cepas multirresistentes. La razón estriba en que los determinantes de resistencia residen en genes separados y en que la frecuencia de mutación para un sólo gen por bacteria y generación es del orden de 10^{-7} - 10^{-10} , lo que haría prácticamente imposible la aparición de cepas multirresistentes por este mecanismo (Falkow, 1975).

Ya en 1960 Mitsuhashi, Watanabe y Nakaye demostraron que los determinantes de resistencia a antibióticos de cepas de Escherichia coli y Shigella eran de naturaleza plasmídica y transferible, denominándolos plásmidos R (Mitsuhashi, 1977). Más tarde se publicaron referencias de cepas portadoras de plásmidos R en todo el mundo (Datta, 1962; Lebek, 1969; Voogd y cols., 1968, 1973, 1977), observándose que estos factores eran transferibles entre miembros de la familia Enterobacteriaceae y miembros de las Vibrionaceae (Abe y cols., 1966).

En general, los plásmidos son moléculas de DNA de doble cadena en forma de círculo covalentemente cerrado y superenrollado que se replican de forma autónoma y cuyo tamaño oscila entre el 0.05 % y el 20 % ,e incluso más, del cromosoma bacteriano (Broda, 1979; Rosenberg

y cols, 1982). Se encuentran casi ubicuamente en las bacterias y, aunque pueden contener genes que codifican funciones extremadamente importantes (entre ellas la resistencia a antimicrobianos), en la mayor parte de los casos no se les considera indispensables para el funcionamiento de la célula en la naturaleza.

Si bien el descubrimiento de los determinantes de resistencia ha sido posterior al empleo de antibióticos por el hombre, el origen de los mismos habría que buscarlo mucho antes de su uso indiscriminado. Esta afirmación se ve ratificada por el descubrimiento de plásmidos de resistencia tanto en la flora intestinal de poblaciones humanas primitivas, con las que no se había usado ningún tipo de quimioterapia (Maré, 1968; Davis y Anandan, 1970), como en una cepa de Escherichia coli liofilizada en 1946, antes de la utilización masiva de los antimicrobianos (Smith, 1967).

Si además tenemos en cuenta que los antibióticos, a los cuales los plásmidos R median las resistencias, son producidos naturalmente por muchas especies microbianas, se puede emitir la hipótesis de que estas mismas especies habrían desarrollado las resistencias como un mecanismo de autodefensa frente a sus propios antibióticos y frente a los elaborados por otras especies competidoras de su mismo ambiente (Foster, 1983). Así, los Streptomyces y los Actinomycetes, constituirían el reservorio ancestral de los genes de resistencia, que habrían sido transferidos de unas especies a otras a través de una cadena en la que el primer y el último eslabón no tendrían que tener necesariamente relación entre sí (Reaney, 1976).

Existen cuatro mecanismos fundamentales de transmisión de información genética entre bacterias;

- conjugación
- transducción
- transformación
- fusión de protoplastos

Los dos últimos procesos no han sido descritos en la naturaleza, por lo que se desconoce si son o no lo suficientemente comunes como para constituir una forma normal de intercambio genético entre bacterias. Por otra parte, la transducción permitiría la transferencia de DNA cromosómico incorporado en el interior de las cabezas de los fagos, en lugar del DNA fágico. Sin embargo, de esta manera sólo se transfiere como máximo el 1 % del DNA total, por lo que no se puede afirmar que este mecanismo constituya un proceso importante de generación de diversidad genética en bacterias (Beringer y Hirsch, 1984).

La conjugación bacteriana es un proceso altamente específico en el que se transfiere el DNA de una célula donadora a otra receptora mediante un mecanismo que incluye el contacto célula-célula. Los plásmidos tienen un papel extraordinariamente importante en la conjugación, ya que algunos tipos (plásmidos conjugativos) contienen genes de transferencia que transforman la célula huésped en donadora emparejándola con otra bacteria y produciéndose el intercambio del DNA plasmídico. Además, estos genes de transferencia, a su vez, pueden promover el intercambio de plásmidos no conjugativos, usualmente de tamaño inferior a 17 Md (Broda, 1979) y fragmentos de DNA cromosómico (Holloway, 1979). La frecuencia de transferencia de material genético

cromosómico es de 10^{-4} - 10^{-8} por plásmido transferido, lo que significa que con frecuencias de conjugación iguales o superiores a 10^{-2} , podrían darse con elevada probabilidad reordenaciones genéticas cromosómicas entre las cepas implicadas en el proceso de conjugación.

Las bacterias que forman la pareja donador-receptor pueden pertenecer, tanto a una misma especie como a géneros e incluso familias diferentes (Beringer y Hirsch, 1984), produciéndose de esta forma la diseminación de resistencias y otros caracteres entre especies y géneros bacterianos, e incrementándose la probabilidad de que cepas patógenas o potencialmente patógenas adquieran fenotipos clínicamente no deseables (Routman y cols., 1985).

Para optimizar la probabilidad de encuentro entre bacterias y, por tanto, la formación de parejas conjugativas in vitro, se requieren cultivos de 10^8 células/ml mantenidos en condiciones estáticas que permitan la formación de los pili conjugativos (codificados en los plásmidos conjugativos). A través de estas estructuras (Brinton, 1971), o gracias a que acercan lo suficientemente las paredes celulares (Folkhard y cols., 1979), se produciría el intercambio de material genético. Puesto que la conjugación es un proceso que se da de modo normal in vitro, puede asumirse que del mismo modo se daría en la naturaleza (Beringer y Hirsch, 1984). De hecho, se ha demostrado mediante modelos experimentales en Escherichia coli y otras especies, que la conjugación se puede dar de modo normal entre comunidades bacterianas naturales en el suelo (Weinberg y Stotzky, 1972), en plantas de depuración de aguas residuales (Mach y Grimes, 1982), en

sedimentos (Stewart y Koditshek, 1980), en aguas de río (Grabow y cols., 1975) y por último, en el riñón (Novick y Morse, 1967), tracto urinario (Stotzky y Krasovsky, 1981) y tracto intestinal (Sansonettti y cols., 1980) de animales y del hombre (Williams, 1977). Queda, pues, clara la importancia de la conjugación como mecanismo de intercambio de información genética entre bacterias y como motor principal de la diseminación de resistencias (en su mayor parte contenidas en plásmidos conjugativos) entre los microorganismos.

Por otra parte, los plásmidos contienen con elevada frecuencia secuencias de inserción y transposones. Los primeros son fragmentos de DNA relativamente pequeños (200-1400 pares de bases) que contienen la información genética para su transposición, no confiriendo fenotipo alguno a la célula. Los segundos son entidades genéticas más grandes (2.5-40 kilopares de bases) que a menudo incluyen secuencias de inserción en sus extremos y que portan genes que codifican resistencias a antimicrobianos así como síntesis de enterotoxinas y/o distintos tipos de enzimas metabólicas (Halford y Grinstead, 1985). Los transposones son capaces de cambiar de localización en y entre cromosomas y plásmidos, insertándose al azar sin necesidad de que exista una secuencia homóloga que actúe como blanco, dando lugar a los mecanismos que se conocen con el nombre de recombinación ilegítima. Además, promueven reordenamientos en el DNA tales como deleciones, inversiones y duplicaciones, características esenciales para considerar su papel potencial en el intercambio genético entre bacterias y en la evolución de genomas y organismos. De hecho, la recombinación ilegítima, al permitir el intercambio entre regiones no

homólogas, favorecería la adquisición de caracteres nuevos. En el caso que nos ocupa, la existencia de transposones que codifican resistencias a antibióticos se considera insustituible para explicar la rápida evolución de los plásmidos multirresistentes (Cohen, 1976). Estos mecanismos de recombinación ilegítima podrían favorecer nuevas reordenaciones de resistencias que, mediante plásmidos conjugativos, conducirían a su disseminación entre especies carentes de las mismas en un ambiente selectivo.

Sin embargo, y tal como se ha especificado al principio del presente apartado, se han aislado numerosas bacterias resistentes en ecosistemas aparentemente desprovistos de presión selectiva. Grabow y cols. (1975) y Bell y cols. (1981) sugirieron que los plásmidos de resistencia contendrían información genética adicional que resultaría ventajosa a la célula en su ecosistema natural. De hecho, muchas de las bacterias que contienen plásmidos R, muestran tasas más altas de supervivencia en los ecosistemas acuáticos (Kelch y Lee, 1978). Además, aunque la función que codifiquen no sea esencial para la viabilidad del microorganismo huésped, los plásmidos R, como cualquier otro tipo de plásmido, constituyen un reservorio genético que, por su gran potencial de transferencia, recombinación y variación, provee a la célula de la diversidad suficiente para su adaptación ventajosa a un amplio rango de nichos ecológicos (Beringer y Hirsch, 1984).

6.2. MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas

El total de cepas de Vibrio cholerae no O1 seleccionadas junto con las cepas de colección utilizadas en el estudio aparecen listadas en la Tabla 5.2 del capítulo 5. Se sembró cada una de las cepas a partir de medio de conservación en caldo de Luria (LB) que se incubó 18 horas a 37°C. Los cultivos crecidos se utilizaron en cada uno de los ensayos que se indican a continuación.

Determinación de la resistencia a antibióticos

Se empleó la técnica de réplica en agar (Armstrong y cols, 1982). Los cultivos de LB de las cepas se diluyeron en medio fresco hasta una concentración de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonias (u. f. c.)/ml. De esta suspensión se sembraron por duplicado, mediante un asa calibrada de 3 mm de diámetro, placas de agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente a la concentración adecuada, así como placas control sin antibióticos. Se escogieron los antibióticos siguientes por ser representativos de los distintos grupos establecidos en función de su mecanismo de acción bactericida y el tipo de resistencia que generan (Foster, 1983): ampicilina, amoxicilina, cloramfenicol, estreptomina, fosfomicina, kanamicina, ácido nalidíxico, novobiocina, sulfamida, sulfanilamida, tetraciclina, trimetoprim. La preparación de las soluciones y las concentraciones

ensayadas aparecen en la Tabla 6.1. La presencia o ausencia de crecimiento se observó tras 18 horas de incubación a 37°C, de acuerdo con los procedimientos estandarizados para comprobar las resistencias a antibióticos (Washington y Barry, 1974). En los casos dudosos se sembraron placas conteniendo distintas concentraciones del antibiótico utilizado.

Transferencia de los determinantes de resistencia

Con el fin de seleccionar el procedimiento de conjugación más efectivo, se ensayaron cuatro métodos diferentes que aparecen esquematizados en la Figura 6.1. La cepa Escherichia coli K-12 185 Nal^r fue utilizada como receptora en todos los experimentos, salvo cuando se realizó la transferencia por el método de conjugación sobre agar selectivo, ensayo en el que se usó la cepa Escherichia coli W3110 Rif^r, según recomienda Willets (1984). Se seleccionaron seis cepas de Vibrio cholerae no O1 al azar, que fueron utilizadas como donadoras en los experimentos preliminares, ensayándose la transferencia de los determinantes de resistencia por triplicado. En todos los casos las cepas donadora y receptora se sembraron en matraces de 100 ml conteniendo 20 ml de caldo LB, que fueron incubados a 37°C y en agitación (200 rpm) hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento ($A(660\text{ nm})=0.4$). Seguidamente los matraces con los cultivos de cepas donadoras se dejaron 30 minutos más a 37°C y sin agitación para permitir la formación de los pili conjugativos. Paralelamente a los ensayos, se efectuó el recuento del número de células donadoras por

siembra en placa (agar LB) de las series de diluciones 10x realizadas en solución salina (pH 7.0). Las mezclas de conjugación y la selección de los transconjugantes se efectuaron de modo variable según el método.

a) Método de conjugación en medio líquido (Curtiss, 1981). Se mezclaron 0.2 ml del cultivo de cepa donadora con 0.8 ml del de receptora en tubos (18 mm x 150 mm) conteniendo 2 ml de medio LB fresco, incubándose la mezcla durante 4-18 horas a 37°C y sin agitación, ya que ésta impide la formación de parejas conjugativas estables. La selección de transconjugantes se realizó sembrando las diluciones adecuadas de la mezcla de conjugación en agar selectivo.

b) Método de conjugación en medio semisólido. El procedimiento es idéntico al anterior salvo que la mezcla de conjugación se efectúa sobre un matraz de 10 ml conteniendo 2 ml de LB + 0.2 % de agar, mantenido a 37°C. La siembra para la selección de transconjugantes se efectuó, tras 4-18 horas de incubación, mediante homogenización de la mezcla en un vórtex y utilización de pipetas de boca ancha (5 mm) en la realización de las primeras diluciones.

c) Método de conjugación sobre filtros de membrana (Willets, 1984). Se filtraron las mezclas de cepa donadora y receptora (0.2 y 0.8 ml respectivamente) a través de filtros de 0.45 μm de tamaño de poro y 2.5 cm de diámetro. A continuación se situaron los filtros sobre placas de agar LB precalentadas a 37°C y se incubaron de 4 a 18 horas a la misma temperatura. Para la selección de transconjugantes,

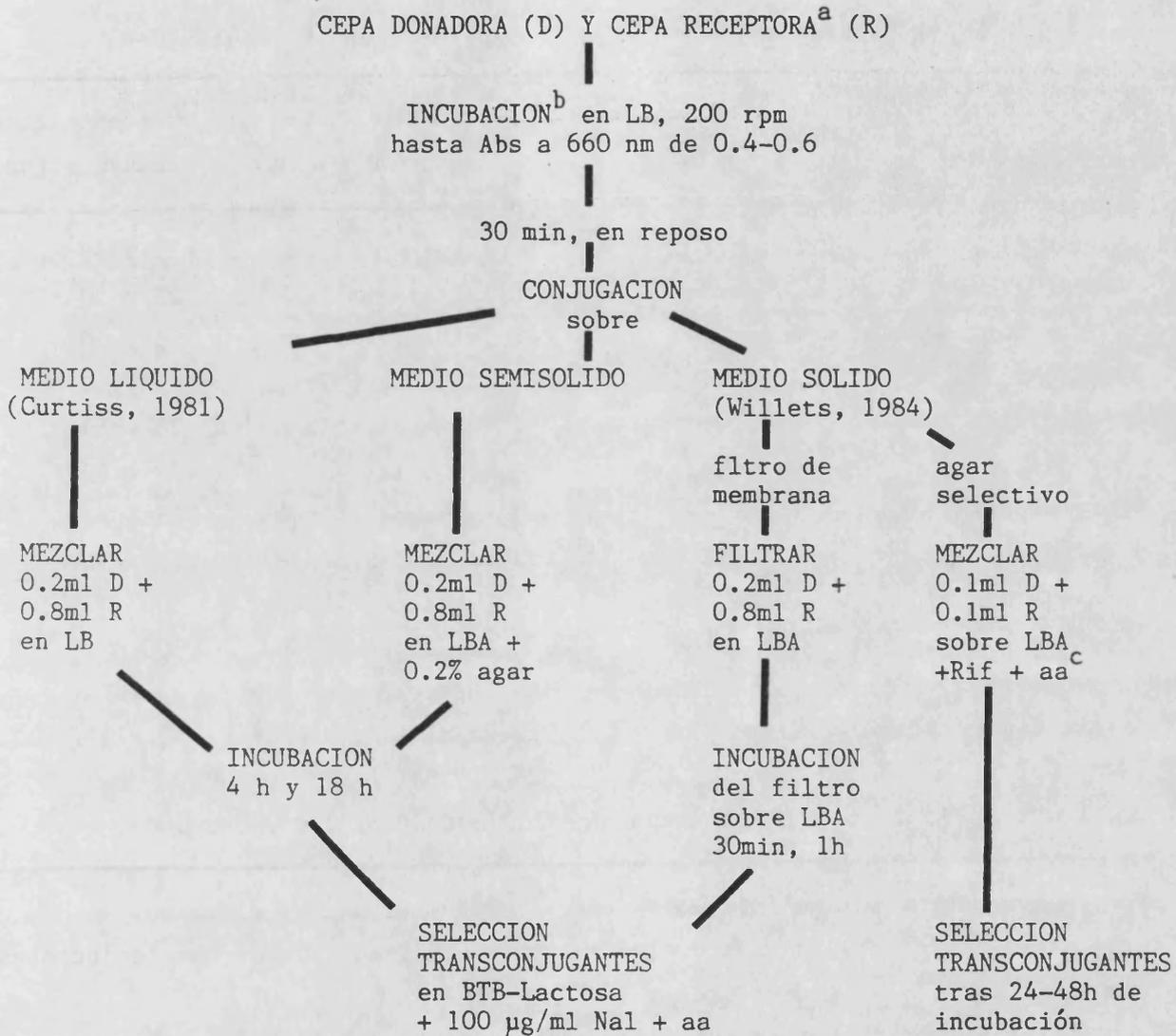


FIGURA 6.1. Esquema de los métodos utilizados en los ensayos de transferencia de resistencias: a, La cepa de *Escherichia coli* K-12 Nal^r fue utilizada como receptora en todos los experimentos, salvo en el método de conjugación sobre agar selectivo para el que se utilizó la cepa *Escherichia coli* K-12 Rif^r según recomienda Willets (1984); b, Todas las incubaciones se efectuaron a 37°C; c, antibióticos a los que es resistente la cepa donadora.

TABLA 6.1. Soluciones de antibióticos y concentraciones ensayadas.

Antibiótico ^a	Distribuidor	Solución de almacenamiento (mg/ml) ^b	Concentración ensayada (µg/ml)
Ampicilina (Am)	Bristol	25 (agua destilada)	25 y 50
Amoxicilina (Ax)	Beechman	25 (agua destilada)	25 y 50
Cloramfenicol (Cm)	Sigma	25 (etanol)	25 y 50
Fosfomicina (F)	Antibióticos SA	50 (agua destilada)	25 y 50
Kanamicina (Km)	Bristol	25 (agua destilada)	25 y 50
Nalidíxico (Nal)	Acofarma	30 (NaOH 1N)	30 y 50
Novobiocina (No)	Sigma	25 (agua destilada)	25
Estreptomicina (Sm)	C.E.P.A.	25 (agua destilada)	25 y 50
Sulfamida (Sd)	Sigma	30 (agua destilada)	300
Sulfanilamida (Sn)	Sigma	30 (agua destilada)	300
Tetraciclina (Tc)	Antibióticos SA	15 (etanol/agua)	15
Trimetoprim (Tp)	Sigma	10 µg/ml ^c	10
Rifampicina (Rif)	Lepetit	30 (DMSO) ^d	25
Polimixina B	Antibióticos SA	50 (agua destilada)	50

a. Entre paréntesis se indica la abreviatura utilizada en el texto

b. Entre paréntesis se indica el disolvente utilizado. Todas las soluciones de antibióticos se conservaron a -20°C.

c. El trimetoprim fue vertido directamente en agar LB (50°C) a la concentración final indicada.

d. DMSO, dimetilsulfóxido.

los filtros se sumergieron en matraces de 10 ml con 2 ml de solución salina estéril (pH 7.0) y las células fueron resuspendidas mediante agitación vigorosa. A continuación se sembraron las diluciones apropiadas en las placas selectivas.

d) Método de conjugación sobre agar selectivo (Willets, 1984). Con ayuda de un asa Digrafsky, se extendieron 0.1 ml del cultivo de cepa donadora y 0.1 ml del de receptora sobre una placa de agar LB conteniendo los antibióticos adecuados. Se utilizó como cepa receptora Escherichia coli W3110 Rif^r, ya que el ácido nalidíxico no puede emplearse como maracador al ser un potente inhibidor de la conjugación.

En los tres primeros métodos se utilizó como medio selectivo agar BTB-lactosa (Aoki y cols., 1977) suplementado con 100 µg/ml de ácido nalidíxico y con los antibióticos seleccionados a los que las cepas donadoras potenciales eran resistentes. En el último caso, el medio empleado fue agar LB conteniendo 50 µg/ml de Rif más el resto de antibióticos marcadores.

Las colonias crecidas sobre agar selectivo se consideraron como presuntos transconjugantes, comprobándose las características bioquímicas y la resistencia a antibióticos de 10 o más de ellas.

La frecuencia de conjugación (Fc) fue calculada como el número de transconjugantes partido por el número inicial de donadores (Shaw y Cabelli, 1980). El método que rindió las Fc más elevadas y los resultados más repetitivos fue utilizado en los ensayos realizados con el resto de las cepas.

Para evaluar el potencial de expansión de los factores R presentes en las cepas ambientales de Vibrio cholerae, se seleccionaron 8 transconjugantes obtenidos de las conjugaciones primarias, que fueron empleados como donadores en los experimentos de conjugación secundarios. En este caso se utilizó como cepa receptora Escherichia coli K-12 W3110 Rif^r y como donadoras transconjugantes Nal^r, siendo el método de conjugación empleado el de mayor rendimiento en los ensayos preliminares. Los transconjugantes se seleccionaron sobre agar BTB-lactosa conteniendo 50 µg/ml de Rif más los antibióticos a los que era resistente la cepa donadora.

Finalmente, se estudió el potencial de conjugación entre las cepas ambientales de Vibrio cholerae. Para ello se seleccionaron como donadoras cinco cepas sensibles a la polimixina B y portadoras de factores R transferibles y como cepas receptoras dos cepas ambientales resistentes a polimixina B y sensibles a todos los antibióticos utilizados, habiéndose comprobado previamente que la resistencia a polimixina B no residía en factores R. La selección de los transconjugantes se realizó en agar LB conteniendo 50 µg/ml de polimixina B y de los antibióticos a los que era resistente la cepa donadora.

En la Tabla 6.2 se resumen las características y el origen de las cepas utilizadas como receptoras en los ensayos de conjugación primarios y secundarios.

TABLA 6.2. Cepas bacterianas utilizadas como receptoras en los ensayos de conjugación.

Especie	Estirpe	Características	Procedencia
<u>Escherichia coli</u>	K-12 185	Nal ^r , F ⁻	Dra. A.E. Toranzo
<u>Escherichia coli</u>	K-12 W3110	Rif ^r , F ⁻	Dra. M.C. Mendoza
<u>Vibrio cholerae</u> no 01	57	PolB ^r	Este trabajo
<u>Vibrio cholerae</u> no 01	162A	PolB ^r	Este trabajo

TABLA 6.3. Principales diferencias entre los tres métodos de extracción de DNA utilizados: A, método de Birnboim y Doly modificado por Silhavy y cols (1984); B, método de Kado y Liu modificado por Toranzo y cols.(1983a); C, método de Portnoy y White (Crosa y Falkow, 1984).

	A	B	C
LISIS Y DESNATURALIZACION DEL DNA	SDS (1%) ALCALINO 4 °C	SDS(3%) ALCALINO 60 °C 60 MIN	SDS (4%) ALCALINO 37 °C 20 MIN
RENATURALIZACION DEL DNA	ACETATO POTASICO 3M PH 4.8	FENOL(NO TAMPO- NADO)-CLOROFORMO (v:v)	NEUTRALIZAR CON TRIS 2 M PH=7.0
OBTENCION DEL DNA PLASMIDICO	ELIMINAR RESTOS DNA CROMOSOMICO. PRECIPITAR DNA PLASMIDICO. SOME- TER A ELECTROFO- RESIS	TRAS SEPARAR LAS FASES, SE SOMETE A ELECTROFORESIS	ELIMINAR RESTOS DNA CROMOSOMICO. PRECIPITAR EL DNA PLASMIDICO. SOME- TER A ELECTROFO- RESIS

Aislamiento del DNA plasmídico

Todos los métodos de aislamiento del DNA plasmídico se basan en su estructura covalentemente cerrada y en su localización aislada del resto de los componentes celulares. Así, al someter a un extracto celular a condiciones desnaturalizantes para el DNA, las fuerzas que mantienen la doble hélice se destruyen y, al neutralizar la solución, el DNA plasmídico se renaturaliza más fácilmente, ya que contiene enlaces topológicos que mantienen unidas las hebras complementarias (Grinsted y Bennet, 1984). A lo largo del presente estudio se ensayaron varias técnicas para el aislamiento de plásmidos, con el fin de hallar alguna que fuese fiable y rindiese resultados repetitivos al trabajar con cepas ambientales de Vibrio cholerae. Asimismo se analizó el contenido plasmídico de los transconjugantes obtenidos en los ensayos de conjugación primarios y secundarios. Se trata de tres métodos de aislamiento del DNA a escala reducida cuyas diferencias fundamentales se resumen en la Tabla 6.3. En todos los casos se utilizó LB o medio mínimo M9 (Maniatis y cols., 1982) como medio de cultivo y las centrifugaciones fueron realizadas en una microcentrífuga (Beckman Microfuge 11) a 4°C.

a) Método de Kado y Liu (1981) modificado por Toranzo y cols. (1983a). Se trata de una técnica rápida, basada en la desnaturalización del DNA cromosómico por la acción del detergente Lauril-sulfato-sódico (SDS) alcalino a elevadas temperaturas. La técnica esencialmente consta de los siguientes pasos. De un cultivo de 18 horas se transfiere un volumen de 1.5 ml a un tubo eppendorf

estéril y las células se sedimentan y lavan en TS (50 mM Tris-0.1 M NaCl, pH 8.0) por centrifugación a 12000 x g durante 5 minutos. Seguidamente éstas se resuspenden en 70 µl de solución de lisis (SDS al 3% en Tris-HCl 50 mM + NaCl 0.1 M pH:12.4). Tras homogeneizar se coloca el tubo en un baño termostatado a 60°C durante 45-60 minutos. A continuación se añaden 70 µl de fenol:cloroformo (1:1 v/v) no tamponado, con el fin de que la mezcla sea capaz de bajar el pH del lisado aproximadamente a 9. Seguidamente se procede a la separación de las fases acuosa e hidrofóbica y a la desnaturalización y extracción de las proteínas, tras agitar brevemente y centrifugar a 12000 x g durante 10 minutos. La capa superior acuosa, conteniendo el DNA plasmídico, se transfiere por capilaridad a un nuevo eppendorf estéril, se mezcla con la solución colorante (0.25% púrpura de bromocresol, 50% glicerol en Tris-acetato 40 mM pH 7.9) y se guarda en la nevera a 4°C hasta su utilización.

b) Método de Birnboim y Doly (1979), modificado por Silhavy y cols. (1984). Se parte del mismo volumen de cultivo que en el caso anterior y las células se recogen por centrifugación a 12000 x g durante 5 minutos. Es muy importante que el sedimento quede lo más seco posible. A continuación éste se resuspende en 0.2 ml de solución reciente de lisozima a 4°C en GET (5 mg/ml en glucosa 0.05 M, ácido etilén-diamino-tetra-acético (EDTA) 0.01 M, Tris-HCl 0.025 M y pH 8.0), dejando la mezcla en un baño de hielo durante 5 a 30 min. Seguidamente se añaden 0.4 ml de solución alcalina de SDS (NaOH 0.2 N-SDS 1% en agua destilada) y se invierte varias veces el eppendorf hasta hacer translúcida la solución, que se vuelve a incubar en hielo

durante 5 minutos. El pH de la solución de SDS debe ser de 12.4, igual que en el caso anterior, no sobrepasando nunca el valor de 12.6, ya que éste puede desnaturalizar de modo irreversible el DNA plasmídico. Transcurridos los 5 minutos, se adicionan 0.3 ml de acetato de potasio 3 M (pH 4.8) y, tras agitar por inversión, se deja en baño de hielo durante 1 hora. Alternativamente, pueden congelarse las muestras a -20°C 10 min. Posteriormente los eppendorfs se centrifugan a 12000 rpm durante 15 min y los sobrenadantes obtenidos se transfieren a nuevos eppendorfs estériles a los que se añaden 0.6 volúmenes de isopropanol mantenido a -20°C . La mezcla se deja a -20°C por un periodo no inferior a 1 hora ni superior a 24. A continuación se centrifugan a 13000 rpm, 15 minutos y se procede al lavado de los sedimentos con etanol del 70% dos veces consecutivas, centrifugando cada vez a 13000 rpm durante 1 minuto. Los sedimentos, así obtenidos, se secan al vacío durante dos minutos y se resuspenden en 50 μl de TE (Tris HCl 25 mM-EDTA 10 mM, pH 8.0) pudiendo ser utilizados directamente en las electroforesis. En el caso de requerir una mayor pureza se procede al tratamiento con RNasa y proteinasa K tal como se indica a continuación (Alcaide, 1985):

- se añade RNasa pancreática, libre de DNasa, a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se incuba en baño a 37°C durante 30 min. A continuación se añaden 50 μl de TE-1% de SDS más proteinasa K a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se incuba de nuevo en baño a 37°C durante 30 minutos.

Una vez han actuado los enzimas, se añaden 2 μl de NaCl 5 M y 100 μl de fenol:cloroformo-isoamílico (preparado según Maniatis y cols., 1982) y se emulsiona por agitación suave, centrifugando a

continuación a 4°C y 10000 rpm durante 10 minutos para conseguir la separación de las fases. Se recupera la fase superior teniendo cuidado de no recoger material de interfase y se transfiere a un nuevo eppendorf estéril añadiendo dos volúmenes de etanol del 96% a -20°C. Esta mezcla se congela a -20°C al menos 1 hora para conseguir la precipitación del DNA. Finalmente se repiten los pasos anteriormente descritos tras la precipitación con isopropanol.

c) Método de Portnoy y White (Crosa y Falkow, 1984). Se centrifugan 2 ml de cultivo crecido y el sedimento se resuspende en 40 µl de TE (Tris-HCl 50 mM y EDTA 10mM, pH 8.0). A continuación se añaden 0.6 ml de solución de lisis (4% SDS en TE a pH 12.4 y preparado en el momento), incubándose la mezcla a 37°C durante 20 minutos. Una vez producida la lisis celular, la solución se neutraliza añadiendo 30 µl de Tris-HCl 2M a pH 7.0, invirtiéndose el eppendorf hasta que se nota un cambio en la viscosidad. Seguidamente se precipita el DNA cromosómico añadiendo 0.24 ml de NaCl 5 M y se deja el tubo en un baño de hielo durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se precipitan los restos celulares por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min y se traspasa el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril a un nuevo tubo eppendorf estéril. Posteriormente se adicionan 0.55 ml de isopropanol, se deja la mezcla a -20°C durante 30 minutos, y se sedimenta el DNA plasmídico por centrifugación a 13000 rpm durante 3 minutos. El precipitado se resuspende en 30 µl de TES (Tris 50 mM, EDTA 5mM, NaCl 50 mM, pH 8.0) y se deja disolver el DNA durante toda la noche a 4°C.

Se siguió este protocolo con las cepas de transconjugantes y

en el caso de las cepas de vibrios se utilizó el tampón TS y la solución de lisis salina descritas para el método de Kado y Liu (1981) modificado por Toranzo y cols. (1983a).

Electroforesis en geles de agarosa

La solución de colorante utilizada como marcador en la electroforesis fue diferente según el método seguido en la extracción. En el caso del protocolo de Kado y Liu se indica en el apartado correspondiente y en los otros dos métodos se utilizó una mezcla de glicerol al 30%, azul de bromofenol 0.25% y xylene cyanol FF al 0.25 % disueltos en agua destilada (Maniatis y cols., 1982).

Las electroforesis se realizaron en un aparato horizontal. El gel se preparó disolviendo agarosa tipo II (Sigma) al 0.75% en TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) (Maniatis y cols., 1982) excepto en el caso de las muestras obtenidas por el método de Kado y Liu, donde se empleó TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2mM, pH 7.9). El tamaño de los geles varió en función de las necesidades. A efectos de visualización rápida, se realizaron minigeles de 7.5x5.5 cm en los que la agarosa quedó detenida en el cristal por tensión superficial, que fueron corridos a 80-100 V. En el resto de los casos se utilizaron moldes de 14x11x0.7 cm y las condiciones de electroforesis fueron de 150 mA y 110 V hasta que la muestra penetra en el gel y de 80 V hasta el final del recorrido (Pharmacia ECPS 3000/150).

La tinción de los geles se realizó sumergiéndolos durante 30 minutos en el tampón correspondiente adicionado de 1 µg/ml de bromuro

de etidio. Cuando fue necesario obtener un mayor contraste se destiñó el gel por inmersión en una solución de sulfato de magnesio 1 mM durante 1 hora.

La observación de las bandas de DNA se efectuó con un transiluminador C-62 (Ultravioleta-products), y las fotos con una película Agfapan 200, un filtro naranja neutro YA 2 y un filtro de ultravioleta Kenko UV.

Estimación del peso molecular de los plásmidos

Las distancias de migración de los plásmidos problema y de los utilizados como patrón se estimaron mediante lectura de los negativos en un densitómetro láser (LKB 2202 ULTROSAN) con un integrador Hewlett Packard 3390 adaptado. De este modo se consigue mayor precisión y repetitividad en las estimaciones (Plikaitis y cols., 1986). Una vez obtenidos los datos de movilidad de las bandas patrón, éstos fueron procesados mediante ajuste a una hipérbola robusta modificada según Plikaytis y cols. (1986). Para ello se utilizó el programa que presentan dichos autores transcrito al Basic de Microsoft (MSDOS 3.0) en un ordenador IBM-AT. Dado que el programa utiliza un método de ajuste iterativo, en algunas ocasiones los valores de los parámetros que definen la función no son convergentes, por lo que en estos casos se utilizó el programa PAR de BMDP (Afifi y Azen, 1979) para conseguir el ajuste mínimo cuadrático de la misma función. Los plásmidos utilizados como patrones se indican en la Tabla 6.4.

Medios de cultivo y productos

- Medios de cultivo

a) Medios generales

Medio de Luria (LB)

Triptona	1.0%
Extracto de levadura	0.5%
NaCl	1.0%

pH 7.2

Esterilización: 121°C, 15 min.

Medio mínimo M9 (Maniatis y cols., 1982)

Sales M9 10X

Na ₂ HPO ₄	6%
KH ₂ PO ₄	3%
NaCl	0.5%
NH ₄ Cl	1%

Ajustar el pH a 7.4, esterilizar a 121°C, 15 min.

Sales M9 10X 10%

MgSO₄ 0.1M+ CaCl₂ 0.01M 0.1%

glucosa 50% 10 ml

Estas dos últimas soluciones se preparan de modo separado y se esterilizan preferentemente por filtración.

b) Medios para las pruebas de resistencia a antibióticos

Medio LB agar

Medio LB 100 ml

Agar bacteriológico 1.5 g

Esterilización: 121°C 15 min, dejar enfriar y añadir el volumen correspondiente (1%) de la solución de antibióticos previamente esterilizada por filtración

c) Medios para la realización de las transferencias de los determinantes de resistencia

Medio utilizado en los ensayos de conjugación

en medio líquido..... Medio LB

en medio semisólido..... ,, más 0.2% agar

sobre filtros de membrana.... ,, más 1.5% agar

sobre agar selectivo..... ,, más 1.5% agar

más 1/1000 de solución
de antibióticos.

Medio utilizado en la selección de transconjugantes

Agar Azul de Bromotimol-lactosa (BTB-lactosa)

Peptona	1.0%
Extracto de carne	0.3%
NaCl	0.5%
Lactosa	1.0%
Azul de Bromotimol	0.005%
Agar bacteriológico	1.5%

pH=7.2

Esterilización: 115°C 30 min, dejar enfriar y añadir el volumen correspondiente (1%) de solución de antibióticos.

Medio de conservación de los transconjugantes

Medio LB o M9 crecido hasta 10^9 células/ml y suplementado con glicerol estéril hasta una concentración final del 10%. De este modo se conservan a -20°C varios años.

- Productos

Implicados en la obtención del DNA plasmídico

Lisozima, RNasa pancreática, proteinasa K, agarosa tipo II de Sigma Chemicals Co. (USA).

Colorantes para las electroforesis en geles de agarosa

Azul de bromofenol (Panreac)

Xilene-Cyanol FF (ICN Pharmaceutical Inc.)

Bromuro de etidio (Sigma)

Púrpura de Bromocresol (Panreac).

- Otros productos

Glicerol (Scharlau)

Fenol (Merck), salvo para el método de extracción de Kado y Liu (1981), se preparó según recomienda Maniatis y cols. (1982).

8-hidroxiquinoleína (Merck): utilizado en la pre-

paración de fenol cloroformo isoamílico
Alcohol isopropílico (Scharlau).

6.3. RESULTADOS

Determinación de la resistencia a antibióticos

Se estudió la sensibilidad a antibióticos de 140 cepas ambientales de Vibrio cholerae no O1 y 6 cepas procedentes de colecciones de cultivo de serotipos O1 y no O1. Todas las cepas O1 resultaron sensibles a todos los antibióticos y concentraciones, mientras que del total de cepas no O1 (incluyendo la de colección), 138 (98%) fueron resistentes a uno o más antibióticos (véase la Tabla 6.5); de éstas, 36 (26%) resultaron resistentes a un solo antibiótico y el resto, 102 (74%) a dos o más. Ninguno de los aislamientos fue resistente a combinaciones de más de siete antibióticos. Los porcentajes de cepas resistentes a cada antibiótico aparecen en la Tabla 6.6. Se puede observar que la resistencia a Sn fue la más frecuente seguida de la resistencia a Am y Ax que, salvo en dos casos, se presentaron siempre juntas, mientras que sólo una cepa mostró resistencia a Rif. Todas las cepas fueron sensibles a Cm, Nal, No, Tc y Tp. Entre los aislamientos destaca una cepa resistente a siete antibióticos y cinco resistentes a combinaciones de cinco antibióticos, todas ellas excepto una procedían de muestras de agua del lago de la Albufera, siendo la restante un aislamiento de plancton de lago.

TABLA 6.5. Patrones de resistencia encontrados, número de cepas para cada combinación de resistencias y número de cepas utilizadas en los ensayos de transferencia.

Patrones de resistencia	Nº cepas	Cepas Transferencia
Am Ax F Km Sd Sm Sn	1	1
Am Ax F Sd Sn	1	-
Am Ax F Sm Sn	1	1
Am Ax F Km Sm	1	-
Am Ax Km Sm Sn	2	2
Am Ax F Sn	11	2
Am Ax K Sm	2	1
Am Ax Sd Sn	1	-
Am Ax Sm Sn	1	1
F Km Sm Sn	1	1
Am Ax F	5	1
Am Ax Km	1	1
Am Ax Sn	40	6
Am Sd Sn	1	1
F Sm Sn	5	2
Km Sd Sn	1	1
Km Sm Sn	1	1
Am Ax	18	2
Am Sn	1	1
F Sn	2	-
Km Sn	1	1
Sm Sn	4	1
Sn	35	2
Rif	1	1

El patrón de multirresistencias más frecuentemente encontrado fue Am-Ax-Sn seguido de Am-Ax y Am-Ax-F-Sn, estando distribuidos por igual entre cepas de agua y plancton.

Transferencia de los determinantes de resistencia

Previamente al estudio de la capacidad de transferencia de los determinantes de resistencia encontrados, se seleccionaron seis cepas ambientales de Vibrio cholerae no 01, que fueron utilizadas como

donadoras potenciales en los experimentos preliminares de conjugación. Se ensayaron cuatro métodos diferentes que fueron llevados a cabo por triplicado. Las seis cepas seleccionadas fueron capaces de transferir sus resistencias aunque las frecuencias de conjugación variaron según la metodología empleada. Como puede observarse en la Tabla 6.7, el método de conjugación sobre agar selectivo resultó ser el menos eficiente, de modo que sólo se obtuvieron transconjugantes en un caso y con una frecuencia de conjugación más baja que la encontrada para la misma cepa con el resto de los métodos. Los ensayos de transferencia con filtros de membrana sólo funcionaron en el 50% de las cepas y además, si se compara con los otros dos procedimientos, en general el número de transconjugantes obtenidos fue menor. Cuando se ensayaron las transferencias en medio líquido y semisólido, las frecuencias de conjugación calculadas fueron similares y, en general, superiores a las encontrados con las otras dos metodologías, consiguiéndose transconjugantes en todos los casos estudiados. Dado que los resultados fueron comparables, se eligió el método de conjugación en medio líquido para el resto de los ensayos, por ser de mucho más fácil manejo. Es de destacar que no se apreciaron diferencias en los valores de las frecuencias de transferencia obtenidas para un mismo método en función del tiempo de conjugación (4-18 h) empleado.

En la Tabla 6.5 se indica el número de cepas representativas de cada uno de los grupos de resistencia encontrados, que fue utilizado en los experimentos de transferencia a la cepa Escherichia coli K-12 185 Na1^r. Los presuntos transconjugantes, correspondientes a las colonias fermentadoras de la lactosa crecidas sobre agar

BTB-lactosa selectivo, fueron confirmados mediante la siembra en agar hierro de Kligler y posterior antibiograma que constatare el mantenimiento de las resistencias transferidas. Un resumen de los resultados obtenidos, aparece en la Tabla 6.8, donde pueden observarse las diferentes frecuencias de conjugación (expresadas como la media de tres determinaciones independientes) mostradas por las cepas. Todas las cepas, excepto dos (entre las cuales se encontraba la cepa de colección Vibrio cholerae no 01 11195 Am^r Ax^r), fueron capaces de transferir al menos parte de su fenotipo de resistencia. En la Tabla 6.6 se indica el carácter transferible o no transferible de cada uno de los antibióticos a los que las cepas mostraron resistencia. No pudo considerarse la transferencia de la resistencia a sulfamida, dado que la cepa utilizada como receptora en la conjugación, resultó ser resistente a 50 µg/ml de sulfamida. Es de destacar que las resistencias a Rif y a Sm no fueron transferibles en ningún caso, lo cual podría ser indicio de su naturaleza cromosómica. Por otro lado, la resistencia a Km sólo se transfirió en el caso de una cepa y, excepcionalmente, tras 48 horas de incubación conjunta de la mezcla de conjugación. Las frecuencias de conjugación oscilaron entre 10⁻³ y 10⁻⁹ y únicamente 8 cepas (26%) transfirieron con frecuencias relativamente altas (por encima de 10⁻⁵), independientemente de su fenotipo de resistencia.

Para evaluar el potencial de expansión de los factores de resistencia transferibles (factores R), se realizaron experiencias de conjugación secundarias (Toranzo y cols., 1984) en las cuales se utilizaron como donadores los transconjugantes obtenidos Nal^r y como

TABLA 6.6. Cepas resistentes a cada antibiótico y carácter transferible o no del mismo.

Antibiótico	N°cepas/%	Transferencia ^a
Sn	110/80%	+ (24/24)
Am	87/63%	+ (19/20)
Ax	85/61%	+ (17/18)
F	28/20%	+ (9/ 9)
Sm	19/14%	- (0/13)
Km	11/ 8%	+ (1/ 8)
Sd ^b	5/ 4%	
Rif	1/.7%	- (0/ 1)

a. Se indica entre paréntesis la razón entre el número de cepas R+ para el carácter y el número de cepas usadas en ensayos de transferencia.

b. No se consideró en los ensayos de transferencia, dado que la cepa receptora era resistente a 50 µg/ml de Sd.

TABLA 6.7. Resultados del estudio comparativo de la eficiencia de la transferencia en las seis cepas seleccionadas. Las frecuencias de conjugación fueron calculadas como la media de tres determinaciones independientes. Los resultados corresponden a los transconjugantes seleccionados tras 18 h de incubación.

Cepa	Método			
	Medio líquido	Medio semisólido	Medio sólido	
			Filtros membrana	Agar selectivo
E	8.0×10^{-7}	7.6×10^{-7}	-	-
5	2.7×10^{-6}	5.0×10^{-6}	4.0×10^{-6}	-
11	7.5×10^{-7}	6.3×10^{-8}	-	-
35	1.2×10^{-3}	9.0×10^{-4}	5.3×10^{-9}	-
78	1.3×10^{-5}	9.3×10^{-5}	9.0×10^{-10}	-
25Z	2.0×10^{-8}	1.7×10^{-8}	-	6.0×10^{-9a}

a. Sólo se obtuvieron transconjugantes en un solo experimento de los tres realizados.

TABLA 6.8. Transferencia de los determinantes de resistencia a E. coli K-12 185 Nal^r .

Resistencia donador ^a	Resistencia transferida	Razón cepas R+/ cepas ensayadas	Frecuencia conjugación ^b (media; DT)
Am Ax F Km Sm Sn	Am Ax F Km Sn	1/1	1.4×10^{-6c}
Am Ax Km Sm Sn	Am Ax F Sn	2/2	$(3.7;2.7) \times 10^{-6}$
Am Ax F Sm Sn	Am Ax F Sn	1/1	$(2.4;0.3) \times 10^{-6}$
Am Ax F Sm	Am Ax F Sn	2/2	$(2.1;1.9) \times 10^{-6}$
Am Ax Km Sm	Am Ax	1/1	$(2.4;0.5) \times 10^{-5}$
Am Ax Sm Sn	Am Ax Sn	1/1	$(2.6;0.7) \times 10^{-9}$
Am Ax F	Am Ax F	1/1	$(1.3;0.4) \times 10^{-5}$
Am Ax Km	Am Ax	1/1	$(9.3;2.2) \times 10^{-6}$
Am Ax Sn ^d	Am Ax Sn	5/5	$(7.4;7.2) \times 10^{-7}$
		1/1	$(1.2;0.7) \times 10^{-3}$
F Km Sm Sn	F Sn	1/1	$(7.9;0.3) \times 10^{-6}$
F Sm Sn	F Sn	2/2	$(7.0;0.2) \times 10^{-3}$
Km Sm Sn	Sn	1/1	$(3.5;0.5) \times 10^{-5}$
Am Sn	Am Sn	2/2	$(9.8;9.2) \times 10^{-7}$
Km Sn	Sn	2/2	$(1.6;0.6) \times 10^{-4}$
Am Ax	Am Ax	1/2	$(1.5;1.4) \times 10^{-8}$
Sm Sn	Sn	1/1	$(2.0;0.6) \times 10^{-4}$
Sn	Sn	2/2	$(3.7;0.8) \times 10^{-4}$
Rif	-	0/1	-

a. No se consideró la resistencia a Sd.

b. Valor medio y desviación típica (DT) de las frecuencias de conjugación (Fci) de cada grupo; Fci es la frecuencia de conjugación de la cepa i y se calcula como la media de tres determinaciones independientes.

c. Sólo se consiguió la transferencia de las resistencias en medio líquido tras 48 h de incubación y en un solo experimento.

d. Se establecieron dos grupos de cepas con el mismo patrón de resistencias dado que las frecuencias de conjugación obtenidas fueron muy diferentes.

receptor Escherichia coli W3110 Rif^r. En todos los experimentos se transfirieron los determinantes de resistencia, encontrándose frecuencias de conjugación (Tabla 6.9) superiores a las obtenidas al realizar las conjugaciones entre Vibrio cholerae y Escherichia coli 185 NaI^r. En concreto, los valores oscilaron entre 10^{-1} y 10^{-3} .

Con el fin de conocer si las cepas ambientales eran capaces de transferirse los determinantes de resistencia, se seleccionaron dos cepas sensibles a los antibióticos utilizados y cinco cepas resistentes. Previamente se determinó la sensibilidad a polimixina B de todas las cepas, criterio que sirve en parte para discriminar entre los biotipos clásico y eltor de Vibrio cholerae O1. El 65% de los aislamientos ambientales resultó resistente al antibiótico y de ellos 2 cepas fueron además sensibles a todos los antibióticos ensayados. Antes de proceder a las conjugaciones, se comprobó si la resistencia a polimixina B era o no transferible, siguiendo el procedimiento general ya descrito. De los diez casos analizados, no se obtuvieron transconjugantes resistentes al antibiótico, lo cual supondría que su naturaleza es cromosómica. Se escogieron 5 cepas sensibles a la polimixina B y portadoras de factores R que se utilizaron como donadoras potenciales y la selección de los transconjugantes se realizó en agar LB suplementado con 50 µg/ml de polimixina B. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 6.10. Puede observarse que las frecuencias de conjugación son sensiblemente superiores a las obtenidas en los ensayos de transferencia realizados entre las mismas cepas y la cepa Escherichia coli 185 NaI^r, y similares a las obtenidas en las experiencias de conjugación secundarias (compárense las Tablas

TABLA 6.9. Frecuencias de transferencia de los determinantes de resistencia en experimentos de conjugación secundarios.

Cepa donadora ^a	Plásmido R (Md)	Fenotipo transferido	Frecuencia conjugación ^b (media;DT)
T5	74	Am Ax Sn	$(4.0;1.0) \times 10^{-2}$
T35	74	Am Ax Sn	$(1.4;0.6) \times 10^{-2}$
T78	74	Am Ax F	$(4.7;0.5) \times 10^{-2}$
T153	74	Am Ax	$(1.6;0.2) \times 10^{-3}$
T210	35	Sn	$(2.2;0.3) \times 10^{-1}$
T214	74	Am Ax F Sn	$(1.7;0.2) \times 10^{-2}$
T244	74	Am Ax F Sn	$(5.7;0.8) \times 10^{-3}$
T255	74	Am Ax F Km Sn	$(6.8;0.2) \times 10^{-2}$

a Transconjugantes obtenidos de los ensayos de conjugación entre las cepas de Vibrio cholerae cuyo número se indica y la cepa de Escherichia coli 185 NaI^r

b valor medio y desviación típica (DT) de las frecuencias de conjugación (Fci) de cada cepa; Fci es la frecuencia de conjugación de la cepa i y se calcula como la media de tres determinaciones independientes

TABLA 6.10. Frecuencias de transferencia de los determinantes de resistencia entre cepas ambientales de Vibrio cholerae no O1.

Cepa donadora ^a	Fenotipo transferido	Frecuencia de conjugación ^b	
		<u>V.cholerae</u> no O1 57 ^c (media;DT)	<u>V.cholerae</u> no O1 162A (media;DT)
E	Am Ax Sn	$(1.7;0.5) \times 10^{-2}$	$(7.5;0.8) \times 10^{-1}$
5	Am Ax Sn	$(2.3;1.4) \times 10^{-2}$	$(6.3;1.2) \times 10^{-3}$
35	Am Ax Sn	$(2.2;0.8) \times 10^{-2}$	$(4.1;1.5) \times 10^{-2}$
78	Am Ax F	$(3.6;1.0) \times 10^{-2}$	$(1.2;0.1) \times 10^{-2}$
98A	Am Sn	$(4.7;1.1) \times 10^{-3}$	$(1.3;0.2) \times 10^{-2}$

a. Las cepas utilizadas como donadoras eran sensibles a 50 µg/ml de pol B.

b. Valor medio y desviación típica (DT) de las frecuencias de conjugación (Fci) de cada cepa; Fci es la frecuencia de conjugación de la cepa i y se calcula como la media de tres determinaciones independientes.

c. Las cepas utilizadas como receptoras eran resistentes a 50 µg/ml de polimi-xina B

6.9 y 6.10).

Aislamiento y caracterización de los plásmidos R

Todas las cepas de Vibrio cholerae no O1 poseedoras de factores R fueron sometidas a análisis de su contenido plasmídico con el objeto de relacionar la posible existencia de plásmidos con las resistencias observadas. Para ello se probaron tres métodos diferentes de entre los denominados de aislamiento a pequeña escala, cuyas ventajas son la rapidez de preparación y la posibilidad de análisis simultáneo de gran número de muestras. Los tres métodos seleccionados implican lisis con SDS seguida de desnaturalización y renaturalización selectiva del DNA plasmídico. Simultáneamente se analizaron con los mismos métodos las cepas de Escherichia coli transconjugantes, tanto las procedentes de las conjugaciones primarias, como las procedentes de las secundarias.

En los protocolos de extracción de DNA plasmídico más conocidos, se recomienda que las células sean cultivadas en medios sintéticos ricos tales como TSB o LB (Maniatis y cols., 1982; Crosa y Falkow, 1984; Willets, 1984). Sin embargo, tras los aislamientos preliminares realizados a partir de cultivos crecidos en LB de 4 y 18 horas, e independientemente del método utilizado, se optó por crecer las cepas en medio mínimo M9, con el fin de minimizar al máximo la contaminación de proteínas observada en los extractos y optimizar el rendimiento de la extracción.

Resulta interesante señalar que los procedimientos de extracción del DNA plasmídico de las cepas utilizadas como patrón en las extracciones (Escherichia coli V517, DF110) y de los Escherichia coli transconjugantes dieron resultados satisfactorios y repetitivos, independientemente del método utilizado, mientras que ninguno de los tres protocolos funcionó de modo reproducible en la extracción del DNA plasmídico de todas las cepas de vibrios ambientales estudiadas.

La observación de los minigeles de agarosa hizo pensar que la lisis era defectuosa en la mayor parte de los aislamientos, lo cual pudo confirmarse por visualización directa de las mezclas de sedimento celular y solución lítica al microscopio. Toranzo (comunicación personal) recomienda eliminar el EDTA de los tampones utilizados en la resuspensión y lisis, porque puede producir la disrupción prematura de las células de los vibrios, y en consecuencia, una contaminación inevitable de DNA cromosómico. Sin embargo, la sustitución en todos los casos del tampón TE por TS no solucionó el problema, ya que los resultados no fueron repetitivos. El método de Portnoy y White (Crosa y Falkow, 1984), rindió resultados reproducibles para los plásmidos de bajo peso molecular siempre y cuando el tampón utilizado fuese el TS. Únicamente cuando se siguió el método de Birnboim y Doly modificado por Silhavy y cols.(1984), eliminando la lisozima y el EDTA de los tampones, pudieron visualizarse tanto los plásmidos de alto peso molecular como los de bajo peso. En la Figura 6.2 se muestra un ejemplo en el que se aprecia claramente como la eliminación de ambos componentes permitió la visualización de los plásmidos de la cepa 18. En muchos casos fue necesaria la concentración hasta 3x de los extractos plasmídicos por precipitación combinada, para poder observar

los plásmidos de alto peso molecular. Otra ventaja que presenta este método es la mayor limpieza en la extracción ya que combina la acción de RNasa y proteinasa K. Por todo ello se seleccionó este procedimiento de aislamiento de DNA para comprobar la ausencia de plásmidos en las cepas a utilizar como receptoras en la experiencias de conjugación entre vibrios ambientales. Para el estudio del contenido plasmídico de los Escherichia coli transconjugantes se utilizó el método clásico de Birnboim y Doly modificado por Silhavy y cols. tal y como está descrito en el apartado de material y métodos. En la Tabla 6.11 se resumen los resultados obtenidos mediante aplicación de los tres métodos mencionados en 10 de las cepas estudiadas.

En la Tabla 6.12 aparece reflejado el contenido plasmídico de las cepas analizadas. Del total de 28 cepas portadoras de factores R, no pudo demostrarse en dos de ellas (7%) la presencia de plásmidos con los procedimientos utilizados. El 69% de las cepas fueron multiplasmídicas, llevando todas ellas un plásmido de alto peso molecular (35-74 Md) y más de uno de pequeño tamaño, concretamente entre 1.5-16 Md. Ocho cepas (31%) contenían un solo plásmido de alto peso molecular (74 Md) y todas excepto una presentaron un plásmido de peso molecular similar oscilando, según cepa y electroforesis, entre 72.3 y 74.7 Md. El análisis del contenido plasmídico de los transconjugantes (Figuras 6.3 y 6.4) obtenidos tras las conjugaciones primarias y secundarias, demostró la asociación entre un plásmido específico y el fenotipo de resistencia transferido (Tabla 6.12) no observándose en ningún caso la movilización de plásmidos no

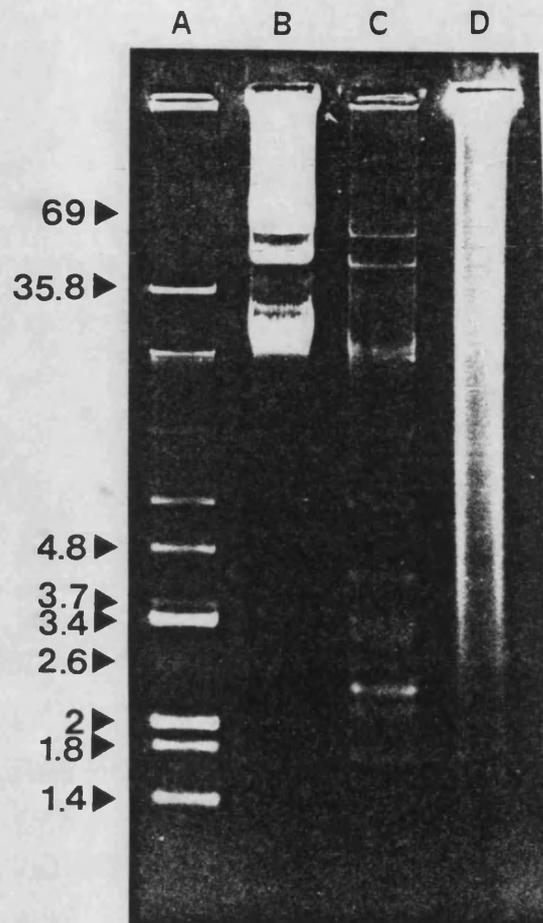


FIGURA 6.2. Electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0.75%. Se indican con una flecha los pesos moleculares (Md) de las bandas patrón. El método de obtención del DNA plasmídico fue el de Birnboim y Doly, modificado por Silhavy y cols. (1984), salvo en el caso de la carrera C en que se introdujeron las modificaciones especificadas en el texto. A, E. coli V517. B, mezcla de los extractos correspondientes a las cepas E. coli R64 y RP4. C y D V. cholerae 18.

TABLA 6.11. Número de bandas plasmídicas detectadas en las cepas ambientales de Vibrio cholerae por los tres métodos de extracción utilizados.

Cepa	Número de plásmidos presentes ^a	N° de bandas plasmídicas detectadas por el método de		
		Kado y Liu	Portnoy y White ^b	Birnboim y Doly ^c
E	2	1	1	2
5	2	1	1	2
18	9	2	6	9
24	2	-	ND	2
33	5	1	2	5
35	5	1	2	5
78	2	-	ND	2
153	4	3	2	4
214	2	1	1	2
244	2	1	1	2

a. El peso molecular de los plásmidos se indica en la Tabla 6.12.

b. El tampón utilizado fue el TS. ND, no determinado.

c. Método modificado por nosotros según se indica en el texto.

TABLA 6.12. Contenido plasmídico de las cepas analizadas. Plásmido R y fenotipo transferido.

Cepa donadora	Plásmidos contenidos (Md)	Plásmido transferido (Md)	Resistencias transferidas
255	74, 3.5	74	Am Ax F Km Sn
214	74, 16.0	74	Am Ax F Sn
244	74, 16.0	74	Am Ax F Sn
257	74	74	Am Ax F Sn
E	74, 16.0	74	Am Ax Sn
5	74, 33.5	74	Am Ax Sn
11	74	74	Am Ax Sn
33	74, 33.5, 11.4, 10.0, 7.5	74	Am Ax Sn
35	74, 33.5, 11.4, 10.0, 7.5	74	Am Ax Sn
247	74, 33.5	74	Am Ax Sn
252	74, 16.0	74	Am Ax Sn
256	74	74	Am Ax Sn
268	74	74	Am Ax Sn
82A	74, 3.5	74	Am Ax Sn
24	74, 33.5	74	Am Ax
78	74, 33.5	74	Am Ax
137	74	74	Am Ax
153	74, 33.5, 3.3, 2.8	74	Am Ax
155	74	74	Am Ax
98A	74, 3.5	74	Am Sn
210	35, 11.5, 10.0, 7.5	35	Am Sn
18	74, 35.8, 4.8, 3.8, 3.3, 2.7, 2, 1.8, 1.3	74	F Sn
147	74	74	F Sn
148	74, 33.5, 6.7, 6.0, 3.8, 3.2, 2.5, 2, 1.2	74	Sn
262	74, 29.4, 4.6	74	Sn
94	74	74	Sn

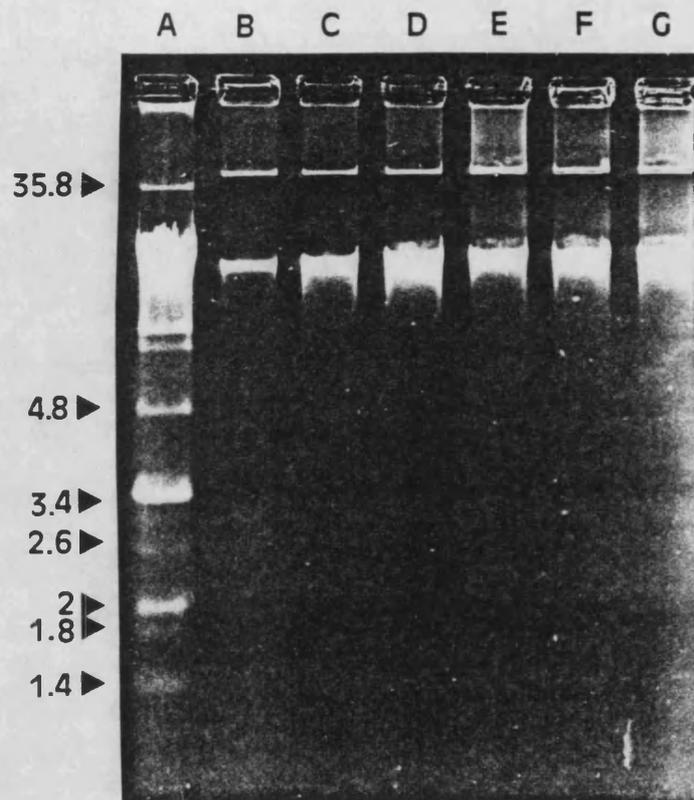


FIGURA 6.3. Electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0.75%. Se indican con una flecha los pesos moleculares (Md) de las bandas patrón. El método de obtención del DNA plasmídico fue el de Birnboim y Doly, modificado por Silhavy y cols. (1984). A, *E. coli* V517. El resto de las carreras corresponden a los transconjugantes obtenidos tras las conjugaciones primarias entre *V. cholerae* no O1 y *E. coli* K-12 185 NaI^r. B, T255; C, T214; D, T5; E, T35; F, T153; G, T18.

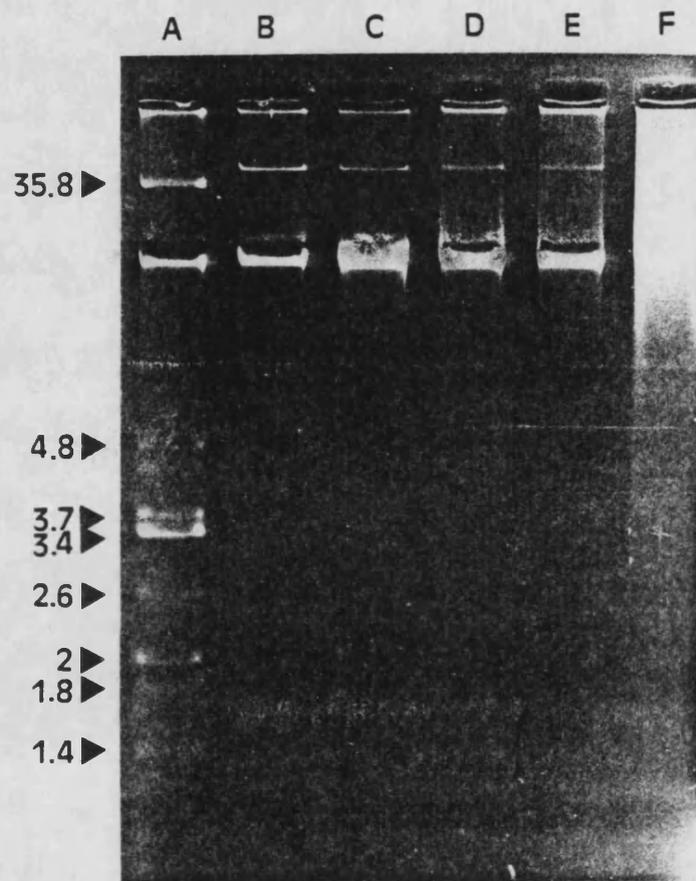


FIGURA 6.4. Electroforesis en gel horizontal de agarosa al 0.75%. Se indican con una flecha los pesos moleculares (Md) de las bandas patrón. El método de obtención del DNA plasmídico fue el de Birnboim y Doly, modificado por Silhavy y cols. (1984). A, E. coli V517. El resto de las carreras corresponden a los transconjugantes obtenidos tras las conjugaciones secundarias entre los transconjugantes primarios Nal^r y E. coli W 3110 Rif^r : B, T'5; C, T'35; D, T'78; E, T'153; F, T'255.

conjugativos. Asimismo se comprobó la ausencia de plásmidos en las cepas de Escherichia coli y Vibrio cholerae utilizadas como receptoras en los experimentos de conjugación. Salvo en la cepa 210 de Vibrio cholerae no 01, el plásmido R portador de las resistencias resultó ser el de peso molecular comprendido entre 72.3 y 74.7 Md. Por migración conjunta de los transconjugantes seleccionados en un mismo gel (Figura 6.3 y 6.4) se pudo comprobar que la distancia de migración del plásmido R (salvo la excepción mencionada) era idéntica en todos los casos por lo que se estimó su peso molecular como la media de las distintas determinaciones siendo de 74.176 ± 1.875 Md. El plásmido R de la cepa 210 tenía un peso molecular de 35 ± 0.5 Md (media de tres determinaciones independientes) codificando resistencias a Amp y Sn.

6.4. DISCUSION

Las aguas superficiales del lago estudiado se destinan a múltiples usos, entre ellos a la inundación de arrozales vecinos con fines de regadío, a la pesca y a diversas actividades de tipo recreativo. La simple presencia en el agua de elevados niveles de patógenos potenciales, como es el caso de la bacteria que nos ocupa, constituye de por sí un riesgo permanente para la salud pública, máxime si se considera que tales cepas pueden ser portadoras de resistencias a antibióticos rutinariamente utilizados en la terapéutica de infecciones bacterianas. Tal como se ha mencionado al principio del capítulo, en los últimos años se está produciendo un notable incremento en el aislamiento de cepas ambientales portadoras

de resistencias a uno o más antibióticos (Toranzo y cols., 1984; Alcaide y Garay, 1984; Walter y Vennes, 1985; Baya y cols., 1986), y muchas de ellas son capaces de transmitir las a otras bacterias (Mach y Grimes, 1982; Toranzo y cols., 1984; Aznar y cols., 1987), incrementándose la probabilidad de su adquisición por cepas patógenas. Por todo ello se ha considerado interesante investigar la incidencia de resistencias y su capacidad de transferencia entre las cepas ambientales de Vibrio cholerae seleccionadas. No existen apenas referencias bibliográficas de estudios de este tipo en la especie Vibrio cholerae, principalmente porque la mayoría de los trabajos se centran en las cepas patógenas de serovariedad O1 y parece ser que en estas cepas la presencia de factores R es un fenómeno poco frecuente dada su inestabilidad en este tipo de huéspedes (Glassman y cols., 1984).

Una vez sometidas las cepas seleccionadas a las pruebas de sensibilidad a antibióticos, lo primero que llama la atención es el elevado índice de cepas resistentes, muy superior al encontrado para otras especies aisladas de aguas superficiales naturales (Escherichia coli, Salmonella) aparentemente desprovistas de presión selectiva (Alcaide y Garay, 1984; Baya y cols., 1986; Goyal y Adams, 1984). Estas resistencias se han distribuido por igual entre las cepas aisladas de los diferentes puntos de muestreo, tanto de agua como de plancton, lo cual apoyaría la idea de que se trata de una misma población de bacterias que puede existir en dos formas, libre y adherida, ambas en equilibrio en el ecosistema acuático estudiado. Los patrones de resistencia encontrados, salvo la resistencia a fosfomicina, son

similares a los descritos para ésta y otras especies de Vibrio (Toranzo y cols., 1984; Barja y cols., 1987), predominando la resistencia a antibióticos B-lactámicos y sulfonamidas. Existe un porcentaje considerable de cepas resistentes a fosfomicina (18% del total de cepas analizadas), no habiendo referencias bibliográficas, hasta la fecha, de cepas de ésta y otras especies del género resistentes a este antibiótico. De acuerdo con lo encontrado por otros autores, ninguna de las cepas O1 de colección incluidas en el estudio resultó resistente a los antibióticos y concentraciones utilizadas. Únicamente la cepa no O1 de colección 11195 fue resistente a Am y Ax y, en consecuencia, se utilizó en los ensayos de transferencia.

La selección de un método de conjugación adecuado resultó fundamental en la optimización de la eficiencia de la conjugación. Toranzo y Barja (1985), en un estudio similar encontraron como método más efectivo el de conjugación en agar semisólido seguido de calentamiento de la mezcla de conjugación para permitir la siembra de las diluciones oportunas en el medio selectivo. En nuestro caso, el calentamiento de la muestra reducía considerablemente la eficiencia de la transferencia, por lo que se procedió a la homogeneización de las mezclas de conjugación según se describe en material y métodos. El resultado obtenido fue bastante similar al encontrado con el método de conjugación en medio líquido, por lo que se escogió este último al ser de mucho más fácil manejo. De hecho, más de un 90% de las cepas ensayadas con este método fueron capaces de transferir sus resistencias a las cepas de Escherichia coli seleccionadas, porcentaje que fue muy superior al encontrado por otros autores en ésta y otras

especies del género Vibrio, e incluso en distintas especies de enterobacterias (Alcaide y Garay, 1984; Toranzo y cols, 1984; Barja y cols., 1987). La cepa de colección 11195 no transfirió sus resistencias con ninguno de los métodos de conjugación utilizados. Es interesante destacar que la resistencia a fosfomicina fue transferible en el 100% de los casos y siempre a la vez que las resistencias a antibióticos B-lactámicos y/o sulfonamidas, transferencia que sólo había sido descrita en especies de enterobacterias de procedencia mayoritariamente clínica (Suárez y cols., 1987). En general, las frecuencias de conjugación obtenidas en el conjunto de los experimentos variaron en función de la cepa dentro de los rangos usualmente encontrados en este tipo de estudios, no pareciendo depender del fenotipo transferido.

El potencial de diseminación de los factores R, evaluado mediante experiencias de conjugación secundarias, resultó muy elevado ya que todos los transconjugantes fueron capaces de transferir sus resistencias con frecuencias en algunos casos muy superiores (de una a cinco unidades logarítmicas según la cepa) a las encontradas en las conjugaciones intergenéricas. Los valores de las frecuencias de conjugación fueron del orden de una a cuatro unidades logarítmicas más altos que los descritos por Toranzo y cols. (1984) en experiencias de conjugación similares. Evidentemente la naturaleza de la cepa utilizada como receptora en las experiencias de conjugación tiene gran influencia en la eficacia de la transferencia. De hecho, las experiencias de conjugación realizadas entre cepas seleccionadas de Vibrio cholerae no 01 dan frecuencias de conjugación

significativamente superiores a las encontradas en los cruces intergenéricos, y similares a las obtenidas en los ensayos de conjugación secundarios entre cepas de Escherichia coli. Mach y Grimes (1982) encontraron frecuencias del mismo orden al realizar las transferencias entre cultivos puros de cepas de una misma especie cultivadas en medios sintéticos ricos, como es el presente caso. Las diferencias en los valores de frecuencias de conjugación obtenidos parecen depender más bien de la cepa portadora que del factor R transferido, al igual que ocurría con los ensayos de conjugación Vibrio choleraexEscherichia coli y de acuerdo con los resultados obtenidos por Alcaide y Garay (1984) en cepas ambientales de Salmonella procedentes del mismo ecosistema. Esta elevada capacidad de transferencia de los factores R presentes en las cepas ambientales de Vibrio cholerae estudiadas, evidenciada incluso mediante conjugaciones intergenéricas, contrasta con la encontrada en estudios similares realizados, tanto con la misma especie, como con otras especies del género (Toranzo y cols., 1984; Barja y cols., 1987). Las cepas portadoras de factores R y los transconjugantes confirmados, así como las cepas utilizadas como receptoras en los experimentos de conjugación, fueron sometidas a análisis de su contenido plasmídico con el fin de relacionar los fenotipos transferidos y la presencia de plásmidos R.

El estudio de los plásmidos en cepas ambientales presenta serias dificultades relativas a la elección de un método adecuado de extracción de DNA plasmídico (Alcaide, 1985; Aznar y cols., 1987). Existen numerosas técnicas descritas como apropiadas para un amplio

rango de géneros bacterianos y, entre ellas, la de uso más extendido en el género Vibrio, es el procedimiento de extracción descrito por Kado y Liu (1981), y modificado por Toranzo y cols. (1983a). En nuestro caso, la eficiencia de la extracción dependió de la cepa utilizada en el ensayo y además sólo en un aislamiento se recuperaron de los extractos los plásmidos de peso molecular superior a 16 Md, los cuales habían sido evidenciados mediante otros procedimientos. Se siguió la lisis bacteriana al microscopio y se ensayaron distintas temperaturas y tiempos de incubación de la mezcla lítica, no encontrándose ninguna combinación efectiva. Además, muchas cepas se lisaban de modo incontrolado en el momento mismo de la resuspensión del pellet celular en la solución alcalina de SDS, por lo que una de las premisas más importantes de todo método de extracción de plásmidos, que es conseguir la ruptura celular de forma suave, no se cumplía. Toranzo y cols. (1983a, 1984), Barja y cols (1987), Freter y cols. (1983) y Mach y Grimes (1982) utilizaron este método en la detección de plásmidos de diferentes microorganismos con resultados satisfactorios. Sin embargo, Thomas (1984) señaló que con este método es difícil obtener resultados reproducibles y además que los rendimientos son pobres, tanto en la extracción de plásmidos pequeños, como en la extracción de plásmidos grandes. Davidson y Oliver (1986) tampoco lo encontraron efectivo en la extracción del DNA plasmídico de vibrios lactosa positivos. El hecho de que el método funcionase en las cepas de Escherichia coli utilizadas por nosotros como patrón de pesos moleculares y en los transconjugantes seleccionados, así como en cepas de otras especies del género Vibrio utilizadas como controles, hizo pensar que las deficiencias encontradas eran debidas a la naturaleza

de las cepas de Vibrio cholerae no O1 ambientales utilizadas en el estudio. Paralelamente se ensayó el método de Portnoy y White (Crosa y Falkow, 1984) que fue utilizado por Toranzo y cols. (1984) de modo satisfactorio en la extracción del DNA plasmídico de cepas pertenecientes a distintas especies del género Vibrio. Con este método tampoco se consiguió el aislamiento de los plásmidos de alto y bajo peso molecular en todos los casos, aunque la repetitividad en la recuperación de los plásmidos de peso molecular inferior a 16 Md fue mayor que la obtenida por el procedimiento de Kado y Liu, y no hubo problemas de lisis celular prematura. Dado que se admite que los plásmidos de alto peso molecular se encuentran en la cepa hospedadora en bajo número de copias, incluso una sólo, y que no pueden ser amplificables mediante el uso de sustancias inhibitoras de la síntesis proteica (Broda, 1979), se pensó en concentrar la muestra hasta tres veces por precipitación conjunta de los extractos de DNA. Sin embargo, el hecho de no haber podido observar en todos los casos los plásmidos de elevado peso molecular, permite sugerir que el problema podría radicar en la precipitación del DNA plasmídico de alto peso molecular junto con el DNA cromosómico, situación que ha sido descrita para otros métodos por otros investigadores (Alcaide, 1985).

El método de Birnboim y Doly, según la modificación de Silhavy y cols. así como otras introducidas por nosotros, fue el que rindió los resultados más fiables y el único con el que se pudieron observar los plásmidos de alto y bajo peso molecular. La eliminación de la lisozima y el EDTA previnieron la lisis prematura de los vibrios, mientras que la incubación con SDS a 0°C fue suficiente para producir la ruptura celular de modo suave. Resultados similares han

encontrado Davidson y Oliver (1986) en cepas ambientales de Vibrio vulnificus.

El análisis del contenido plasmídico de las cepas ambientales de Vibrio cholerae utilizadas como donadoras y de los transconjugantes demostró que, aunque la mayoría fueron multiplasmídicas, únicamente se transfería un plásmido por conjugación. Este resultó ser de idéntico peso molecular en 25 de las cepas estudiadas, aunque codificaba fenotipos de resistencia distintos según la cepa portadora. Barja y cols. (1987) han descrito un plásmido de 115 Md en cepas ambientales de Vibrio cholerae no O1 que también codifica para diferentes patrones de resistencia a antibióticos y sugieren que estas diferencias podrían haber sido generadas por procedimientos específicos de transposición y recombinación. Este tipo de procesos, que se describen con más detalle en la introducción del capítulo, junto con el intercambio de material genético entre bacterias, son la base de la evolución de genomas y organismos y han sido propuestos para explicar la génesis de los genes elt y tox de Escherichia coli y Vibrio cholerae respectivamente (Glassman y cols., 1984).

Existe una notable incidencia de plásmidos crípticos de bajo peso molecular (1.5-16 Md) entre las cepas de Vibrio cholerae ambientales analizadas, lo cual coincide con los resultados obtenidos por otros autores trabajando con cepas ambientales de ésta y otras especies del género Vibrio (Glassman y cols., 1984; Toranzo y cols., 1984; Hada y Sizemore, 1984; Davidson y Oliver, 1986).

No pudo demostrarse la presencia de plásmidos en la cepa de colección 11195 que, a su vez, no transfirió sus resistencias por

conjugación, por lo que, o bien son de naturaleza cromosómica, o bien residen en plásmidos no conjugativos que no pudieron visualizarse con los métodos de extracción utilizados.

Las cepas de Vibrio cholerae estudiadas proceden de aguas superficiales hipereutróficas con un elevado índice de contaminación (Oltra y Miracle, 1984) dando recuentos de bacterias totales lo suficientemente altos (García Bayo, 1983) como para permitir la proximidad física que se requeriría en todo proceso de transferencia de material genético. No hay que olvidar tampoco que este tipo de aguas contiene gran cantidad de materia en suspensión (viva y no viva) a la cual se encuentran adheridos, y por tanto próximos, representantes de gran variedad de géneros bacterianos. De hecho, trabajos realizados en nuestro laboratorio con cepas ambientales de distintas especies de enterobacterias, demuestran el aumento notable de cepas resistentes y el amplio rango de géneros bacterianos portadores de estas resistencias (Alcaide y Garay, 1984; Aznar y cols., 1987). Un porcentaje considerable de las cepas de Vibrio cholerae estudiadas en el presente trabajo contiene plásmidos R que pueden ser transferidos eficazmente intraespecíficamente e, incluso, intergenéricamente.

Resulta complejo explicar la persistencia de tales plásmidos en un ambiente aparentemente desprovisto de presión selectiva como es un agua superficial natural. No obstante el peso molecular elevado de casi todos ellos, indica que, aparte de las funciones conocidas de resistencia y transferencia, pueden albergar otras que mejoren las

posibilidades de supervivencia de la célula hospedadora.

Con el fin de poder conocer parte del fenotipo que podría estar codificado en estos plásmidos, los transconjugantes y las cepas de Escherichia coli control fueron sometidos a los estudios que se indican en el siguiente apartado.

7. PROPIEDADES RELACIONADAS CON LA VIRULENCIA: ACTIVIDAD ENZIMATICA, HEMOLITICA Y CITOTOXICA

7.1. INTRODUCCION

A lo largo del presente estudio se ha venido haciendo hincapié en la naturaleza autóctona de la especie Vibrio cholerae en los ecosistemas acuáticos, sin discriminar en función del serotipo. Sin embargo, algunos investigadores siguen postulando que Vibrio cholerae O1 es de origen humano, transmitiéndose por contaminación fecal al agua y alimentos (Blake y cols., 1980), mientras que otros autores sostienen la hipótesis, compartida por nosotros, de que la especie es un miembro más de las poblaciones bacterianas heterótrofas acuáticas (Colwell, 1984). En este último caso, las cepas patógenas de la especie podrían desarrollar la enfermedad en humanos susceptibles, accidentalmente expuestos a dosis infectivas, independientemente de su serotipo. En este sentido, gran número de trabajos, más o menos recientes, concluyen que la serología no es un indicador de patogeneidad, ya que se han aislado en diferentes áreas geográficas del mundo cepas no O1 patógenas y, en contrapartida, O1 no patógenas (Kaper y cols., 1979, 1981; Craig y cols., 1981; Roberts y cols., 1982). Muy poco se discute, sin embargo, sobre la presencia ubicua de la serovariedad no O1 en los ambientes acuáticos, donde es lícito suponer que las cepas toxigénicas también podrían ser patógenas de animales propios de tales ecosistemas. Así, Vibrio cholerae no O1 ha sido aislado de peces enfermos y se ha confirmado, mediante infección

artificial de peces sanos, que puede causar la muerte del animal (Muroga y cols, 1979; Yamanoi y cols., 1980).

De los estudios realizados por Blake y cols. (1980), Nishibuchi y cols. (1983), Yamamoto y cols., (1983) y Barja y cols. (1987), entre muchos otros, puede deducirse que Vibrio cholerae produce una gran variedad de factores de virulencia, independientemente de la conocida toxina colérica, que no están necesariamente correlacionados entre sí. Más aún, ya Nishibuchi y cols. (1983) apuntaron que ninguno de los modelos in vivo, clásicamente utilizados en la evaluación de la patogeneidad de las cepas, puede predecir el posible comportamiento de la misma como patógena en el hombre. Es evidente por tanto, que el potencial patógeno de la especie depende no sólo del reservorio genético, cromosómico y no cromosómico, de la misma, sino también de la naturaleza intrínseca del huésped infectado. Por todo ello, el ánimo del presente trabajo ha sido el estudio de distintos factores de virulencia expresados por las cepas ambientales de la especie, y la evaluación mediante un modelo in vitro, y por tanto controlable, del potencial citotóxico de las mismas.

Entre los distintos factores de virulencia asociados con la especie, se ha abordado en los capítulos anteriores el estudio de la expresión de hemaglutininas (solubles y asociadas) y su relación con la hidrofobicidad de superficie, así como de la producción de compuestos quelantes del ión férrico. Ambos se han relacionado con determinadas proteínas de la superficie celular, intentándose siempre

dar un enfoque al trabajo que recordase la naturaleza ambiental, y no clínica, de los aislamientos estudiados. El presente apartado se ha centrado en el conocimiento de otros factores de virulencia relacionados con el microorganismo que nos ocupa y que, a su vez, son propios de otras especies bacterianas ubicuas de ecosistemas acuáticos (Santos y cols., 1987).

Estos son:

- producción de enzimas extracelulares
- producción de hemolisinas
- citotoxicidad, evaluada tanto sobre líneas celulares de animales homeotermos como sobre poiquilotermos.

7.2. MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en el estudio se reflejan en la Tabla 5.2 del capítulo 5. Cada una de ellas se sembró en TSB, a partir de medio de conservación, y se incubó a 37°C durante 18 h, siendo sometida a los ensayos que se indican a continuación.

Actividades enzimáticas

Se utilizó la técnica cuantitativa de ensayo en placa descrita por Hsu y cols., (1981) para comprobar la actividad enzimática de las

cepas sobre los siguientes sustratos: caseína, gelatina, almidón, esculina, Tween 80 (Sigma) y yema de huevo. A partir de cultivos de 18 h sobre TSA, se sembraron, por duplicado, placas con el correspondiente sustrato, que se incubaron a 37°C durante 18-36 h. En cada caso se calculó la relación entre los diámetros de la zona de reacción y el tamaño colonial (Hsu y cols., 1981). Puesto que la relación fue bastante constante, se consideró que la media de las dos medidas efectuadas por cepa constituía un índice aceptable de la actividad enzimática extracelular (Hsu y cols., 1981). El medio para cada prueba se describe en el apartado correspondiente del capítulo.

Actividad hemolítica

Se realizó según la metodología descrita en el apartado anterior, sobre agar CDC (Lennette y cols., 1980) suplementado con un 5% de eritrocitos humanos y de pollo. Las cepas se sembraron, por duplicado, a partir de placas de TSA de 18 h, y fueron incubadas durante 18 y 36 h, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Sakazaki y Balows, 1981). Asimismo se midieron las relaciones entre la zona de lisis y el diámetro colonial.

Análisis estadístico

Los resultados cuantificados de los análisis enzimáticos y hemolíticos fueron sometidos a un análisis de regresión múltiple

mediante la utilización del programa 2R del paquete estadístico BMDP (Afifi y Azen, 1979).

Actividad citotóxica de los sobrenadantes de cultivo

Se ensayó la actividad citotóxica de los sobrenadantes de cultivo (TSB), filtrados, de 25 cepas de Vibrio cholerae no 01 seleccionadas y siete cepas de EC K-12 185 transconjugantes (Tabla 7.3) sobre líneas celulares de

- animales poiquilotermos: CHSE-214 (embrión de salmón chino) y FHM ("fathead minnow peduncle"),
- animales homeotermos: L-929 (fibroblastos de pulmón de ratón).

La metodología empleada en su mantenimiento y conservación es esencialmente la descrita por Kuchler (1977) y Toranzo (1980). Las células eucarióticas se mantienen de forma rutinaria en frascos de cultivo celular de 75 cm² de superficie o en botellas Roux de 150 cm² (Falcon, Oxnard, CA, USA), utilizándose como medio de crecimiento el Medio Esencial Mínimo (MEM) de Eagle (1959), con Solución Salina Earle (Microbiological Associates, Walkersville, USA) y suplementado con aminoácidos y antibióticos de la forma que se indica en el penúltimo apartado de Material y Métodos.

Previamente a los ensayos, las células eucarióticas se cultivaron como monocapas en placas de 24 pocillos de fondo plano (COSTAR). Las líneas CHSE-214 y FHM se incubaron en medio L-15 de Leibovitz (1977) a 16°C y 25°C respectivamente, y la línea L-929 en

MEM de Eagle a 37°C y en atmósfera húmeda controlada, conteniendo un 5% de CO₂.

La razón de la utilización de un medio u otro estriba en que el L-15 es adecuado para sistemas de cultivo abiertos, donde se produce un intercambio libre de gases con la atmósfera. Su composición y ventajas frente al MEM de Eagle se indican en el apartado de Medios de cultivo.

Las pruebas se realizaron según la metodología descrita por Toranzo y cols. (1983b). Inmediatamente antes del ensayo se decantó el contenido de los pocillos y se reemplazó por 0.9 ml del correspondiente medio fresco. A continuación las monocapas celulares se inocularon con 0.1 ml de los sobrenadantes de cultivo realizadas en el mismo medio. Se utilizaron como pocillos control monocapas celulares incubadas con 0.1 ml de medio TSB fresco. Las placas de las líneas celulares de pez se incubaron a 18°C y las de animal homeotermo a 37°C, ambas durante 36 h, efectuándose observaciones periódicas a partir de las dos primeras horas. Se consideró que los sobrenadantes ejercían un efecto citotóxico positivo cuando en los correspondientes pocillos se observó una destrucción total o parcial de las monocapas celulares, estableciéndose tres grados de positividad: +, aparición de síntomas claros de daños celulares; ++, destrucción parcial del tapiz de células; +++, destrucción total, es decir, redondeo de las células y desprendimiento del fondo del pocillo. Se inocularon también las muestras calentadas a 60 y 80 °C durante 15 min. Las cepas utilizadas como controles positivos y negativos se detallan en la Tabla 7.3.

Medios de cultivo y reactivos

- Medios de cultivo

a) Medios para la detección de actividades enzimáticas

Medio para la hidrólisis de esculina

Triptona	1.0%
Esculina	0.1%
NaCl	1.0%
Citrato férrico	0.05%
Agar Bacteriológico	1.5%
Agua destilada	
pH 7.0	

Esterilización: 115°C, 10 min.

La incubación se realiza durante 1 semana y las zonas de reacción se detectan por oscurecimiento alrededor de las colonias.

Medio para la detección de amilasas (West y Colwell, 1984)

Peptona	1.0%
Extracto de carne	1.0%
Almidón soluble	0.1%
Agar Bacteriológico	1.5%
Agua destilada	
pH 7.4	

Esterilización: 115°C, 25 min.

La incubación se efectúa durante dos días y las zonas de reacción se detectan como aclaramientos alrededor de las colonias, tras añadir a la placa reactivo de lugol.

Medio para la detección de caseinasas (Gerhardt y cols. 1981)

Solución de leche descremada 50%	20 ml
Agar nutritivo (2X)	80 ml

Esterilización: por separado, la solución de leche a 115°C, 25 min, y el NA a 121°C, 20 min.

La incubación se efectúa durante 1 semana y las zo-

nas de reacción se detectan como aclaramientos alrededor de las colonias.

Medio para la detección de DNasas (West y Colwell, 1984)

Agar DNasa (Oxoid)

Incubar de 2- 7 días. Las zonas de reacción positiva corresponden a los aclaramientos producidos alrededor de las colonias, tras añadir HCl 1M.

Medio para la detección de gelatinasas (West y Colwell 1984)

Peptona	0.4%
Extracto de levadura	0.1%
Gelatina	1.5%
NaCl	1.0%
Agar Bacteriológico	1.5%

pH 7.4

Esterilización: 121°C, 20 min

La actividad gelatinásica se observa por la aparición de opacidad alrededor de las colonias.

Medio para la detección de lipasas (West y Colwell, 1984)

Peptona	1.00%
NaCl	1.00%
CaCl ₂ .H ₂ O	0.01%
Agar Bacteriológico	2.00%

pH 7.4

Esterilización: 121°C, 20 min

Añadir Tween 80 (Sigma) a una concentración final de 1%. Incubar 1-7 días. La actividad lipásica se observa por la aparición de opacidad alrededor de las colonias.

Medio para la detección de lecitinasas (West y Colwell, 1984)

Emulsión de yema de huevo (Oxoid)	10%
Agar nutritivo	100ml

Incubar de 1 a 7 días. La aparición de una densa opacidad alrededor de las colonias se considera como

actividad fosfolipásica positiva.

b) Medio para la detección de actividad hemolítica

Medio agar sangre CDC (Lennette y cols., 1980)

Agar Triptona-Soja	4.0%
Agar Bacteriológico	0.5%
Extracto de levadura	0.5%
Hemina	0.0005%
L-cisteína	0.04%
Solución de vitamina K1	1ml

pH 7.5

Disolver la hemina y la L-cisteína en 5 ml de NaOH 1N antes de añadir el resto de ingredientes. La solución de vitamina K1 (ICN, Cleveland Ohio) se prepara añadiendo 1 g de vitamina K1 a 99 ml de etanol absoluto.

Disolver los ingredientes calentando la mezcla y tras ajustar el pH, autoclavar a 121°C, 20 min. Enfriar a 50°C y añadir sangre (humana o de pollo) desfibrinada. La incubación se efectúa por duplicado en aerobiosis y anaerobiosis.

c) Medios para el cultivo de las líneas celulares:

Medio Mínimo de Eagle (1959) suplementado con:

Bicarbonato sódico	0.18%
Aminoácidos no esenciales (Flow, lab. Rockville, MD, USA)	10 ml
Suero fetal de ternera (Flow)	10 ml
Antibióticos:	
Penicilina (Flow)	100 UI/ml
Estreptomina (Flow)	100 µg/ml
Anfotericina B (Squibb, Princeton, N.J., USA)	2 µg/ml
Gentamicina (Shering Corp., Kenilworth, N.J., USA)	50 µg/ml

pH 7.2

El medio de renovación es MEM con 2% de suero fetal de ternera (MEM-2).

Medio L-15 de Leibovitz (1977) (Microbiological Associates) suplementado con:

L- glutamina (Flow) 200 mM	1 ml
Suero fetal de ternera	10 ml

Antibióticos:

Penicilina	100 UI/ml
Estreptomycin	100 ug/ml
Anfotericina B	2 ug/ml
Gentamicina	50 ug/ml

pH 7.2

Este medio presenta las siguientes ventajas:

- Se usa la L-arginina como tampón, en lugar del bicarbonato, lo que evita la elevación del pH por formación de CO₂.
- Se sustituye la glucosa por D-galactosa, piruvato sódico y L-alanina como fuentes de energía, lo que favorece una menor frecuencia de renovación.
- Se utiliza la cantidad máxima de aminoácidos esenciales, no tóxica para la célula, lo que evita su rápida desaparición durante el crecimiento celular
- Evita la necesidad de incubadores de CO₂.

- Reactivos

Lugol para la lectura de las amilasas

Iodo	1g
Ioduro potásico	2g
Agua destilada	300ml

Condiciones de cultivo de las líneas celulares:
individualización y conservación celular

a) Condiciones de cultivo

Células de animales homeotermos: Se incuban a 37°C, realizándose subcultivos (razón 1:4-1:5) y una renovación del medio de cultivo, ambos cada 6-7 días.

Células de animales poiquilotermos:

CHSE-214: Se mantienen a 15°C, efectuándose subcultivos cada 10-15 días (razón 1:3-1:4).

FHM: Se mantienen a 25-30°C, haciéndose subcultivos cada 5-7 días (razón 1:4-1:5).

b) Individualización celular

Se llevó a cabo con una solución de tripsina-verseno, conteniendo 0.25% de tripsina y 0.02% de EDTA-Na₂, ajustada a pH 7.8 y siguiendo los métodos de tripsinización de Kuchler (1977). La solución de tripsina se prepara diluyendo el preparado comercial (10x) (Flow) con PBS (véase Material y Métodos del capítulo 3) libre de calcio y magnesio.

c) Conservación celular

Las líneas celulares se conservan congeladas a -70°C y/o -190°C, utilizándose como agente crío-protector dimetil sulfóxido (Aldrich, Chemical Comp. Inc. Milwaukee, Wis., USA), empleándose la metodología de congelación-descongelación recomendada por la ATCC.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSION

Actividades enzimáticas y hemolíticas

Se ha estudiado la actividad enzimática extracelular de las cepas de Vibrio cholerae 01 y no 01 que se detallan en la Tabla 5.2 del capítulo 5. Se incluyeron como controles negativos cepas de Vibrio sp, procedentes de aislamientos ambientales, sin actividad enzimática frente a los sustratos seleccionados. Se determinó la relación

halo/colonia correspondiente a cada cepa y se calculó la media de dos determinaciones independientes (Hsu y cols., 1981), estableciéndose el siguiente criterio: actividad positiva, relación ≥ 1.5 ; actividad variable, $1.1 \leq \text{relación} < 1.5$; actividad negativa, $1.1 > \text{relación}$. Los resultados obtenidos, así como los valores de significación (S) de las pruebas (Rypka, 1967) se resumen en la Tabla 7.1. Es de destacar que el 100% de cepas estudiadas presentaron actividad amilásica y más del 90% actividad gelatinásica y desoxirribonucleásica, mientras que sólo el 18% fueron capaces de hidrolizar la esculina, encontrándose mayor variación en el resto de las pruebas. Los valores S confirmaron que las pruebas más discriminantes eran la hidrólisis de caseína, hidrólisis de esculina, actividad lecitinásica y lipásica respectivamente, mientras que el resto de pruebas tuvieron escaso o nulo valor en la diferenciación entre las cepas. Estos resultados son bastante similares a los encontrados por Hsu y cols. (1981) en Aeromonas hydrophila. No se pudieron diferenciar grupos entre las cepas ambientales en función del tipo de muestra y producción y/o ausencia de un tipo concreto de actividad enzimática. Este hallazgo vuelve a confirmar la hipótesis que ha venido sugiriéndose en los distintos capítulos sobre la pertenencia de los vibrios estudiados a una misma población de bacterias. En la Figura 7.1 se presenta la distribución de los distintos tipos de actividades encontrados en función de la relación halo/colonia. Hay que resaltar que las cepas O1 de origen clínico, incluidas como controles, no hidrolizaron la caseína ni la esculina, encontrándose sus restantes actividades enzimáticas dentro de los rangos establecidos para las cepas no O1 ambientales más frecuentemente representados. Sin embargo, la cepa no

TABLA 7.1. Actividad enzimática y hemolítica de las cepas de Vibrio cholerae estudiadas. Se indica entre paréntesis el porcentaje de cepas respecto al total. Positivo, razón halo/colonia ≥ 1.5 ; Variable, $1.1 < \text{razón halo/colonia} < 1.5$; Negativo, razón halo/colonia < 1.1

	Positivo	Variable	Negativo	Valor S ^a
Caseinasa	50(34%)	21(15%)	75(51%)	3750
Lipasa	100(69%)	27(18%)	19(13%)	1900
Lecitinasa	99(68%)	26(17%)	21(14%)	2079
Esculina	26(18%)	11(7%)	109(75%)	2573
Gelatinasa	144(99%)	0	2(1%)	288
Amilasa	146(100%)	0	0	0
DNasa	138(95%)	8(5%)	0	0
Hemólisis I ^b	134(92%)	7(5%)	5(3%)	670
Hemólisis II ^c	128(88%)	6(4%)	12(8%)	1536

a. Valor de significación de la prueba, calculado como el producto del número de cepas positivas y negativas.

b. Hemólisis de eritrocitos de pollo.

c. Hemólisis de eritrocitos humanos

TABLA 7.2. Correlación entre las actividades enzimáticas encontradas. Se indica con un asterisco los valores significativos ($p < 0.01$).

	Caseinasa	Lipasa	Lecitinasa	Esculina	Gelatinasa	Amilasa	DNasa
Caseinasa	1.00	0.11	0.13	-0.03	0.55*	0.00	0.03
Lipasa		1.00	0.83*	0.02	0.06	0.00	0.00
Lecitinasa			1.00	0.03	0.05	0.00	0.01
Esculina				1.00	-0.13	0.00	0.13
Gelatinasa					1.00	0.00	0.09
Amilasa						1.00	0.00
DNasa							1.00

01, de origen clínico, 11195 ATCC fue activa frente a todos los sustratos, hidrolizando la esculina, el Tween 80 y la yema de huevo con valores halo/colonia superiores a 3. El análisis de regresión múltiple de los datos (Tabla 7.2) reveló que las actividades lipásica y fosfolipásica presentaban un elevado índice de correlación, seguido del encontrado entre la hidrólisis de gelatina y caseína, lo que sugiere que, o bien son producidas por el mismo enzima, o bien se expresan en la célula de forma coordinada. Este último resultado es descrito por Hsu y cols. (1981) y Santos y cols. (1987) en cepas de Aeromonas spp. Se ha relacionado la actividad proteásica de la especie con la virulencia del microorganismo. En este sentido se ha demostrado que cepas mutantes de Vibrio cholerae deficientes en actividad proteásica pierden al mismo tiempo su virulencia, por lo que la expresión de estas enzimas constituye un factor de patogeneidad más (Baselski y cols., 1978). Se postula que la/s proteasa/s están implicadas en el mantenimiento o crecimiento de la bacteria sobre los tejidos del organismo huésped (Schneider y Parker, 1978; Schneider y cols., 1981). Sin embargo, al igual que en nuestro caso, se han encontrado actividades similares en las cepas ambientales de la especie lo que supone que su papel debe extenderse a otros ambientes distintos del interior del cuerpo de hombres y animales (Young y Broadbent, 1982). La proteasa/s caracterizada por Young y Broadbent (1982) presenta una amplia especificidad de sustrato y se postula que interviene en el proceso de activación de la toxina colérica y en la degradación de inmunoglobulinas y mucinas protectoras del epitelio intestinal. No se encontró ningún tipo de relación entre el resto de actividades enzimáticas estudiadas, lo que sugiere que se trata de

actividades independientes. De todas ellas, únicamente la actividad amilásica ha sido relacionada con la virulencia de Vibrio cholerae (Baselski y cols., 1978).

La comparación de las placas de CDC incubadas en aerobiosis y anaerobiosis (Sakazaki y Balows, 1981) reveló que en este último caso los halos encontrados alrededor de las colonias correspondían a B-hemólisis, quedando drásticamente reducidas las actividades hemodigestivas de las cepas que pueden interferir en la lectura de la prueba (Figura 7.2). Por esta razón se cuantificó la capacidad hemolítica sobre las placas incubadas en anaerobiosis, aplicándose el mismo tipo de valoración que a las actividades enzimáticas (Hsu y cols., 1981). Los resultados encontrados aparecen en la Tabla 7.1. La mayor parte de las cepas presentaron actividad hemolítica de eritrocitos humanos y de pollo. En la Figura 7.3 queda reflejada la distribución de las cepas en función de las relaciones halo/colonia encontradas. Todas las cepas de origen clínico, O1 y no O1, fueron hemolíticas, correspondiendo sus actividades a los valores más frecuentes encontrados para las cepas ambientales. El análisis de regresión entre los datos de capacidad hemolítica frente a los dos tipos de eritrocitos estudiados, reveló que ambas actividades estaban significativamente correlacionadas ($r=0.69$, $p < 0.01$), lo que podría suponer que son producidas por una misma hemolisina. Asimismo, se encontró una correlación significativa entre las actividades lipásicas y fosfolipásicas y la lisis de ambos tipos de eritrocitos ($r=0.45-0.50$), lo que implicaría que además de la/s hemolisina/s, las

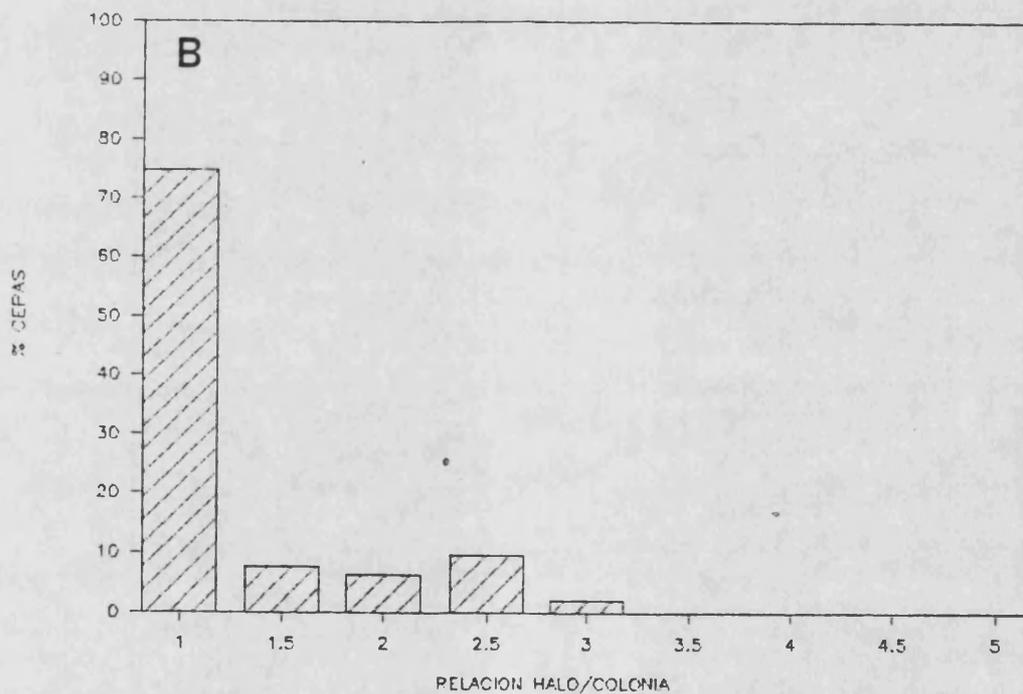
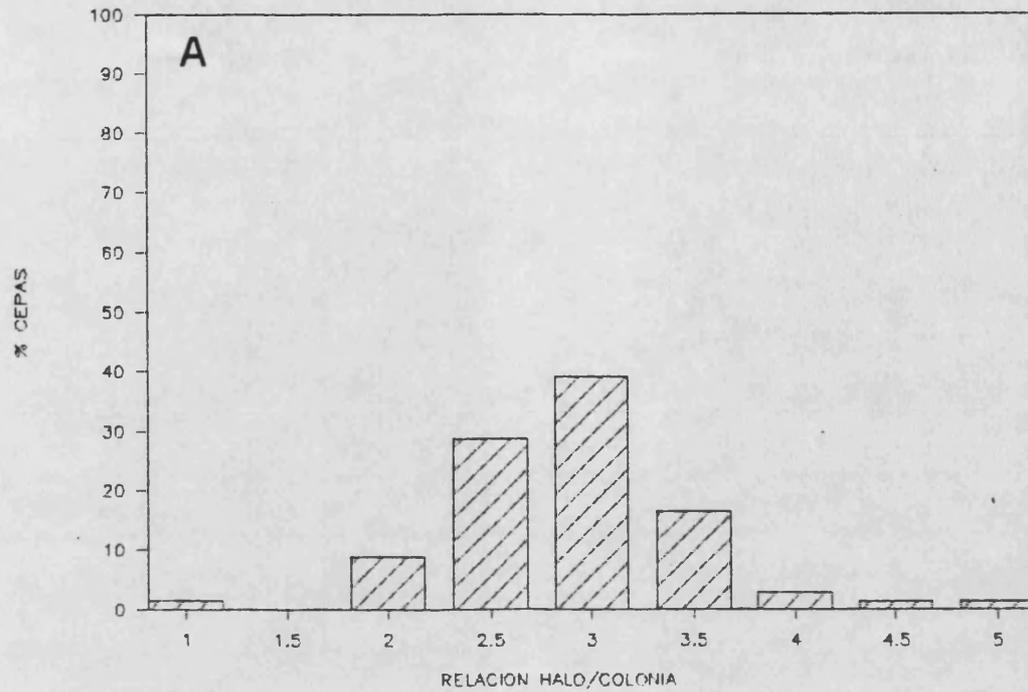
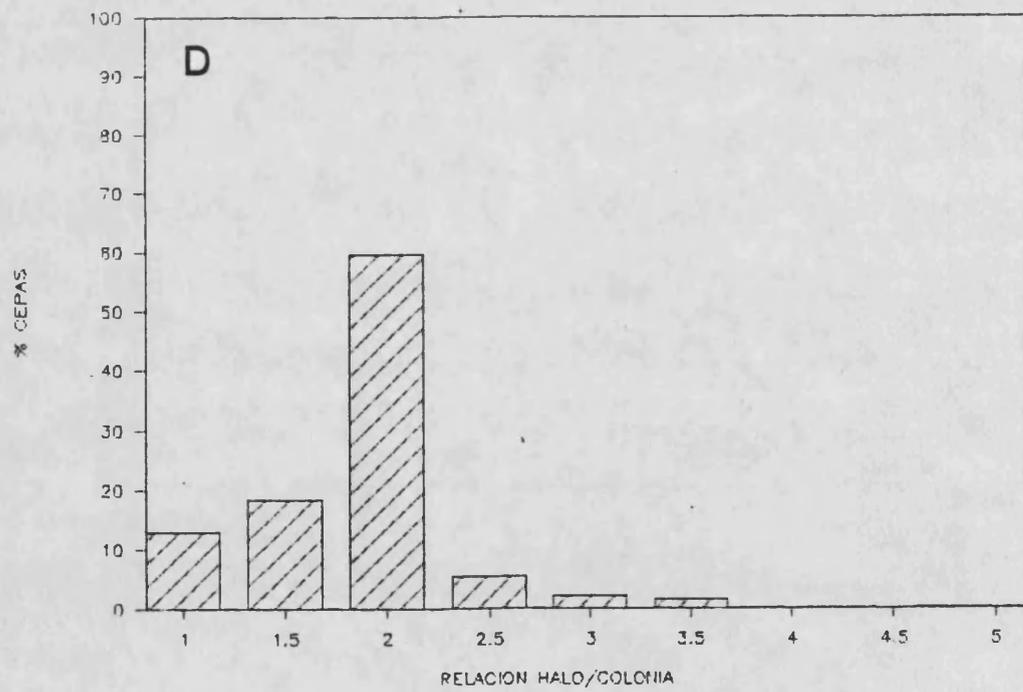
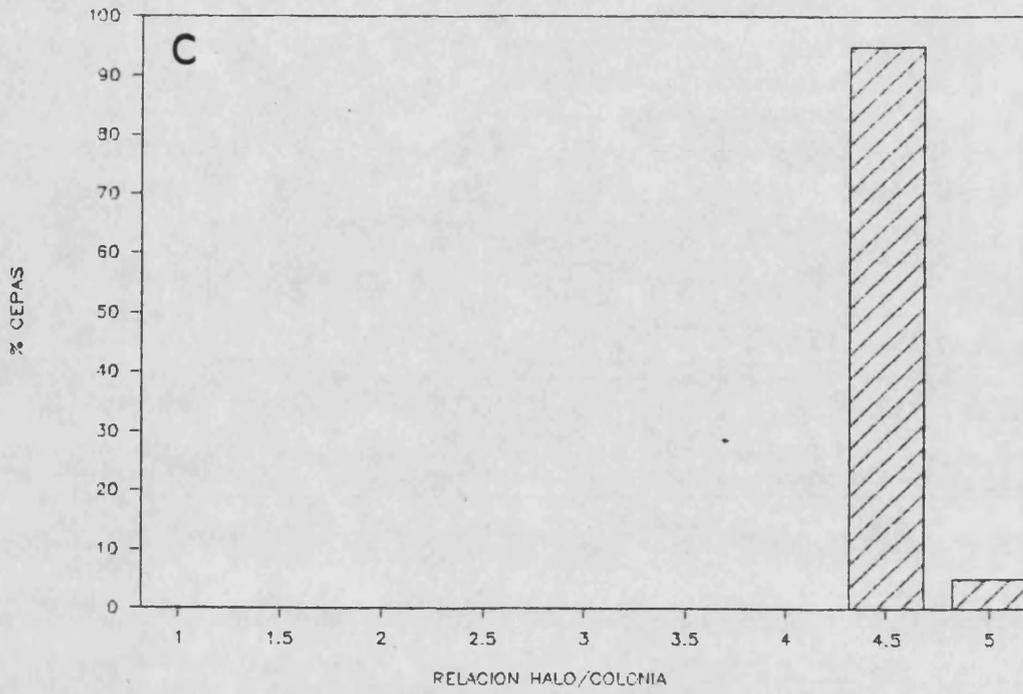
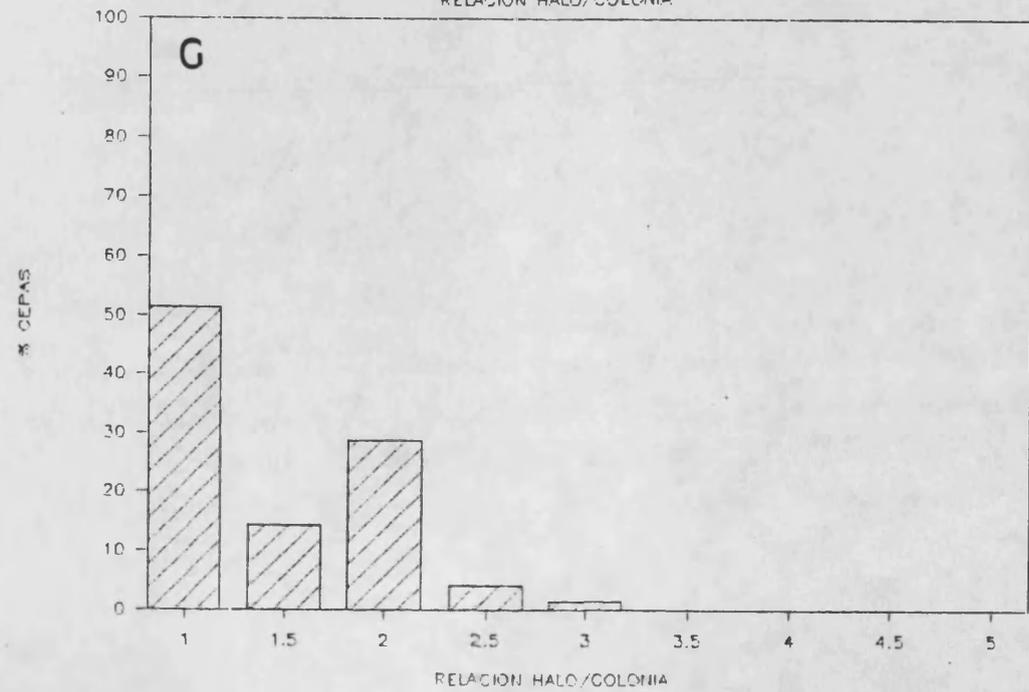
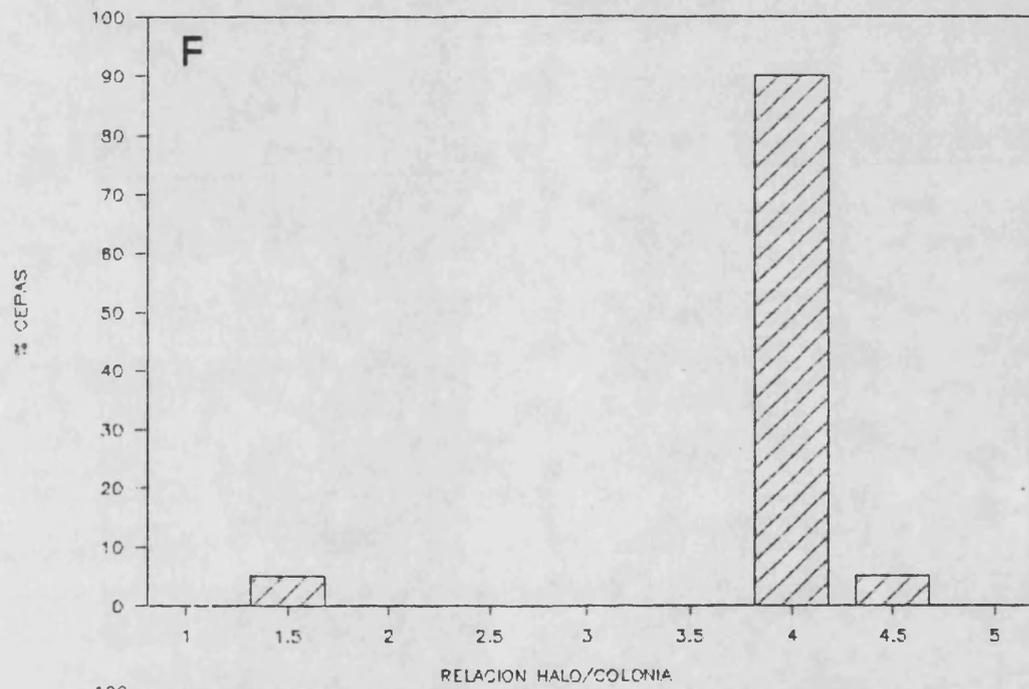
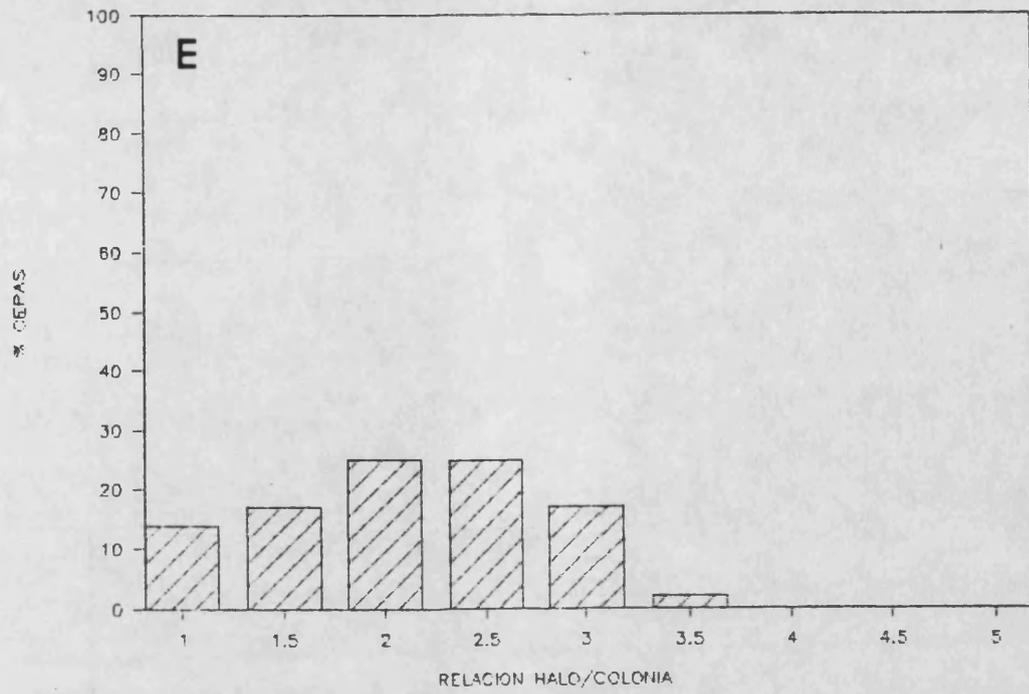


FIGURA 7.1. Distribución de las cepas (%) en función de sus actividades enzimáticas (relación halo/colonia). A, hidrólisis de gelatina; B, hidrólisis de esculina; C, hidrólisis de almidón; D, hidrólisis de Tween 80; E, hidrólisis de yema de huevo; F, hidrólisis de DNA; G, hidrólisis de caseína. La Figura continúa en las dos páginas siguientes.





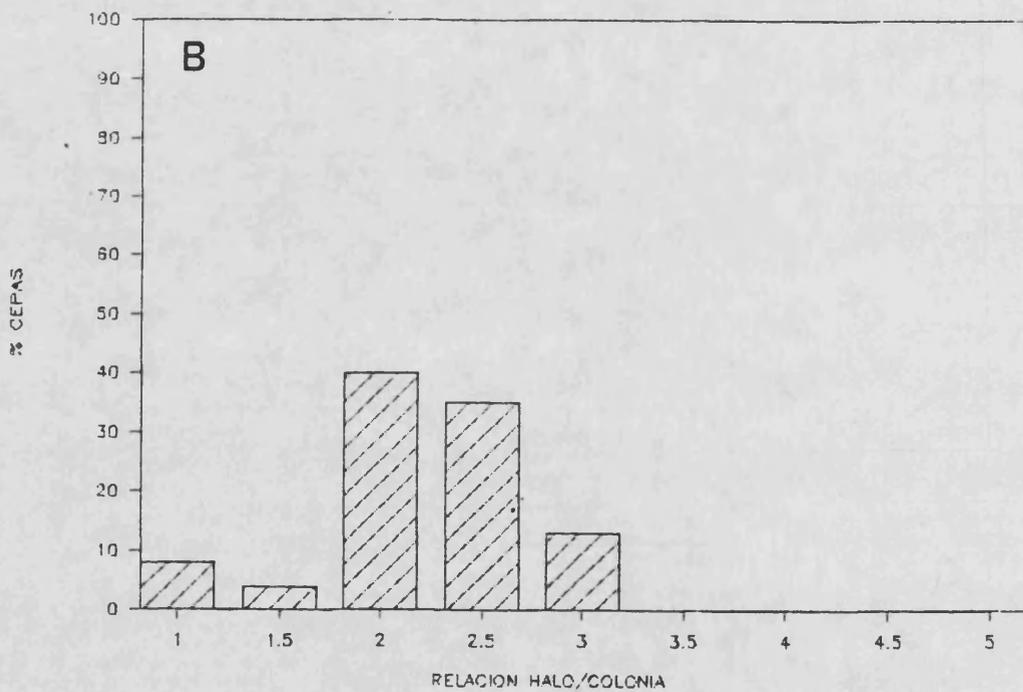
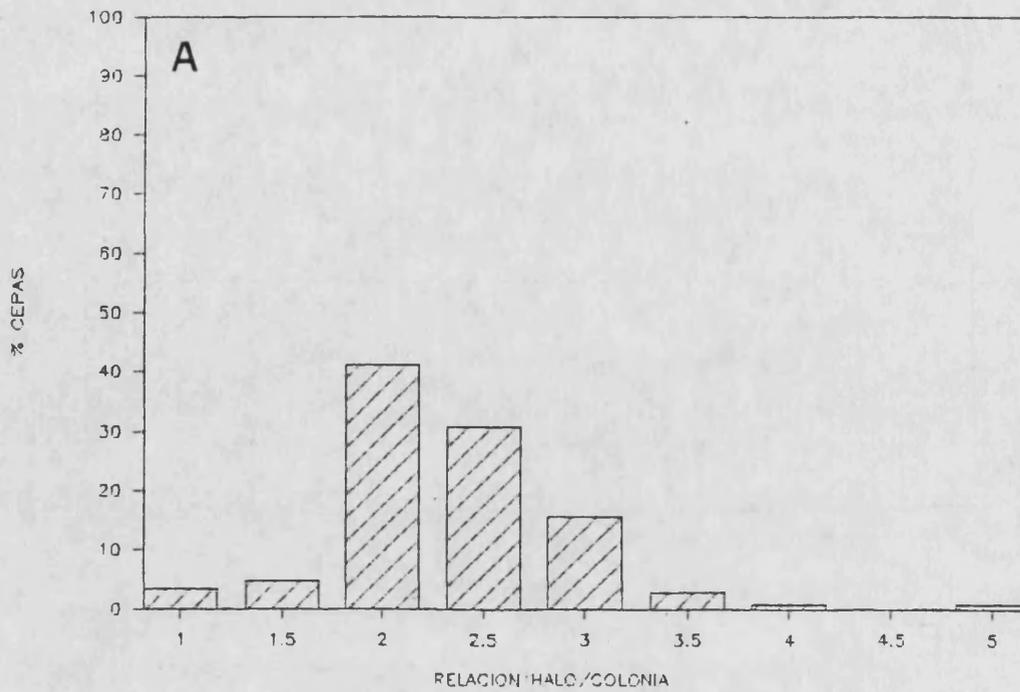


FIGURA 7.2 Distribución de las cepas estudiadas (%) en función de sus actividades hemolíticas (relación halo/colonia). A, hemolisis de eritrocitos de pollo; B, hemolisis de eritrocitos humanos.

lipasas y fosfolipasas podrían contribuir en la lisis, probablemente por degradación de la membrana del glóbulo rojo. Algunos autores proponen que las hemolisinas son citolisinas de amplio espectro de acción celular, pudiendo, entre otras, destruir células del epitelio intestinal (Yoh y cols., 1985; Kothary y Kreger, 1985). En este sentido, la actividad hemolítica junto con el resto de actividades enzimáticas estudiadas, se relacionaría con los síntomas asociados a las denominadas "infecciones no coléricas", producidas por Vibrio cholerae no 01 (Yoh y cols., 1985). Sin embargo, no se puede establecer en el género Vibrio una relación clara entre producción de hemolisina/s y patogeneidad (Toranzo y cols., 1983b; Barja y cols., 1987), aunque se sabe que la mayor parte de los aislamientos clínicos de Vibrio cholerae no 01 son altamente hemolíticos (Yamamoto y cols., 1984).

Actividad citotóxica de los productos extracelulares sobre líneas celulares de homeotermos y poiquilotermos

Se ha estudiado la toxicidad de los productos excretados por cepas de Vibrio cholerae no 01 escogidas al azar, según la metodología que se indica en el apartado de Material y Métodos. Se utilizaron tanto líneas celulares de homeotermos como líneas celulares de poiquilotermos, y en este último caso se escogieron células de peces de aguas cálidas (FHM) y frías (CHSE-214). Los resultados se resumen en la Tabla 7.3. De las 25 cepas seleccionadas, prácticamente el 80% produjo algún tipo de actividad citotóxica sobre la mayor parte de las

líneas celulares, siendo ésta dependiente de la línea utilizada. Se aprecia en general un elevado porcentaje de efectos débilmente positivos (+) e incluso negativos sobre las células CHSE-214, correspondientes a peces de aguas frías. Es de destacar, sin embargo, que existe un mismo patrón de actividad frente a la línea celular de homeotermos y a la de peces de aguas cálidas, lo cual supondría que ambas podrían estar producidas por similares o idénticas citotoxinas. La mayor parte de los efectos citotóxicos se produjeron antes de las 6 horas de incubación, existiendo algunas muestras que destruyeron totalmente el tapiz de células en menos de dos horas. En la Figura 7.4 puede observarse que la acción de los productos extracelulares sobre las células CHSE-214 fue muy similar independientemente de la cepa, manifestándose como desorganización del tapiz, necrosis nuclear, retracción celular con prolongaciones dendríticas y lisis. Sobre las células FHM (Figura 7.5) pueden distinguirse dos tipos de efectos: a) el representado por las cepas ambientales E y V69 que consiste en la formación de aglomeraciones celulares unidas por prolongaciones dendríticas; b) el representado por la cepa ambiental 255 que da lugar a una vacuolización acusada y posterior lisis. Sobre la línea celular L-929 (Figura 7.6) el efecto citopático producido es tan fuerte y rápido que solamente puede apreciarse en la mayor parte de los casos la fase final de la secuencia de acontecimientos consistente en el desprendimiento del tapiz y redondeamiento celular.

El tratamiento por calor (80°C, 15 min) de los filtrados de cultivo de seis cepas representativas (161, 82A, 167, 148, V69, M-17151) produjo la pérdida completa de sus efectos citotóxicos, lo

Tabla 7.3. (continuación)

CEPAS	Líneas celulares ^{a,b}								
	homeotermos			poiquilotermos					
	L-929			FHM			CHSE		
	A	B	C	A	C	D	A	C	D
Transconjugantes									
T-E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-78	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-153	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-155	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-255	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a. Las temperaturas de incubación fueron de 37 °C para la línea L-929 y de 20°C para las otras dos líneas.

b. Grados de positividad establecidos: +, inicio; ++, destrucción incompleta; +++, destrucción total.

c. Cepas ambientales procedentes de Bangladesh (Barja y cols., 1987).

d. Cepas aisladas de peces enfermos (Toranzo y cols., 1986; Santos y cols., 1987).

que sugiere su naturaleza proteica y, probablemente, enzimática. Asimismo se comprobó que los extractos se mantenían estables a 4°C, -30°C y -80°C durante al menos dos meses. El análisis previo del contenido plasmídico y de su capacidad de transferencia (véase capítulo 6), nos permitió disponer de huéspedes adecuados portadores del plásmido común a la mayoría de cepas, entre las cuales se encuentran muchas citotóxicas. La cepa de E. coli K-12 185 utilizada como receptora en los ensayos de conjugación, es a su vez usada como control negativo en los ensayos de citotoxicidad, por lo que se consideró interesante evaluar la capacidad citotóxica de los transconjugantes. Barja y cols., en un estudio similar efectuado con cepas de Vibrio cholerae no O1 ambientales (incluidas como control en nuestro estudio, véase Tabla 7.3), citotóxicas y portadoras de un plásmido de alto peso molecular, comprobaron que los transconjugantes obtenidos con el mismo huésped adquirirían propiedades citotóxicas. En nuestro caso, ninguno de los transconjugantes resultó citotóxico lo que sugeriría la probable naturaleza cromosómica de tales factores de virulencia.

Este último hallazgo junto con la sugerida estructura proteica del factor activo y los cambios morfológicos que produce, supone que las cepas positivas liberan al exterior una sustancia o sustancias capaces de inducir en las células eucarióticas cambios similares a los que desarrolla la toxina colérica, posiblemente, también por activación del AMP cíclico (Guerrant y cols., 1974). Sin embargo no se puede concluir si se trata o no de la misma toxina, puesto que en Vibrio cholerae se han descrito más de un tipo que producen efectos similares (Yamamoto y cols., 1983). Hay que resaltar que las cinco

cepas negativas en los bioensayos correspondieron a aislamientos débilmente hemolíticos o no hemolíticos, con escasa o nula actividad lipásica y fosfolipásica. Por otro lado, las cepas más intensamente citotóxicas correspondieron a aislamientos con actividad enzimática y hemolítica superior a la media. Por todo ello no se puede descartar que el efecto citotóxico observado haya sido debido a la acción combinada de más de un enzima.

En nuestro estudio se han incluido numerosas cepas control de la misma y de otras especies, productoras y no productoras de actividad enterotóxica (Ent+, Ent-), y tanto patógenas como no patógenas del hombre y de peces (véase Tabla 7.3). De los datos puede deducirse que en todas las cepas utilizadas como controles positivos pertenecientes a la especie Vibrio cholerae, se da una correspondencia entre citotoxicidad y enterotoxigenidad que no existe para las cepas de A. hydrophila. En este último caso tanto las cepas enterotóxicas como las no enterotóxicas produjeron intensos efectos citotóxicos en todas las líneas celulares estudiadas. Investigaciones previas en cepas de diferentes especies del género Vibrio, (Toranzo y cols., 1983b; Toranzo y cols., 1987) sugieren que no puede establecerse una relación directa entre enterotoxigenidad in vivo para animales homeo y poiquiloterms, y actividad citotóxica de los productos secretados sobre las correspondientes líneas celulares. Este hecho es también extensible a miembros de otros géneros, habitantes comunes de los ecosistemas acuáticos, y que, al igual que los vibrios, son responsables de infecciones de peces e incluso del hombre y animales, como es el caso de Aeromonas (Santos y cols., 1987). Probablemente la razón estribe en que el desarrollo de la infección dependa de la

interacción de diferentes factores de virulencia, muchos de los cuales pueden, todavía, no haber sido caracterizados.

En este sentido, resulta interesante comparar las propiedades citotóxicas de las cepas con las descritas en anteriores capítulos, encontrándose que no existe relación aparente entre actividad hemaglutinante asociada a células y citotóxica de modo que cepas débilmente hemaglutinantes despliegan actividad citotóxica intensa y viceversa (véase capítulo 3). Sin embargo no puede decirse lo mismo de la producción de hemaglutinina soluble y de la de sideróforos, ya que las cepas más altamente citotóxicas correspondieron a aislamientos súperproductores de sideróforos y de intensa actividad exohemaglutinante (véase capítulos 3 y 5). Precisamente Finkelstein y Hanne (1982b) sugirieron que la hemaglutinina soluble tenía actividad proteásica, y en este sentido se valoraría como una proteasa más. En lo que respecta al desarrollo de sistemas de captación de Fe^{+++} de alta afinidad, ya se comentó en el capítulo 5 que, si bien no se ha podido demostrar su relación con la patogeneidad de Vibrio cholerae en el intestino de modelos animales (Sigel y cols., 1985), no se puede de ningún modo descartar que sea un factor más de virulencia.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por otros investigadores en ésta y otras especies del género (Toranzo y cols., 1987; Barja y cols., 1987), no se dispone aún de la evidencia suficiente como para poder predecir el comportamiento patógeno, para hombre y animales, de las cepas de agua y plancton productoras de citotoxinas, hemolisinas y distintos tipos de actividades enzimáticas.

Ahora bien, si el desarrollo de la infección es el resultado de la actividad combinada e, incluso, sinérgica de todos los factores estudiados, incluyendo la producción de adhesinas y el desarrollo de sistemas de captación de hierro de alta afinidad, éstas cepas constituyen, sin duda, un peligro potencial para las comunidades, humanas y animales, expuestas a dosis infectivas.

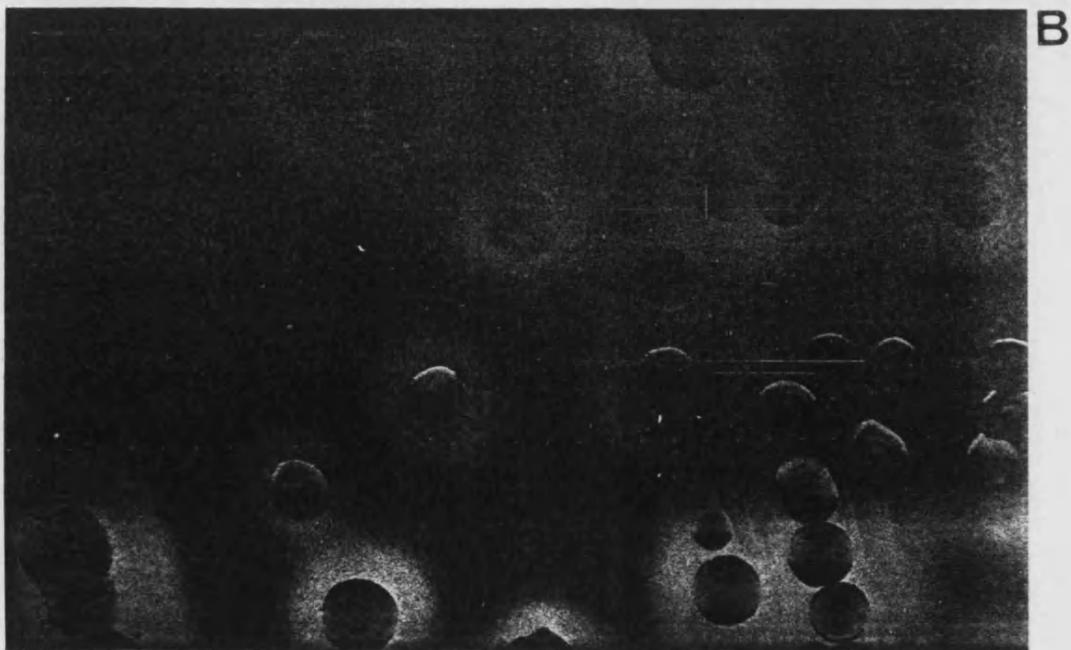
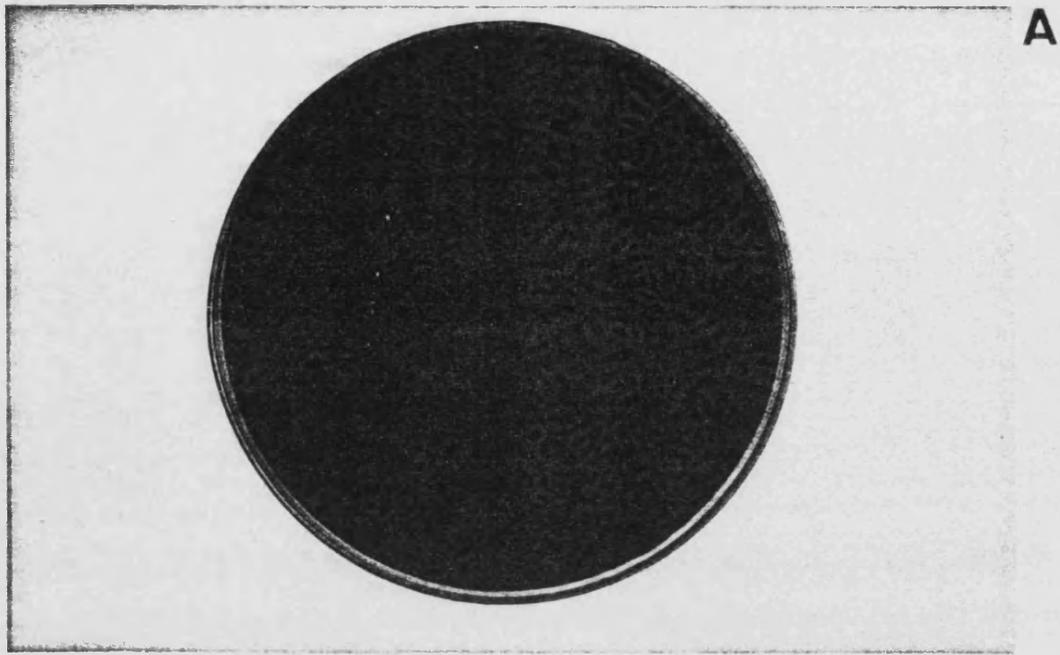
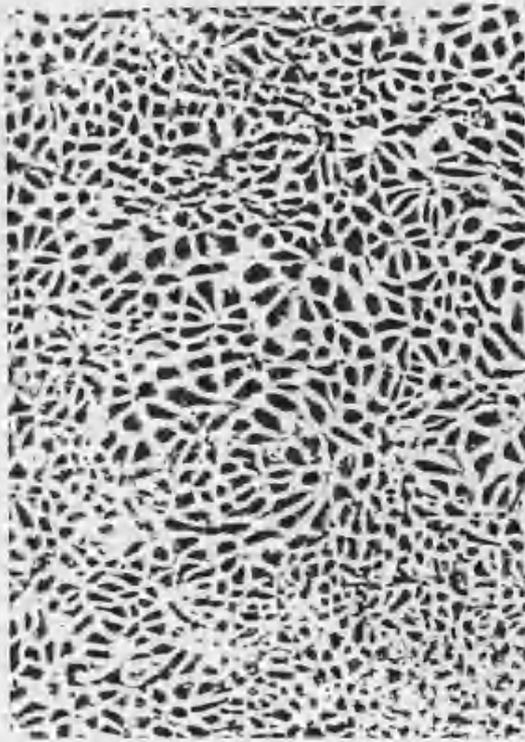
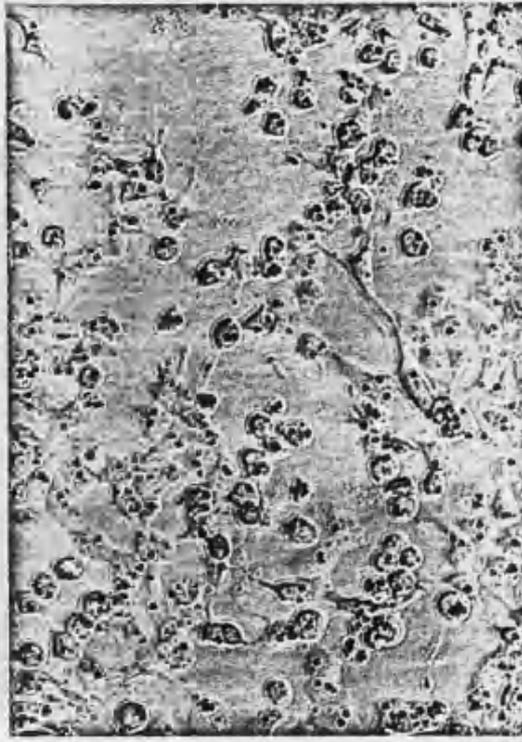


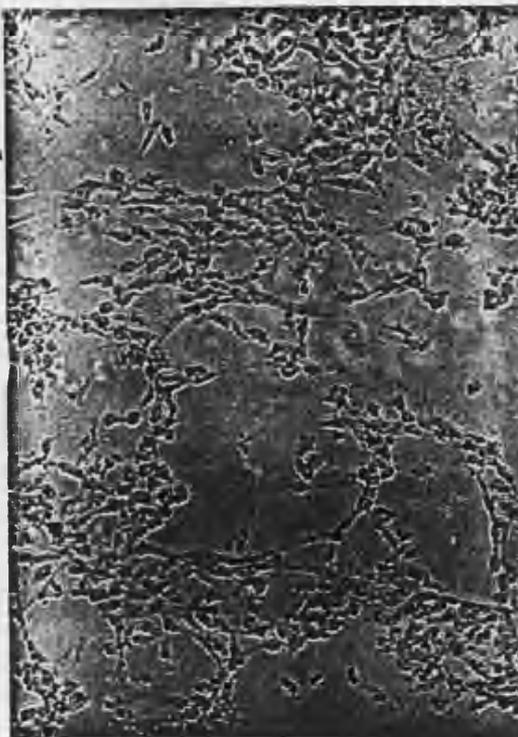
FIGURA 7.3. Placas de agar CDC suplementadas con un 5% de eritrocitos (A, pollo; B, humanos) mostrando la zona de hemolisis alrededor del crecimiento bacteriano. A, visión general de la placa tras 18 h de incubación en anaerobiosis; B, detalle que muestra claramente la zona de hemolisis alrededor de una colonia de V. cholerae no O1 aislada.



A



B



C



D

FIGURA 7.4. Microfotografías al microscopio de contraste de fases (x 200) mostrando el efecto citotóxico producido por los productos extracelulares de las cepas de V. cholerae no 01 94 (B), 114 (C) y 116 (D) sobre la línea celular de peces CHSE-214. A, control; B, necrosis nuclear redondeamiento y retracción celular producida a las 20 h de incubación; C, necrosis nuclear, retracción y lisis celular tras 20 h de incubación; D, necrosis nuclear, retracción celular y prolongaciones dendríticas a las 36 h de incubación.

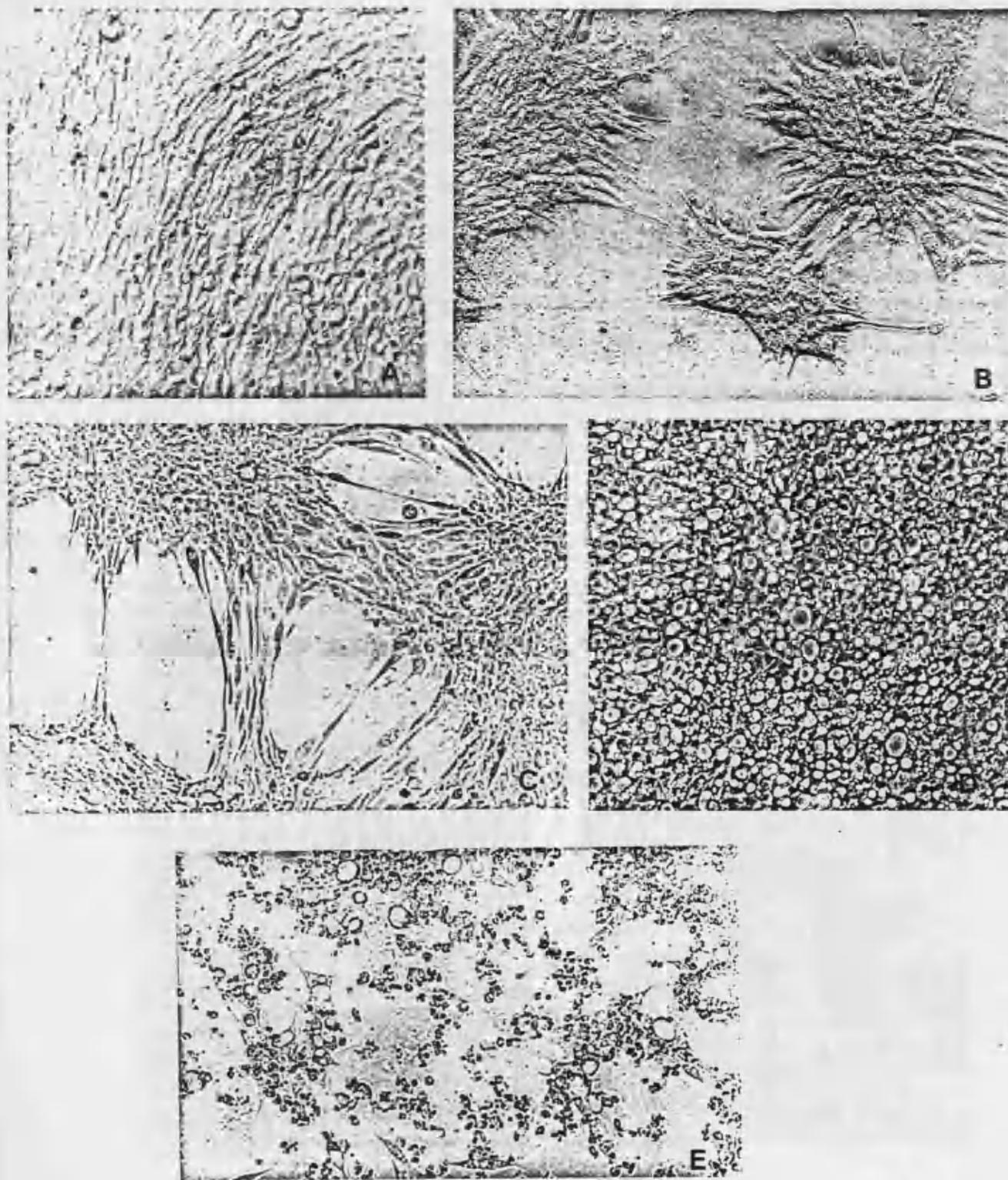


FIGURA 7.5. Microfotografías al microscopio de contraste de fases mostrando los dos tipos de efectos citotóxicos producidos por los productos extracelulares de las cepas ambientales de V. cholerae no O1 sobre la línea celular de peces FHM. A, control; B y C (x 200), retracción celular y prolongaciones dendríticas producidas tras 20 h de incubación por las cepas E y V69; D y E, efecto producido por la cepa 255 a las 6 h (D, x 500) y 20 h de incubación (E, x 200) y manifestado por una gran vacuolización seguida de destrucción celular respectivamente.

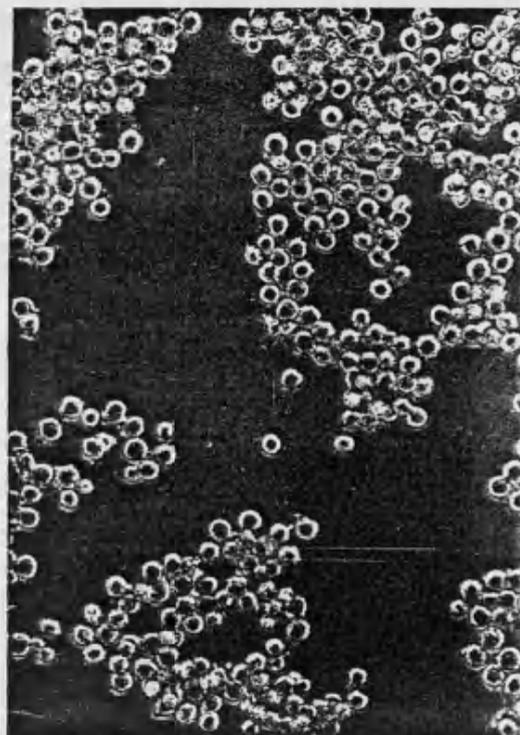
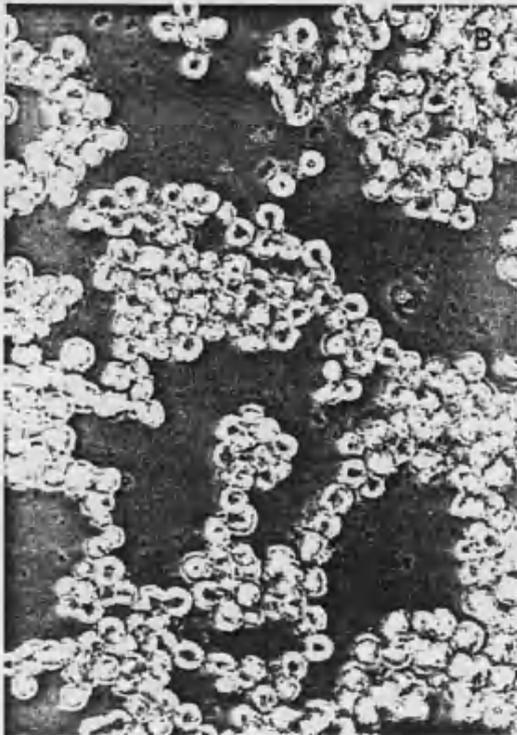
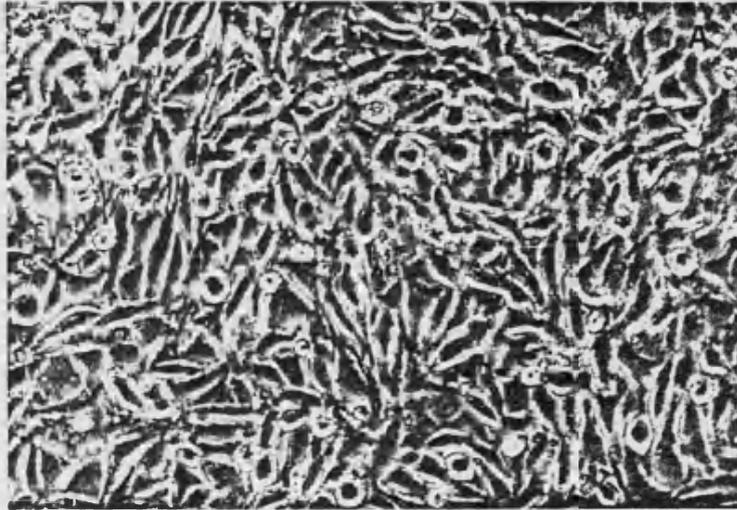


FIGURA 7.6. Microfotografías al microscopio de contraste de fases (x 200) mostrando el efecto citotóxico producido por los productos extracelulares de las cepas de V. cholerae no 01 94 (B) y E (C) sobre la línea celular de ratón CHSE-214. A, control; B y C, destrucción total con las células redondeadas y despegadas del tapiz.

8. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

De los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de los capítulos que constituyen la presente tesis, pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

1. V. cholerae no O1 es una bacteria autóctona del ecosistema acuático estudiado. Este microorganismo ha sido aislado de muestras de agua y plancton procedentes de ambientes acuáticos con un amplio margen de salinidades, en todos los puntos y a lo largo de todas las épocas del año. Se ha confirmado mediante observación microscópica directa, la presencia de múltiples bacterias adheridas al zooplancton, especialmente al caparazón y a la región oral de copépodos vivos, parte de las cuales han sido identificadas como pertenecientes a la especie Vibrio cholerae.

- De los diferentes factores fisicoquímicos estudiados, la temperatura y su interacción con la salinidad han sido los únicos significativos en la recuperación de Vibrio cholerae tanto de agua como de plancton, lo que sugiere que ambas poblaciones han seguido una evolución similar a lo largo del año.

2. Vibrio cholerae O1 y no O1 produce más de una adhesina/hemaglutinina, tanto soluble como asociada a células y presenta una alta hidrofobicidad de superficie. La actividad hemaglutinante y la hidrofobicidad de superficie han dependido de la composición del medio utilizado en el crecimiento de las cepas y de la

edad del cultivo, y su inactivación por el calor sugiere que su naturaleza es proteica.

- Las hemaglutininas asociadas a células han resultado ser de cuatro tipos: sensible a manosa (MSHA), a fucosa (FSHA), a galactosa (GSHA) y resistente a todos los azúcares ensayados (RHA). La actividad MSHA ha sido la más frecuente, seguida de la RHA, FSHA y GSHA. De todas ellas únicamente la RHA se ha relacionado con la hidrofobicidad de superficie. Las actividades exohemaglutinantes han sido de dos tipos: sensible a manosa, glucosa y fructosa (MGFSHA) y resistente a todos los azúcares ensayados. Tanto la actividad GSHA como la MGFSHA no habían sido descritas hasta la fecha en la especie Vibrio cholerae. No se ha hallado relación entre hemaglutininas asociadas y solubles, encontrándose que éstas últimas son dependientes del ion Ca^{++} y alcanzan su máximo en fase estacionaria de crecimiento.

- La capacidad de adhesión a eritrocitos no parece residir en orgánulos de superficie tipo pili o fimbriae.

- Las cepas de Vibrio cholerae O1 procedentes de colecciones de cultivo han quedado englobadas en los principales grupos establecidos para las no O1, no habiéndose observado relación alguna entre biotipo y actividad hemaglutinante.

3. No existe un único patrón de proteínas de membrana, total y externa, asociado a la especie Vibrio cholerae, y éste es especialmente variable en el caso de las cepas ambientales no O1, de modo que se da un alto grado de heterogeneidad en el número y cantidad relativa de proteínas por cepa.

- Tras la evaluación de las similaridades entre las cepas en

función de sus perfiles proteicos de membrana total, éstas han quedado distribuidas en cuatro grupos confirmándose que existía una asociación entre los mismos y la presencia o ausencia en las fracciones de membrana de proteínas de alto y bajo peso molecular. Las cepas O1 han quedado englobadas en los grupos mayoritarios junto con cepas no O1 ambientales.

- El uso de los detergentes no iónicos Tritón X-100 y Sarkosil, bajo diferentes condiciones y concentraciones, ha resultado eficaz en la separación de las proteínas de membrana interna y externa de la cepa de Escherichia coli utilizada como control. Sin embargo, en la totalidad de las cepas ambientales no O1, el tratamiento con Sarkosil (0.55%), 30 min a temperatura ambiente, y en ausencia de Mg⁺⁺, ha resultado más satisfactorio que el realizado con Tritón X-100 a diferentes concentraciones y tiempos de incubación.

- El análisis de las proteínas de membrana externa ha revelado que éstas oscilan entre 19 y 82 K, encontrándose la proteína mayoritaria más abundante comprendida entre 34 y 48 K. La práctica totalidad de cepas han expresado proteínas de 19, 26-28, 34-35 y 48 K. Parte de las proteínas mayoritarias han sido termomodificables y, por tanto, de probable naturaleza porínica mientras que ninguna se ha visto afectada por el tratamiento en presencia y ausencia de 2-mercaptoetanol, lo que supone que los puentes disulfuro no son esenciales en el mantenimiento de la estructura secundaria de la membrana. El análisis de agrupamiento ha discriminado 19 grupos que se han correspondido con la posesión de un perfil proteico concreto, quedando las cepas O1 agrupadas junto con cepas no O1 ambientales.

- El medio de crecimiento ha afectado cualitativa y

cuantitativamente la composición proteica de las membranas externas de representantes de los 19 grupos discriminados. Por el contrario, la edad del cultivo sólo ha dado lugar a variaciones de tipo cuantitativo. La expresión de proteínas de alto peso molecular se ha relacionado con la limitación en nutrientes del medio de cultivo y la de las proteínas de 26-28 y 48 K con las propiedades de superficie estudiadas.

4. Las cepas ambientales de Vibrio cholerae no O1 producen, al menos, un sistema de captación de Fe(III) de alta afinidad, junto con otro no específico en el que probablemente se halla implicado un compuesto similar al DHBA. Este sistema consta de un sideróforo de tipo fenolato-catecolato (vibriobactina ?) y de las proteínas de membrana inducidas, entre las que se encuentra una de 68 K común a todas las cepas estudiadas tanto ambientales como de colección.

- La cantidad de sideróforo excretado por las cepas no O1 ha resultado superior a la de las O1 estudiadas, y, en algunos casos, incluso muy superior a la excretada por las cepas utilizadas como controles positivos. Asimismo las cepas ambientales no O1 han requerido mayores concentraciones de Fe(III) en el medio para reprimir la síntesis del sistema que las cepas de origen clínico.

- Las cepas ambientales han sido capaces de estimular el crecimiento y, a su vez, ser estimuladas por los quelantes del Fe(III) liberados por cepas pertenecientes a otras especies. Esto supone que el sistema de captación del ión férrico producido por Vibrio cholerae es compartido por otras especies bacterianas del mismo y distintos géneros.

5. Las cepas de Vibrio cholerae no O1 ambientales son, con elevada frecuencia, resistentes a uno o más antibióticos y, además, capaces de transferir sus resistencias, comportamiento que no se ha observado para las cepas de colección O1 y no O1.

- El potencial de diseminación de los factores R, evaluado mediante conjugaciones intraespecíficas e intergenéricas, ha sido muy superior al descrito para ésta y otras especies del género Vibrio.

- De los diferentes métodos utilizados en el análisis del contenido plasmídico, una modificación del de Birnboim y Doly (Silhavy y cols., 1983) consistente en la eliminación de la lisozima y el EDTA, ha rendido los resultados más repetitivos en el caso de las cepas ambientales.

- En casi todas las cepas resistentes seleccionadas se ha revelado la presencia de un plásmido de alto peso molecular responsable del fenotipo de resistencia transferido, junto a numerosos plásmidos crípticos de bajo peso molecular.

6. Un elevado porcentaje de cepas de Vibrio cholerae no O1 ambientales son citotóxicas, hemolíticas y capaces de hidrolizar una gran variedad de sustratos.

- Se han encontrado elevadas actividades enzimáticas frente a los distintos sustratos seleccionados, a excepción de la esculina, algunas de las cuales están significativamente correlacionadas. Asimismo se da una correlación entre hemólisis y actividad lipásica-fosfolipásica. Las cepas O1 control han mostrado en general una menor actividad enzimática y hemolítica.

- La práctica totalidad de cepas no O1 ha producido algún tipo

de actividad citotóxica sobre líneas celulares de animales homeotermos y poiquilotermos. Los patrones observados para la línea de peces de aguas cálidas y para la de ratón, han sido idénticos o muy similares. La/s citotoxina/s han sido inactivadas por el calor y han resultado ser de probable naturaleza cromosómica.

7. No existe relación aparente entre la posesión de un patrón de proteínas de membrana concreto, actividad hemaglutinante asociada a células y actividad citotóxica. Sin embargo, las cepas más altamente citotóxicas correspondieron a aislamientos superproductores de sideróforos y de intensa actividad enzimática y exohemaglutinante.

8. Las cepas ambientales estudiadas, de agua y plancton, pertenecen a una misma población de bacterias que puede existir al menos en dos formas, libre y adherida, las cuales se hallan en equilibrio en el ecosistema acuático estudiado.

Por otra parte, los resultados obtenidos hasta el momento abren el camino a futuras investigaciones que podrían centrarse en los siguientes puntos:

- Dilucidar la naturaleza de la relación entre Vibrio cholerae y zooplancton.

- Esclarecer el mecanismo de adhesión in vivo tanto al epitelio intestinal de animales de laboratorio como a los distintos tipos de sustratos presentes en los ecosistemas acuáticos, y su relación con las pautas observadas in vitro.

- Profundizar en el conocimiento de la relación entre estructuras proteicas de membrana y fenómeno de adhesión.

- Establecer la naturaleza química y genética del o de los sideróforos producidos y su potencial biológico.

- Evaluar el significado ecológico, epidemiológico y evolutivo de la transferencia del material extracromosómico a individuos de la misma y otras especies y géneros.

- Ampliar los estudios sobre virulencia a modelos animales intentando relacionar las diferentes actividades enzimáticas, citotóxicas, enterotóxicas etc.

A lo largo de la presente tesis se ha puesto de manifiesto la considerable variabilidad fenotípica intraespecífica mostrada por la especie Vibrio cholerae, y se han revelado aspectos inéditos acerca de muchas propiedades relacionadas con su supervivencia en ecosistemas acuáticos y en el interior de otros organismos. Ello ha sido posible gracias al estudio de un número elevado de cepas de diferentes orígenes y demuestra cuán arriesgado resulta extrapolar a nivel de especie los resultados obtenidos con el estudio de unas pocas cepas, tónica que resulta habitual en la mayor parte de trabajos. Al mismo tiempo se ha comprobado la dificultad que entraña intentar relacionar determinadas características celulares con la actuación de los microorganismos en sus hábitats naturales intra y extra corpóreos, lo que en el caso de bacterias patógenas o potencialmente patógenas puede ser decisivo. Todo ello refuerza la necesidad de abordar estudios que abarquen el mayor número posible de caracteres tanto propios del

individuo como del entorno que le rodea. Este tipo de trabajos, si bien más arduos y difíciles de interpretar, son absolutamente básicos para poder vislumbrar con algo más de objetividad la compleja realidad microbiana.

BIBLIOGRAFIA

- ABE, H., S. GOTO y S. KUWAHARA (1966). "Transmission of multiple drug-resistance from Shigella to Aeromonas and non-agglutinable Vibrio through conjugation". Jap. J. Bacteriol. 21:266-273.
- ACHTMAN, M., M. HEUZENROEDER, B. KUSECEK, H. OCHMAN, D. CAUGANT, R.K. SELANDER, V. VAISANEN-RHEN, T.K.KORHONEN, S. STUART, F. ORSKOV y I. ORSKOV. (1986). "Clonal analysis of Escherichia coli O2:K1 isolated from diseased humans and animals". Infect. Immun. 51:268-276.
- AFIFI, A.A. y S.P. AZEN (1979). "Statistical analysis. A computer oriented approach". Academic Press. London.
- ALCAIDE, E. (1985). "Estudio comparativo de los diversos factores que afectan al aislamiento de Salmonella a partir de aguas. Determinación de sus resistencias a antibióticos y su transmisión en las cepas aisladas". Tesis Doctoral. Dpto. Microbiol., Fac. C. Biológicas, Univ. Valencia.
- ALCAIDE, E. y E. GARAY (1984). "R-plasmid transfer in Salmonella isolated from wastewater and sewage-contaminated surface waters". Appl. Environ. Microbiol. 48:436-438.
- ALDEA, M., E. HERRERO, I. ESTEVE y R. GUERRERO (1980). "Surface density of major outer membrane proteins in Salmonella typhimurium in different growth conditions". J. Gen. Microbiol. 120:355-367.
- ALM, R.A., G. BRAUN, R. MORONA y P.A. MANNING (1986). "Detection of an OmpA-like protein in Vibrio cholerae". FEMS Microbiol. Lett. 37:99-104.
- AMSELLEM, J. y P. CLEMENT (1980). "A simplified method for the preparation of rotifers for transmission and scanning electron microscopy". Hydrobiologia. 73: 119-122.
- ANDERSON, T.F. (1951). Trans. N. Y. Acad. Sci. Series II, 13, 130. Citado por Mercer y Birbeck (1974)
- ANDRUS, C.R., M. WALTER, J.H. CROSA y S.M. PAYNE (1983). "Synthesis of siderophores by pathogenic Vibrio species". Curr. Microbiol. 9:209-214.

- AOKI, T. y B. HOLLAND (1985). "The outer membrane proteins of the fish pathogens Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicida and Edwardsiella tarda". FEMS Microbiol. Lett. 27:299-305.
- AOKI, T., T. KITAO y T. ARAI (1977). "R-plasmids in fish pathogens". En S. Mitsuhashi, L. Rosvital y V. Kicmery (eds). "Plasmids: medical and theoretical aspects", p 39-45. Avicenum Czechoslovak Medical Press. Praga.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F. (1980). "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". 15th. ed. Am. Public Health Association. Washington.
- ARMSTRONG, J.L., J.J. CALOMIRIS y R.J. SEIDLER (1982). "Selection of antibiotic-resistant Standard Plate Count bacteria during water treatment". Appl. Environ. Microbiol. 44:308-316.
- ARMSTRONG, J.L., D.S. SHIGENO, J.J. CALOMIRIS y R.J. SEIDLER (1981). "Antibiotic-resistant bacteria in drinking water". Appl. Environ. Microbiol. 44:308-316.
- ARNOW, L.E. (1937). "Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures". J. Biological Chemistry 228:531-537.
- ATKIN, C.L., J.B. NEILANDS y H.J. PHAFF (1970). "Rhodotorulic acid from species of Leucosporidium, Rhodosporidium, Rhodotorula, Sporidiolobus and Sporobolomyces and an alanyne containing ferrichrome from Cryptococcus melibiosum". J. Bacteriol. 103: 1472-1475.
- ATKINSON, H.M. y T.J. TRUST (1980). "Hemagglutination properties and adherence ability of Aeromonas hydrophila". Infect. Immun. 27:938-946.
- AUSTIN, B., S. GARCES, B. CONRAD, E.E. HARDING, R.R. COLWELL, U. SIMIDU y N. TAGA (1979). "Comparative study of the aerobic, heterotrophic bacterial flora of Chesapeake Bay and Tokio Bay". Appl. Environ. Microbiol. 37: 704-714.
- AZNAR, R., E. ALCAIDE y C. AMARO (1987). "Characterization of R-plasmids in environmental isolates of Salmonella: host range and stability". Enviado al Current Microbiology.
- BARJA, J.L., A.E. TORANZO, I. HUQ, Y. SANTOS y R.R. COLWELL (1987).

- "Plasmids and factors associated with virulence in Vibrio cholerae non-O1 isolated in Bangladesh". J. Clin. Microbiol. (en prensa).
- BASHFORD, D.J., T.J. DONOVAN, A.L. FURNISS y J.V. LEE (1979). "Vibrio cholerae in Kent". Lancet 1: 436-749.
- BASELSKI, V.S., S. UPCHURCH y C.D. PARKER (1978). "Isolation and phenotypic characterization of virulence deficient mutants of Vibrio cholerae". Infect. Immun. 22:181-188.
- BAYA, A.M., P.R. BRAYTON, V.L. BROWN, D.J. GRIMES, E. RUSSEK-COHEN y R.R. COLWELL (1986). "Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine Atlantic ocean samples". Appl. Environ. Microbiol. 51:1285-1292.
- BEACHEY, E.H. (ed.) (1980). "Bacterial adherence". Chapman and Hall, London.
- BELL, J.B., W.R. MACRAE Y G.E. ELLIOT (1981). "R factors in coliform-fecal coliform sewage flora of prairies and north-west territories of Canada". Appl. Environ. Microbiol. 42:204-210.
- BERINGER, J.E. y P.R. HIRSCH (1984). "Genetic adaptation to the environment. The role of plasmids in microbial ecology". En M.J. Klug y C.A. Reddy (eds). "Current perspectives in microbial ecology", p 63-70. Proceedings of the third International Symposium on Microbial Ecology. Michigan State University. American Society for Microbiology. Washington.
- BIRNBOIM, H.C. y J. DOLY (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". Nucl. Ac. Res. 7:1513-1523.
- BHATTACHARJEE, J.W. y B.S. SRIVASTAVA (1978). "Mannose-sensitive haemagglutinins in adherence of Vibrio cholerae El Tor to intestine". J. Gen. Microbiol. 107:407-410.
- BLAKE, P.A., D.T. ALLEGRA, J.D. SNYDER, T.J. BARRET, L. McFARLAND, C.T. CARAWAY, J.C. FEELEY, J.P. CRAIG, J.V. LEE, N.D. PUHR y R.A. FELDMAN. (1980). "Cholera: a possible endemic focus in the United States". N. Engl. J. Med. 302: 305-309.
- BOCKEMÜHL, K. ROCH, B. WOHLERS, V. ALEKSIC, S. ALEKSIC y R. WOKATSCH (1986). "Seasonal distribution of facultatively enteropathogenic

- vibrios (Vibrio cholerae, Vibrio mimicus, Vibrio parahaemolyticus) in the freshwater of the Elbe River at Hamburg". J. Appl. Bacteriol. 60:435-442.
- BOOTH B.A., M. BOESMAN-FINKELSTEIN y R.A. FINKELSTEIN (1983). "Vibrio cholerae soluble hemagglutinin/protease is a metalloenzyme". Infect. Immun. 42:639-644.
- BRINTON, C.C. (1971). "The properties of sex-pili, the viral nature of conjugal genetic transfer system and some possible approaches to the control of bacteria drug resistance". Critical Rev. Microbiol. 1:105-160.
- BRODA, P. (1979). "Plasmids". W. H. Freeman, San Francisco.
- BUCKLEY, J.T., S.P. HOWARD y T.J. TRUST (1981). "Influence of virulence plasmid and geographic origin on outer membrane proteins of Vibrio anguillarum". FEMS Microbiol. Lett. 11:41-46.
- BULLEN, J.J. (1981). "The significance of iron in infection". Rev. Infect. Dis. 3: 1127-1138.
- BURROWS W. y J. KAUR (1974). "Cholera toxins". En D. Barua y W. Burrows (eds.). "Cholera", p 143-167. W.B. Saunders Company: Philadelphia London Toronto.
- CALOMIRIS, J.J., J.L. ARMSTRONG y R.J. SEIDLER (1984). "Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water". Appl. Environ. Microbiol. 47: 1238-1242.
- CARPENTER, K.P., J.M. HART, J. HATFIELD y G. WICKS (1968). "Identification of human vibrios and allied organisms". En "Identification methods for microbiologists". Academic Press. London.
- CAUGANT, D.A., B. R. LEVIN y R.K. SELANDER (1981). "Genetic diversity and temporal variation in the Escherichia coli population of a human host". Genetics. 98:460-490.
- CAUGANT, D.A., B. R. LEVIN y R.K. SELANDER (1984). "Distribution of multilocus genotypes of Escherichia coli within and between host families". J. Hyg. 92:377-384.
- COHEN, S.N. (1976). "Transposable genetic elements and plasmid evolution". Nature 263:731-738.

- COLLINS, C.H. (1969). "Métodos Microbiológicos". Ed. Acribia. Zaragoza.
- COLWELL, R.R. (ed.) (1984). "Vibrios in the environment". John Wiley and Sons, Inc., New York.
- COLWELL, R.R., J. KAPER y S.W. JOSEPH (1977). "Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay". Science 198:394-396.
- COLWELL, R.R., R.J. SEIDLER, J. KAPER, S.W. JOSEPH, S. GARGES, M. LOCKMAN, D. MANEVAL, H. BRADFORD, N. ROBERTS, E. REMMERS, I. HUQ y A. HUQ (1981). "Occurrence of Vibrio cholerae serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries". Appl. Environ. Microb. 41: 555-558.
- COLWELL, R.R., F.L. SINGLETON, A. HUQ, H.S. XU y N. ROBERTS (1983). "Ecology of Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus and related vibrios in the natural environment". Proc. International Symposium on Bacterial Diarrheal Disease, Osaka University, Japan. Marcel-Dekker, New York.
- COLWELL, R.R., P.A. WEST, D. MANEVAL, E.F. REMMERS, E.L. ELLIOT y N.E. CARLSON (1984). "Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake Bay". En R.R. Colwell (ed). "Vibrios in the environment", p 367-387. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- COOPER, S.R., J.V. McARDIE y K.N. RAYMOND (1978). "Siderophore electrochemistry: relation to intracellular iron release mechanism". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3551-3554.
- COSTERTON, J.W. (1984). "Direct ultrastuctural examination of adherent bacterial populations in natural and pathogenic ecosystems". En M.J. Klug y C.A. Reddy (eds). "Microbial ecology", p 115-123. American Society for Microbiology, Washington.
- COSTERTON, J.W. y K.J. CHENG (1982). "Colonization of tissue surfaces by autochthonous bacteria". En D. Schlessinger (ed). "Microbiology-1982", p 266-273. American Society for Microbiology, Washington.
- CRAIG, J.P., K. YAMAMOTO, Y. TAKEDA y T. MIWATANI (1981). "Production of cholera-like enterotoxin by a strain of Vibrio cholerae non-O1 isolated from the environment". Infect. Immun. 34:90-97.

- CROSA, J.H. (1980a). "Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen Vibrio anguillarum". *Infect. Immun.* 27:897-902.
- CROSA, J.H. (1980b). "A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen Vibrio anguillarum specifies an iron-sequestering system". *Nature, London* 284:566-568.
- CROSA, J.H. (1984). "The relationship of plasmid-mediated iron transport and bacterial virulence". *Ann. Rev. Microbiol.* 38:69-89.
- CROSA, J.H. y S. FALKOW (1984). "Plasmids". En P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg y G.B. Phillips (eds). "Manual of methods for General Bacteriology", p 266-282. American Society for Microbiology, Washington DC.
- CROSA, J.H. y L.L.HODGES (1981). "Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen Vibrio anguillarum 775". *Infect. Immun.* 31:223-227.
- CURTISS, R. III (1981). "Gene transfer". En P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg y G.B. Phillips (eds). "Manual of methods for General Bacteriology", p 243-259. American Society for Microbiology, Washington DC.
- DAHLBACK, B., M. HERMANSSON, S. KJELLEBERG y B. NORKRANS (1981). "The hydrophobicity of bacteria: an important factor in their initial adhesion at the air-water interface". *Arch. Microbiol.* 128:267-270.
- DATTA, N. (1962). "Transmissible drug resistance in a epidemic strain of Salmonella typhimurium". *J. Hyg.* 60: 301-302.
- DAVIDSON, L.S. y J.D. OLIVER (1986). "Plasmid carriage in Vibrio vulnificus and other lactose-fermenting marine vibrios". *Appl. Environ. Microbiol.* 51:211-213.
- DAVIS, C.E. y J. ANANDAN (1970). "The evaluation of R-factor: a study of a preantibiotic community in Borneo". *New England J. Med.* 282:117-118.
- DEMARCHELIER, P.M. y J.L. REICHEL'T (1982). "Genetic relationships among clinical and environmental isolates of Vibrio cholerae from Australia". *Curr. Microbiol.* 7:53-57.

- DIRIENZO, J.M., K. NAKAMURA y M. INOUE (1978). "The outer membrane proteins of gramnegative bacteria: biosynthesis, assembly and functions". *Ann. Rev. Biochem.* 47:481-532.
- DUDMAN, W.F. (1977). "The role of surface polysaccharides in natural environments". En E. Sutherland (ed.). "Surface carbohydrates of the prokaryotic cell", p 357-414. Academic Press, London.
- EAGLE, H. (1959). "Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures". *Science* 130:432-437.
- ECKER, D.J., B.F. MATZANKE y K.N. RAYMOND (1986). "Recognition and transport of ferric enterobactin in Escherichia coli". *J. Bacteriol.* 167:666-673.
- FALKOW, S. (1975). "Infectious multiple drug resistance". Pion. Ltd. London.
- FARIS, A., M. LINDHAL y T. WADSTRÖM (1982). "High surface hydrophobicity of hemagglutinating Vibrio cholerae and other vibrios". *Curr. Microbiol.* 7:357-362.
- FARIS, A., T. WADSTROM y J.M. FREER (1981). "Hydrophobic adsorptive and hemagglutinating properties of Escherichia coli possessing colonizing factor antigens (CFA/I or CFA/II), type 1 pili and other pili". *Curr. Microbiol.* 5: 67-72
- FATTOM, A. y M. SHILO (1984). "Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria". *Appl. Environ. Microbiol.* 47:135-143.
- FENSENFELD, O. (1965). "Notes on food, beverages and fomites contaminated with Vibrio cholerae". *Bull. of the World Health Organization.* 33:725-734.
- FILIP, C., G. FLETCHER, J.L. WULF y C.F. EARHART (1973). "Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by the ionic detergent sodium lauryl sarkosinate". *J. Bacteriol.* 115:717-722.
- FINKELSTEIN, R.A., M. ARITA, J.D. CLEMENTS y E.T. NELSON (1978). "Isolation and purification of an adhesive factor (cholera lectin) from Vibrio cholerae". *Proceedings of the 13th Joint Conference on Cholera, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Atlanta, Ga., 19-21 September 1977. Department of Health, Education, and Welfare Publication 78-1590.*

- FINKELSTEIN, R.A. y L.F. HANNE (1982a). "Purification and characterization of the soluble hemagglutinin (cholera lectin) produced by Vibrio cholerae". *Infect. Immun.* 36:1199-1208.
- FINKELSTEIN, R.A. y L.F. HANNE (1982b). "Hemagglutinins (Colonization Factors?) produced by Vibrio cholerae". En D. Schlessinger (ed). "Microbiology-1982", p 324-326. American Society for Microbiology, Washington.
- FINN, T.M., J. REISER, R. GERMAINER y S.J. CRYZ jr. (1987). "Cell-associated hemagglutinin-deficient mutant of Vibrio cholerae". *Infect. Immun.* 55:942-946.
- FOLKHARD, W., K.R. LEONARD, S. MALSEY, D.A. MARVIN, J. DUBOCHET, A. ENGEL, M. ACHTMAN y R. HEIMUTH (1979). "X-ray diffraction and electron microscope studies on the structure of bacterial F pili". *J. Mol. Biol.* 130:145-160.
- FOSTER, T.J. (1983). "Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria". *Microb. Rev.* 47:361-409.
- FRETER, R., R.R. FRETER y H. BRICKNER (1983). "Experimental and mathematical models of Escherichia coli plasmid transfer in vitro and in vivo". *Infect. Immun.* 39:60-84.
- FURNISS, A. L., J. V. LEE y T. J. DONOVAN (1978). "The Vibrios". Public Health Laboratory Service monograph series no. 11.. Maidstone, Kent, England.
- GARAY, E., A. ARNAU y C. AMARO (1985). "Incidence of Vibrio cholerae and related vibrios in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle". *Appl. Environ. Microbiol.* 40:426-430.
- GARCIA-BAYO, M.P. (1983). "Variación diaria y anual de los principales parámetros físico-químicos, pigmentos fotosintéticos y grupos bacterianos de la Albufera de Valencia". Tesina de Licenciatura. Fac. Ciencias Biológicas. Valencia.
- GERHARDT, P., R.G.E. MURRAY, R. COSTILOW, E.W. NESTER, W.A. WOOD, N.R. KRIEG y G.B. PHILLIPS (1981). "Manual of methods for general bacteriology". American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- GLASSMAN, D.L., L.B. EDELSTEIN y L.A. McNICOL (1984)). "Extrachromosomal DNA in Vibrio cholerae". En R.R. Colwell (ed)).

- "Vibrios in the environment", p 205-215. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- GOYAL, S.M. y W.N. ADAMS (1984). "Drug-resistant bacteria in continental shelf sediments". *Appl. Environ. Microbiol.* 48:861-862.
- GRABOW, W.O.K., O.W. PROZESKY y J.S. BURGER (1975). "Behaviour in a river and dam of coliform bacteria with transferable or non-transferable drug resistance". *Water Res.* 9:779-782.
- GREENWOOD, K.T. y R.K.J. LUKE (1978). "Enzymatic hydrolysis of enterochelin and its iron complex in Escherichia coli K-12: properties of enterochelin esterase". *Biochim. Biophys. Acta* 525:209-218.
- GRIFFITHS, G.L., S.P. PIGEL, S.M. PAYNE y J.B. NEILANDS (1984). "Vibriobactin, a siderophore from Vibrio cholerae". *J. Biol. Chem.* 259: 383-385.
- GRINSTED, J. y P.M. BENNET (1984). "Isolation and purification of plasmid DNA". En P.M. Bennet y J. Grinsted (eds). "Methods in Microbiology" 17:123-132. Academic Press. London.
- GUERRANT, R.L., L.L. BRUMTON, T.C. SCHNAITMAN, L.L. REBHUN y A.G. GILMAN (1974). "Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli". *Infect. Immun.* 10:320-327.
- GUIDOLIN, A y P.A. MANNING (1987). "Genetics of Vibrio cholerae and its bacteriophages". *Microbiol. Rev.* 51:285-298.
- HADA, H.S. y R.K. SIZEMORE (1981). "Incidence of plasmids in marine Vibrio spp. isolated from an oil field in the northwest Gulf of Mexico". *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 199-202.
- HADA, H.S. y R.K. SIZEMORE (1984). "Plasmids in marine Vibrio spp.: Incidence and determination of potential functions using numerical taxonomic methods". En R.R. Colwell (ed). "Vibrios in the environment", p 183-203. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- HALFORD, S.E. y J. GRINSTED (1985). "Transposable elements and evolution". En K. H. Schleifer y E. Stackebrandt (eds). "Evolution of Prokaryotes". FEMS Symposium n^o 29. Academic Press.

London.

- HANCOCK, R.E.W. (1984). "Alterations in outer membrane permeability". *Annu. Rev. Microbiol.* 38:237-264.
- HANCOCK, R.E.W. (1987). "Role of porins in outer membrane permeability". *J. Bacteriol.* 169:929-933.
- HANNE, L.F. y R.A. FINKELSTEIN (1982). "Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by Vibrio cholerae". *Infect. Immun.* 36:209-214.
- HARTL, D.L. y D.E. DYKHUIZEN (1984). "The population genetics of Escherichia coli". *Annu. Rev. Genet.* 18:31-68.
- HASIN, M., S. ROTTEM y S. RAZIN (1975). "The outer membrane of Proteus mirabilis. Isolation and characterization of the outer membrane fractions". *Biochem. Biophys. Acta* 375:381-394.
- HECKELS, J.E. (1977). "The surface properties of Neisseria gonorrhoeae: isolation of the major components of the outer membrane". *J. Gen. Microbiol.* 99:333-341.
- HECKELS, J.E. (1982). "Role of surface proteins in the adhesion of Neisseria gonorrhoeae". En D. Schlessinger (ed). "Microbiology-1982", p 301-311. American Society for Microbiology, Washington.
- HOLLOWAY, B. W. (1979). "Plasmids that mobilize bacterial chromosome". *Plasmid.* 2: 1-19.
- HOLMGREM, J., A.-M. SVENNERHOLM y M. LINDBLAD (1983). "Receptor like: glycoconpounds in human milk that inhibit classical and eltor Vibrio cholerae cell adherence (hemagglutination)". *Infect. Immun.* 39:147-154.
- HOOD, M.A. y G.E. NESS (1982). "Survival of Vibrio cholerae and Escherichia coli in estuarine waters and sediments". *Appl. Environ. Microbiol.* 43:578-584.
- HOOD, M.A., G.F. NESS y G.E. RODRICK (1981). "Isolation of Vibrio cholerae serotype O1 from the eastern oyster Crassostrea virginica". *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 559-560.
- HOOD, M.A., G.E. NESS, G.E. RODRICK y N.J. BLAKE (1984). "The ecology of Vibrio cholerae in two Florida estuaries" . En R.R. Colwell (ed). "Vibrios in the environment", p 399-409. John Wiley and

Sons, Inc., New York.

- HISU, T.C., W.D. WALTMAN y E.B. SHOTTS (1981). "Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of Aeromonas hydrophila". International Symposium of Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, W, Va., U.S.A.
- HUQ, A., S.A. HUQ, D.J. GRIMES, M. O'BRIEN, K.H. CHU, J.M. CAPUZZO y R.R. COLWELL (1986). "Colonization of the gut of the blue crab (Callinectes sapidus) by Vibrio cholerae". Appl. Environ. Microbiol. 52:586-588.
- HUQ, A., P.A. WEST, E.B. SMALL, M.I. HUQ y R.R. COLWELL (1984a). "Influence of water temperature, salinity and pH on survival and growth of toxigenic Vibrio cholerae serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosms". Appl. Environ. Microbiol. 48:420-424.
- HUQ, A., E.B. SMALL, P.A. WEST, M.I. HUQ, R. RAHMAN y R.R. COLWELL (1983). "Ecological relationships between Vibrio cholerae and planktonic crustacean copepods". Appl. Environ. Microbiol. 45:275-283.
- HUQ, A., E.B. SMALL, P.A. WEST y R.R. COLWELL (1984b). "The role of planktonic copepods in the survival and multiplication of Vibrio cholerae in the aquatic environment" . En R.R. Colwell (ed). "Vibrios in the environment", p 521-534. John Wiley and Sons. Inc. New York
- JIWA, S.F.H. y JONES, G.W. (1984). "Mechanisms of the attachment of bacteria to animal cells". En M.J. Klug y C.A. Reddy (eds). "Microbial ecology", p 136-143. American Society for Microbiology, Washington.
- JONES, G.W. (1984). "Mechanisms of the attachment of bacteria to animal cells". En M.J. Klug y C.A. Reddy (eds). "Microbial ecology", p 136-143. American Society for Microbiology, Washington.
- JONES, G.W., G.D. ABRAMS y R. FRETER (1976). "Adhesive properties of Vibrio cholerae: adhesion to isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes". Infect. Immun. 14:232-239.

- JONES, G.W. y R. FRETER (1976). "Adhesive properties of Vibrio cholerae: nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes". *Infect. Immun.* 14:240-245.
- JONES, G.W. y R.E. ISAACSON (1983). "Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors". *Crit. Rev. Microbiol.* 10:229-260.
- KABIR, S. (1980). "Composition and immunochemical properties of outer membrane proteins of Vibrio cholerae". *J. Bacteriol.* 144:382-389.
- KABIR, S. (1983). "Immunochemical properties of the major outer membrane proteins of Vibrio cholerae". *Infect. Immun.* 39:452-455.
- KABIR, S. y S. ALI (1983). "Characterization of surface properties of Vibrio cholerae". *Infect. Immun.* 39:1048-1058.
- KADO, C.I. y S.T. LIU (1981). "Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids". *J. Bacteriol.* 145:1365-1373.
- KANEKO, T. and R.R. COLWELL (1978). "The annual cycle of life of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay". *Microb. Ecol.* 4: 135-156.
- KAPER, J., H. LOCKMAN, R.R. COLWELL y S.W. JOSEPH (1979). "Ecology, serology and enterotoxin production of Vibrio cholerae in Chesapeake Bay". *Appl. Environ. Microbiol.* 36:91-103.
- KAPER, J., H. LOCKMAN, E.F. REMMERS, K. KRISTENSEN y R.R. COLWELL (1983). "Numerical taxonomy of vibrios isolated from estuarine environments". *Int. J. Sys. Bact.* 33: 229-255.
- KAPER, J.B., S.L. MOSELEY y S. FALKOW (1981). "Molecular characterization of environmental and nontoxigenic strains of Vibrio cholerae". *Infect. Immun.* 32:661-667.
- KELCH, W.J. y J.S. LEE (1978). "Antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria isolated from environmental sources". *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 450-456.
- KELLEY, J.T. y C.D. PARKER (1981). "Identification and preliminary characterization of Vibrio cholerae outer membrane proteins". *J. Bacteriol.* 145:1018-1024.
- KLEBBA, P.E., M.A. McINTOSH y J.B. NEILANDS (1982). "Kinetics of biosynthesis of iron-regulated membrane proteins in Escherichia

- coli". J. Bacteriol. 143: 256-264.
- KOBORI, H., C.W. SULLIVAN y H. SHIZUYA (1984). "Bacterial plasmids in Antarctic natural microbial assemblages". Appl. Environ. Microbiol. 48:515-518.
- KOGA, T. y T. KAWATA (1983). "Isolation and characterization of the outer membrane from Vibrio parahaemolyticus". J. Gen. Microbiol. 129:3185-3196.
- KOGURE, K., U. SIMIDU y N. TAGA (1980). "Effect of phyto and zooplankton on the growth of marine bacteria in filtered seawater". Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46: 323-326.
- KOTHARY, M.H. y A.S. KREGER (1985). "Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by Vibrio damsela". Infect. Immun. 49:25-31.
- KUCHLER, R.J. (1977). "Biochemical methods in cell culture and virology". Dowden, Hutchinson y Ross, Inc. Publis.
- LAEMMLI, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature 227:680-685.
- LEBEK, G. (1969). "Die infektiöse bakterielle antibiotikresistenz". Hans Huber. Berna.
- LEE, J.V., D.J. BASHFORD, T.J. DONOVAN, A.L. DONOVAN, A.L. FURNISS y P.A. WEST (1982). "The incidence of Vibrio cholerae in water, animals and birds in Kent, England". J. Appl. Bacteriol. 52:281-291.
- LEE, J.V., D.J. BASHFORD, T.J. DONOVAN, A.L. FURNISS y P.A. WEST (1984). "The incidence and distribution of Vibrio cholerae in England". En R.R. Colwell (ed.). "Vibrios in the environment", p 427-450. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- LEE, C.W., D.J. ECKER y K.N. RAYMOND (1985). "The pH-dependent reduction of ferric enterobactin probed by electrochemical methods and its implications for microbial iron transport". J. Am. Chem. Soc. 107:6920-6923.
- LEIBOVITZ, A. (1977). "Preparation of medium L-15". Tiss. Cult. Ass. 35701:557-559.
- LEMONS, M.L., P. SALINAS, A.E. TORANZO, J.L. BARJA y J.H. CROSA (1987). "Caracterización del sistema de transporte de hierro en cepas de

- Vibrio anguillarum causantes de epizootias en peces cultivados". En Hardisson C.R. (ed.) "Libro de comunicaciones del XI Congreso de Microbiología (Gijón) vol.I", p 94-95. Sociedad Española de Microbiología.
- LENNETTE, E.H., A. BALOWS, W.J. HAUSER y J.P. TRUANT (1980) "Manual of clinical microbiology". 3^a ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- LEVETT, P.N. y R.R. DANIEL (1981). "Adhesion of vibrios and aeromonads to isolated rabbit brush borders". J. Gen. Microbiol. 125:157-172.
- LODGE, J.M.T., P. WILLIAMS y M.R.W. BROWN (1986). "Influence of growth rate and iron limitation on the expression of outer membrane proteins and enterobactin by Klebsiella pneumoniae grown in continuous culture". J. Bacteriol. 165:353-356.
- LOWRY, O.H., N. ROSEBROUGH, A. L. FARR y R. J. RANDALL (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". J. Biol. Chem. 193:265-275.
- LUNDRIGAN, M.D. y C.F. EARHART (1984). "Gene env Y of Escherichia coli K12 affects thermoregulation of major porin expression". J. Bacteriol. 157:262-268.
- LUPTON, F.S. y K.C. MARSHALL (1984). "Mechanisms of specific bacterial adhesion to cyanobacterial heterocysts". En M.J. Klug y C.A. Reddy (eds). "Microbial ecology", p 144-150. American Society for Microbiology. Washington.
- MACDONELL, M.T. y M.A. HOOD (1982). "Isolation and characterization of ultramicrobacteria from a Gulf Coast estuary". Appl. Environ. Microbiol. 43: 566-571.
- MACDONELL, M.T. y M.A. HOOD (1984). "Ultramicrovibrios in Gulf Coast estuarine waters: isolation, characterization and incidence". En R.R. Colwell (ed.). "Vibrios in the environment", p 551-562. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- MACH, P.A. y D.J. GRIMES (1982). "R plasmid transfer in a wastewater treatment plant". Appl. Environ. Microbiol. 44:1395-1403.
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH y J. SAMBROOK (1982). "Molecular Cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory.

- MANNING, P.A. y D.R. HAYNES (1984). "A common-immunogenic Vibrio outer membrane protein". FEMS Microbiol. Lett. 24:297-302.
- MANNING, P.A., F. IMBESI y D.R. HAYNES (1982). "Cell envelope proteins in Vibrio cholerae". FEMS Microbiol. Lett. 14:159-166.
- MARE, I.J. (1968). "Incidence of R-factors among gramnegative bacteria in drug free human and animal communities". Nature 220:1046-1047.
- MARTINEZ GERMES, P., J.P. MARTINEZ, E. GARAY y E. HERNANDEZ (1981). "Estudio de bacterias heterótrofas autóctonas del lago de la Albufera de Valencia". Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. 21(3): 353-364.
- MATSUSHITA, K., O. ADACHI, E. SHINAGAWA y A. MEYANA (1978). "Isolation and characterization of outer and inner membranes from Pseudomonas aeruginosa and effect of EDTA on the membranes". J. Biochem. (Tokyo) 83:171-181.
- MATZANKE, B., D.J. ECKER, T.S. YANG, B.H. HUYNH, G. MULLER y K.N. RAYMOND (1986). "Escherichia coli iron enterobactin uptake monitored by Mössbauer spectroscopy". J. Bacteriol. 167:674-680.
- McINTYRE, O.R., J.C. FEELEY y W.B. GREENOUGH (1965). "Diarrhea caused by non-cholera vibrios". Am. J. Trop. Med. Hyg. 14:412-441.
- McNICOL, L.A., K.M.S. AZIZ, I. HUQ, J.B. KAPER, H.A. LOCKMAN, E.F. REMMERS, W.M. SPIRA, J.M. VOLL y R.R. COLWELL (1980). "R-factor carriage in a group F-Vibrio isolated from Bangladesh". Antimicrob. Agents. Chemother. 17:477-483.
- MERCER, E.H. y M.S.C. BIRBECK (1974). "Manual de microscopía electrónica para biólogos". Ed. Blume. Barcelona.
- MILES, A.A. y P.L. KHIMJI (1975). "Enterobacterial chelators of iron: their occurrence, detection, and relation to pathogenicity". J. Med. Microbiol. 8:477-489.
- MITSUHASHI, S. (1977). "R factor, drug resistance plasmid". University of Tokio Press.
- MONZIK, B. y A.L. CRUMBLISS (1979). "Mechanism of ligand substitution of high spin-iron (III) by hidroxamic acid chelators. Thermodynamic and kinetic studies on the formation and dissociation of a series of monhidroxamato iron (III) complexes". J. Am. Chem. Soc. 101:6203-6213.

- MORRIS, G. K., M. H. MERSON, I. HUQ, A. K. M. G. KIBRYA y R. BLACK (1979). "Comparison of four plating media for isolating Vibrio cholerae". J. Clin. Microbiol. 9: 79-83.
- MÜLLER, H.E. (1978). "Ocurrence and ecology of NAG vibrios in surface waters". Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Erste. Abt. Orig. Reihe. B Hyg. Betriebshyg. Praev. Med. 167:272-284.
- MUROGA, K., S. TAKAHASHI, H. YAMANOI y M. NISHIBUCHI (1979). "Non-cholera vibrio isolated from diseased ayu". Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 45:829-839.
- NEILANDS, J.B. (1981). "Microbial iron compounds" Ann. Rev. Biochem. 50:715-731.
- NEILANDS, J.B. (1982). "Microbial envelope proteins related to iron". Annu. Rev. Microbiol. 36:285-309.
- NELSON, E.T., J.D. CLEMENTS y R.A. FINKELSTEIN (1976). "Vibrio cholerae adherence and colonization in experimental cholera: electron microscopic studies". Infect. Immun. 14:527-547.
- NIEMI, M., M. SBAKOV y S. NIEMELA (1983). "Antibiotic resistance among different species of fecal coliforms isolated from water samples". Appl. Environ. Microbiol. 45: 79-83.
- NIKAIDO, H. y T. NAKAE (1979). "The outer membrane of gramnegative bacteria". Adv. Microb. Physiol. 20:163-250.
- NIKAIDO, H. y M. VAARA (1985). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability". Microbiol. Rev. 49:1-32.
- NISHIBUCHI, M., R.J. SEIDLER, D.M. ROLLINS y S.W. JOSEPH (1983). "Vibrio factors cause rapid fluid accumulation in suckling mice". Infect. Immun. 40:1083-1091.
- NOVICK, R.P. y S.I. MORSE (1967). "In vivo transmission of drug resistance factors between strains of Staphylococcus aureus". J. Exp. Med. 125:45-59.
- OLTRA, R. y M.R. MIRACLE (1984). "Comunidades zooplanctónicas de la Albufera de Valencia". Limnética 1:51-61.
- OSBORN, M.J. y H.P.C. WU (1980). "Proteins of the outer membrane of gramnegative bacteria". Ann. Rev. Microbiol. 34:369-422.
- PANDIT, C.G., S.C. PAL, G.V.S. MURTI, B.S. MISRA, D.K. MURTY y J.B.

- SHRIVASTAVA (1967). "Survival of Vibrio cholerae biotype Etor in well water". Bull. of the World Health Organization. 37:779-786.
- PAYNE, S.M. (1980). "Synthesis and utilization of siderophores by Shigella flexneri". J. Bacteriol. 143:1420-1424.
- PAYNE, S.M. y R.A. FINKELSTEIN (1978). "Siderophore production by Vibrio cholerae". Infect. Immun. 20:310-311.
- PESIGAN, T.P., J. PLANTILLA y M. ROLDA (1967). "Applied studies on the viability of Etor vibrios". Bull. of the World Health Organization. 37:779-786.
- PLIKAYTIS, B.D., G.M. CARLONE, P. EDMONDS y L.W. MAYER (1986). "Robust estimation of standard curves for protein molecular weight and linear-duplex DNA base-pair number after gel electrophoresis". Analyt. Biochem. 152:346-364.
- POLLACK, J.R., B.N. AMES y J.B. NEILANDS (1970). "Iron transport in Salmonella typhimurium: mutants blocked in the biosynthesis of enterobactin". J. Bacteriol. 104:635-639.
- POSTLE, K. y R.F. GOOD (1983). "DNA sequence of Escherichia coli tonB gene". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:5235-5239.
- PUJALTE, M.J. y E. GARAY (1986). "Proposal of Vibrio mediterranei sp. nv.: a new marine member of the genus Vibrio". Int. J. Syst. Bacteriol. 36:278-281.
- RABSCH, W., P. PAUL y R. REISSBRODT (1986). "DHBA (2,3-dihydroxybenzo-esäure)-Ausscheidung durch einen enterobactinnegativen multi-resistenten Salmonella typhimurium-Wildstamm". J. Basic. Microbiol. 26:113-116.
- RAYMOND, K.N. y C.J. CARRANO (1979). "Coordination, chemistry and microbial iron transport". Acc. Chem. 12:183-190.
- REANNEY, D. (1976). "Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development". Bacteriol. Rev. 40:552-590.
- REISFIELD, A., E. ROSENBERG y D. GUTNICK (1972). "Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures". Appl. Microbiol. 24:363-368.
- RESNICK, I.G. y L.J. BERRY (1981). Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. K170, p 165.
- RHODES, J.B., H.L. SMITH y J.E. OGG (1986). "Isolation of Non-O1

- Vibrio cholerae serovars from surface waters in Western Colorado". Appl. Environ. Microbiol. 51:1216-1219.
- RICHARDSON, K. y C.D. PARKER (1985). "Identification and characterization of Vibrio cholerae surface proteins by radioiodination". Infect. Immun. 48:87-93.
- ROBERTS, N.C., H.B. BRADFORD jr. y J.R. BARBAY (1984). "Ecology of Vibrio cholerae in Louisiana coastal areas". En R.R. Colwell (ed.). "Vibrios in the environment", p 389-398 John Wiley and Sons. Inc., New York.
- ROBERTS, N.C., R.J. SIEBELING, J.B. KAPER y H.B. BRADFORD (1982). "Vibrios in the Louisiana Gulf Coast environment". Microbiol. Ecol. 8:299-312.
- ROGERS, R.C., R.G.C.J. CUFFE, Y.M. COSSINS, D.M. MURPHY y A.T.C. BOURKE (1980). "The Queensland cholera incident of 1977. The epidemiological investigation". Bull. of the World Health Organization. 58:665-669.
- ROSENBERG, C., F. CASSE-DELBART, I. DUSHA, M. DAVID y C. BOUCHER (1982). "Megaplasms in the plant associated bacteria Rhizobium meliloti and Pseudomonas solanacearum". J. Bacteriol. 150:402-406.
- ROSENBERG, M.E., D. GUTNIK y E. ROSENBERG (1980). "Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity". FEMS Microbiol. Lett. 9:29-33.
- ROSENBERG, M.E., H. JUDES y E. WEISS (1983). "Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ". Infect. Immun. 42:831-834.
- ROUTMAN, E., R.D. MILLER, J. PHILLIPS-CONROY y D.L. HARTL (1985). "Antibiotic resistance and population structure in Escherichia coli from free-ranging african yellow baboons". Appl. Environ. Microbiol. 50:749-754.
- RYPKA, E.W. (1967). "A model for the identification of bacteria". J. Gen. Microbiol. 46:407-424.
- SAKAZAKI, R. y A. BALOWS (1981). "The genera Vibrio, Plesiomonas and Aeromonas". En " the Prokaryotes", p 1272-1301. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- SAKAZAKI, R., C.Z. GOMEZ y M. SEBALD (1967). "Taxonomical studies of the so-called NAG vibrios". Jap. J. Med. Scienc. Biol. 20:265-280.
- SALAMA, S., J.D. STONG, J.B. NEILANDS y G.T. SPIRO. (1978). "Electronic and resonance raman spectra of iron (III) complexes of enterobactin, catechol and N-methyl-2,3-dihydroxibenzamide". Biochemistry. 17:3781-3785.
- SANTOS, Y., A.E. TORANZO, J.L. BARJA, T.P. NIETO y T.G. VILLA (1987). "Virulence properties and enterotoxin production of Aeromonas strains isolated from fish culture systems". Infect. Immun. (en prensa).
- SANSONETTI, P., J. LAFONT, K. JAFFE-BRACHERT, J.F. GUILLOT y E. CHASLUS-DANCLA (1980). "Parameters controlling interbacterial plasmid spreading in a gnotoxenic chicken gut system: influence of plasmids and bacterial mutations". Antimicrob. Agents Chemother. 17:327-333.
- SCHNAITMAN, C.A. (1971a). "Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of Escherichia coli". J. Bacteriol. 108:553-563.
- SCHNAITMAN, C.A. (1971b). "Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by Triton X-100". J. Bacteriol. 108:545-552.
- SCHNAITMAN, C.A. (1973). "Outer membrane proteins of Escherichia coli. Effect of preparative conditions on the migration on protein in polyacrylamide gels". Arch. Biochem. Biophys. 157:541-552.
- SCHNEIDER, D.R. y C.D. PARKER (1978). "Isolation and characterization of protease-deficient mutant of Vibrio cholerae". J. Infect. Dis. 138:143-151.
- SCHNEIDER, D.R., S.P. SIGEL y C. PARKER (1981). "Characterization of Vibrio cholerae protease activities with peptide digest analysis". J. Clin. Microbiol. 13:80-84.
- SCHWYN, B. y J.B. NEILANDS (1987). "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores". Analytical Biochem. 160:47-56.
- SCIORTINO, C.V. y R.A. FINKELSTEIN (1983): "Vibrio cholerae expresses

- iron-regulated outer membrane proteins in vivo". *Infect. Immun.* 42:990-996.
- SCIORTINO, C.V., Z., YANG y R.A. FINKELSTEIN (1985). "Monoclonal antibodies to outer membrane antigens of Vibrio cholerae". *Infect. Immun.* 49:122-131.
- SEIDLER, R.J. y T.M. EVANS (1984). "Computer-assisted analysis of Vibrio field data: four coastal areas". En R.R. Colwell (ed.). "Vibrios in the environment", p 411-425 John Wiley and Sons. Inc. New York.
- SHARON, N. y OFEK, I. (1983). "Cómo se adhieren las bacterias a las células". *Mundo científico* 25:564-566.
- SHAW, D.R. y V.J. CABELLI (1980). "Conjugal transfer of R-plasmid R1-drd-19 in Escherichia coli below 22°C". *Appl. Environ. Microbiol.* 42:789-791.
- SIGEL, S.P. y S.M. PAYNE (1982). "Effect on iron limitation on growth, siderophore production and expression of outer membrane proteins of Vibrio cholerae". *J. Bacteriol.* 150:148-155.
- SIGEL, S.P., J.A. STOEIBNER y S.M. PAYNE (1985). "Iron-vibriobactin transport system is not required for virulence of Vibrio cholerae". *Infect. Immun.* 47:360-362.
- SILHAVY, T.J., M.L. BERMAN y L.W. ENQUIST (1984). "Experiments with gene fusions". Cold Spring Harbor Laboratory.
- SIMIDU, U., E. KANEKO y N. TAGA (1977). "Microbial studies of Tokio Bay". *Microb. Ecol.* 3:173-191.
- SIMPSON, L.M. y J.D. OLIVER (1983). "Siderophore production by Vibrio vulnificus". *Infect. Immun.* 41:644-649.
- SINGLETON, F.L., R.W. ATTWELL, M.S. JANGI y R.R. COLWELL (1982a). "Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of Vibrio cholerae in aquatic microcosm". *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1080-1085.
- SINGLETON, F.L., R.W. ATTWELL, M.S. JANGI y R.R. COLWELL (1982b). "Effects of temperature and salinity on Vibrio cholerae growth". *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1047-1058.
- SMITH, D.H. (1967). "R-factor infection of Escherichia coli lyophilized in 1946". *J. Bacteriol.* 94:2071-2072.

- SMITH, H.L. y K. GOODNER (1965) "On the classification of vibrios".
En Proc. Cholera. Res. Symp. Hawaii. Publ. Hlth. Serv. Pub. No.
1328 p 4 Washington. U.S. Gort. Printing Office. Citado por
Carpenter y cols. (1968).
- SNEATH, P.H.A. (1972). "Computer Taxonomy". En Norris J.R. & D.W.
Ribbons (eds). "Methods in Microbiology" vol 7A pp 29-98.
Academic Press London.
- SOKAL, R.R. y F.J. ROHLF (1979). "Biometría". 1ª Ed. Editorial Blume.
Madrid.
- SQUIRE, P.G., D.W. SMILEY y R.B. CROSKELL (1984). "Identification and
extraction of Pasteurella haemolytica membrane proteins". Infect.
Immun. 45:667-673.
- STERKENBURG, A.S., E. VLEGELS y J.T.M. WOUTERS (1984). "Influence of
nutrient limitation and growth rate on the outer membrane of
Klebsiella aerogenes NCTC 418". J. Gen. Microbiol. 130:2347-2355.
- STEWART, K.R. y L. KODITSHEK (1980). "Drug-resistance transfer in
Escherichia coli in New York bight sediment". Mar. Pollut. Bull.
11:130-133.
- STOTZKY, G. y V.N. KRASOVSKY (1981). "Ecological factors that affect
the survival, establishment growth and genetic recombination of
microbes in natural habitats". En S.B. Levy, R.C. Clowes y E.L.
Koenig (eds). "Molecular biology, pathogenicity and ecology of
bacterial plasmids", p 31-42. Plenum Press. New York
- SUAREZ, J.E., P. ARCA, J. LLANEZA, C.J. VILLAR, C. HARDISSON y M.C.
MENDOZA (1987). "Naturaleza y epidemiología de la resistencia
plasmídica a fosfomicina". En Hardisson C.R. (ed.). "Resumen de
ponencias del XI Congreso de Microbiología (Gijón)", p 91-97.
Sociedad Española de Microbiología
- SVENNERHOLM, A-M., M.M. LEVINE y J. HOLMGREM (1984). "Weak serum and
intestinal antibody responses to Vibrio cholerae soluble
hemagglutinin in cholera patients". Infect. Immun. 45:792-794.
- THOMAS, C.M. (1984). "Analysis of clones". En P.M. Bennett y J.
Grinsted (eds). "Methods in Microbiology" 17:164-197. Academic
Press. London.
- TISON, D.L., M. NISHIBUCHI, R.J. SEIDLER y R.J. SIEBELING (1986).

- "Isolation of Non-O1 Vibrio cholerae Serovars from Oregon coastal environments". Appl. Environ. Microbiol. 51: 444-445.
- TORANZO, A.E. (1980). "Supervivencia de Enterovirus y virus de peces salmónidos en el medio acuático. Inactivación de Polio 1 por bacterias marinas productoras de antibióticos". Tesis Doctoral.. Universidad de Santiago. ISBN 84-7191-228-8.
- TORANZO, A.E. y J.L. BARJA (1985). "Effect of experimental procedures on the determination of drug resistance transfer in bacterial fish pathogens". Bull. Eur. Fish. Pathol. 5:51-54.
- TORANZO, A.E., J.L. BARJA, R.R. COLWELL y F.M. HETRICK (1983a).. "Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens". Infect. Immun. 39:184-192.
- TORANZO, A.E., J.L. BARJA, R.R. COLWELL, F.M. HETRICK y J.H. CROSA (1983b). "Haemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of Vibrio anguillarum and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic coast". FEMS Microbiol. Lett. 18:257-262.
- TORANZO, A.E., P. COMBARRO, M.L. LEMOS y J.L. BARJA (1984). "Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured rainbow trout". Appl. Environ. Microbiol. 48:872-877.
- TORANZO, A.E., Y. SANTOS, M.L. LEMOS, A. LEDO y J. BOLINCHES (1987). "Homology of Vibrio anguillarum strains causing epizootics in turbot, salmon and trout reared in the Atlantic coast of Spain ". Aquaculture (en prensa).
- TORRES, L. (1985). "Complejo Fe(III)-ligando fluorescente producido por Pseudomonas syringae: purificación y caracterización parcial". Tesina de licenciatura. Fac. Ciencias Biológicas. Valencia.
- TORRES, L., J.E. PEREZ-ORTIN, V. TORDERA y J.P. BELTRAN (1986). "Isolation and characterization of an Fe(III)-chelating compound produced by Pseudomonas syringae". Appl. Environ. Microbiol. 52:157-160.
- TRUST, T.J., W.W. KAY y E.E. ISHIGURO (1983). "Cell surface hydrophobicity and macrophage association of Aeromonas salmonicida". Curr. Microbiol. 9:315-318.
- TWEDT, R.M. (1978). "Isolation and Identification of Vibrio

- parahaemolyticus". En AOAC (eds). "Bacteriological Analytical Manual FDA 5th ed. Food and Drug Administration". Washington DC.
- VAN ALPHEN, W y B. LUGTENBERG (1977). "Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of Escherichia coli". J. Bacteriol. 131:623-630.
- VOOGD, C.E., P.A.M. GUINEE, A. MANTEN y E.H. KAMPELMACHER (1968). "Incidence of resistance to tetracycline, chloramphenicol and ampicillin among Salmonella species isolated in The Netherlands in 1965 and 1966". Antoine van Leeuwenhoek. 34:357-364.
- VOOGD, C.E., P.A.M. GUINEE, A. MANTEN y E.H. KAMPELMACHER (1973). "Incidence of resistance to tetracycline, chloramphenicol and ampicillin among Salmonella species isolated in The Netherlands in 1969, 1970 and 1971". Antoine van Leeuwenhoek 39:321-329.
- VOOGD, C.E., J. VAN LEEUWEN, P.A.M. GUINEE, A. MANTEN y E.H. KAMPELMACHER (1977). "Incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and kanamycin and tetracycline among Salmonella species isolated in The Netherlands in 1972, 1973 and 1974". Antoine van Leeuwenhoek 43:269-281.
- WALTER, M.A., S.A. POTTER y J.H. CROSA (1983). "Iron uptake system mediated by Vibrio anguillarum plasmid pJM1". J. Bacteriol. 156:880-887.
- WALTER, M.V. y J.W. VENNES (1985). "Occurrence of multiple antibiotic-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons". Appl. Environ. Microb. 50:930-933.
- WASHINGTON, J.A. y A.L. BARRY (1974). "Dilution test procedures". En E.H. Lenette, E.H. Spaulding y J.P. Truant (eds). "Manual of Chemical Microbiology, 2ª ed", p 410-417. American Society for Microbiology, Washington DC.
- WEINGBERG, S.R. y G. STOTZKY (1972). "Conjugation and genetic recombination of Escherichia coli in soil". Soil Biol. Biochem. 4:171-180.
- WEST, P.A. y R.R. COLWELL (1984). "Identification and classification of Vibrionaceae: an overview". En R.R. Colwell (ed.), "Vibrios in the environment", p 427-450. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- WEST, P.A. y J.V. LEE (1982). "Ecology of Vibrio species, including

- Vibrio cholerae in natural waters of Kent, England". Appl. Environ. Microbiol. 52:435-448.
- WILLETS, N (1984). "Conjugation". En P.M. Bennet y J. Grinsted (eds). "Methods in Microbiology" 17:33-60. Academic Press London.
- WILLIAMS, P.H. (1977). "Plasmid transfer in the human alimentary tract". FEMS Microbiol. Lett. 2:91-95.
- WILLIAMS, P.H. (1979). "Novel iron uptake system specified by ColV plasmid: an important component in the virulence of invasive strains of Escherichia coli". Infect. Immun. 26:925-932.
- WILLSHAW, G.A., H.R. SMITH y E.S. ANDERSON (1979). "Application of agarose gel electrophoresis to the characterization of plasmid DNA in drug-resistant enterobacteria". J. General. Microbiol. 114:15-25.
- WITKOWSKA, D., G. ADAMIS, M. MULCZYK y E. ROMANOWSKA (1982). "Outer membrane protein composition of Shigella flexneri". FEMS Microbiol. Lett. 13:109-111.
- WRIGHT, A.C., L.M. SIMPSON, K. RICHARDSON, D.R. MANEVAL, J.D. OLIVER y G.M. MORRIS (1986). "Siderophore production and outer membrane proteins of selected Vibrio vulnificus strains under conditions of iron limitation". FEMS Microbiol. Lett. 35:255-260.
- YAMAMOTO, K., M. AL-OMANI, T. HONDA, Y. TAKEDA y T. MIWATANI (1984). "Non-O1 Vibrio cholerae hemolysin: Purification partial characterization, and immunological relatedness to Eltor hemolysin". Infect. Immun. 45:192-196.
- YAMAMOTO, K., Y. TAKEDA, T. MIWATANI y J.P. CRAIG (1983). "Evidence that a non-O1 Vibrio cholerae produces enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin". Infect Immun. 41:896-901.
- YAMANOI, H., K. MUROGA y S. TAKAHASHI (1980). "Physiological characteristics and pathogenicity of NAG vibrio isolated from diseased ayu". Fish. Patol. 15:69-73.
- YOH, M., T. HONDA y T. MIWATANI (1985). "Production by non-O1 Vibrio cholerae of hemolysin related to thermostable direct hemolysin of Vibrio parahaemolyticus". FEMS Microbiol. Lett. 29:197-200.
- YOUNG, D.B. y D.A. BROADBENT (1982). "Biochemical characterization of extracellular proteases from Vibrio cholerae". Infect. Immun. 37:875-883.

FE DE ERRATAS

Página:	donde dice:	debe decir:
153	T°	temperatura
159	T°	temperatura
186	2000 500,	2000 <u>+</u> 500,
	15 5,	15 <u>+</u> 50,
	0.350 0.050,	0.350 <u>+</u> 0.050,
	0.150 0.050	0.150 <u>+</u> 0.050

Además

En el capítulo 4, donde dice, lipoproteína mureína , debe decir, lipoproteína de la mureína.

En la página 130, la frase, (puede consultarse la matriz de datos en el apéndice del capítulo), no debería aparecer.

En todo el texto, donde aparece, ciclo celular, debería aparecer, desarrollo poblacional, o bien, ciclo poblacional.

En la página 188, a la Tabla 5.2., le falta la parte que sigue

TABLA 5.2. (continuación)

Cepas constitutivas, de cada grupo	Frecuencia, (%)	Origen	CMI EDDA, mM ^a
209,213,215,219,223,224,227, 228,229,231,233,234,235,236, 238,241,244,246,247	12.33	agua dulce	0.150(0.050)
66A,67A,115A,120A,121A	3.42	plancton lago	0.150(0.050)
76A,98A	1.37	plancton mar	0.150(0.050)
7270 NCTC,3661 NCTC,569B ATCC	2.05	clínico	0.090(0.015)
156,160,170,172,173,190	4.11	agua dulce	0.090(0.030)
127,33	1.37	agua dulce	0.070(0.020)
151,158	1.37	agua dulce	0.060(0.010)
110,113,264,268,251,18,30	4.80	agua salobre	0.060(0.015)
155A,159A,162A	2.05	plancton mar	0.060(0.015)
153	0.69	agua salobre	0.015(0.005)
24	0.69	agua dulce	0.015(0.005)
8021 NCTC	0.69	clínico	NC ^b

- a. Valor medio y desviación típica de las CMIs de cada grupo. Cada CMI es la media de dos determinaciones independientes.
- b. No creció a ninguna de las concentraciones ensayadas, la mínima de las cuales fue 5µM.



FE DE ERRATAS

Página:	donde dice:	debe decir:
153	T°	temperatura
159	T°	temperatura
186	2000 500,	2000 <u>±</u> 500,
	15 5,	15 <u>±</u> 50,
	0.350 0.050,	0.350 <u>±</u> 0.050,
	0.150 0.050	0.150 <u>±</u> 0.050

Además

En el capítulo 4, donde dice, lipoproteína mureína , debe decir, lipoproteína de la mureína.

En la página 130, la frase, (puede consultarse la matriz de datos en el apéndice del capítulo), no debería aparecer.

En todo el texto, donde aparece, ciclo celular, debería aparecer, desarrollo poblacional, o bien, ciclo poblacional.

En la página 188, a la Tabla 5.2., le falta la parte que sigue

TABLA 5.2. (continuación)

Cepas constitutivas, de cada grupo	Frecuencia, (%)	Origen	CMI EDDA, mM ^a
209,213,215,219,223,224,227, 228,229,231,233,234,235,236, 238,241,244,246,247	12.33	agua dulce	0.150(0.050)
66A,67A,115A,120A,121A	3.42	plancton lago	0.150(0.050)
76A,98A	1.37	plancton mar	0.150(0.050)
7270 NCTC,3661 NCTC,569B ATCC	2.05	clínico	0.090(0.015)
156,160,170,172,173,190	4.11	agua dulce	0.090(0.030)
127,33	1.37	agua dulce	0.070(0.020)
151,158	1.37	agua dulce	0.060(0.010)
110,113,264,268,251,18,30	4.80	agua salobre	0.060(0.015)
155A,159A,162A	2.05	plancton mar	0.060(0.015)
153	0.69	agua salobre	0.015(0.005)
24	0.69	agua dulce	0.015(0.005)
8021 NCTC	0.69	clínico	NC ^b

a. Valor medio y desviación típica de las CMIs de cada grupo. Cada CMI es la media de dos determinaciones independientes.

b. No creció a ninguna de las concentraciones ensayadas, la mínima de las cuales fue 5uM.

FE DE ERRATAS

Página:	donde dice:	debe decir:
153	T°	temperatura
159	T°	temperatura
186	2000 500,	2000+500,
	15 5,	15+50,
	0.350 0.050,	0.350+ 0.050,
	0.150 0.050	0.150+0.050

Además

En el capítulo 4, donde dice, lipoproteína mureína , debe decir, lipoproteína de la mureína.

En la página 130, la frase, (puede consultarse la matriz de datos en el apéndice del capítulo), no debería aparecer.

En todo el texto, donde aparece, ciclo celular, debería aparecer, desarrollo poblacional, o bien, ciclo poblacional.

En la página 188, a la Tabla 5.2., le falta la parte que sigue

TABLA 5.2. (continuación)

Cepas constitutivas, de cada grupo	Frecuencia, (%)	Origen	CMI EDDA, mM ^a
209,213,215,219,223,224,227, 228,229,231,233,234,235,236, 238,241,244,246,247	12.33	agua dulce	0.150(0.050)
66A,67A,115A,120A,121A	3.42	plancton lago	0.150(0.050)
76A,98A	1.37	plancton mar	0.150(0.050)
7270 NCTC,3661 NCTC,569B ATCC	2.05	clínico	0.090(0.015)
156,160,170,172,173,190	4.11	agua dulce	0.090(0.030)
127,33	1.37	agua dulce	0.070(0.020)
151,158	1.37	agua dulce	0.060(0.010)
110,113,264,268,251,18,30	4.80	agua salobre	0.060(0.015)
155A,159A,162A	2.05	plancton mar	0.060(0.015)
153	0.69	agua salobre	0.015(0.005)
24	0.69	agua dulce	0.015(0.005)
8021 NCTC	0.69	clínico	NC ^b

a. Valor medio y desviación típica de las CMIs de cada grupo. Cada CMI es la media de dos determinaciones independientes.

b. No creció a ninguna de las concentraciones ensayadas, la mínima de las cuales fue 5µM.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesorera

D. Carmen Amaro Gonzalez

calificación de Apto "cum laude"

Valencia, a 14 de Diciembre de 1977

El Secretario,

~~El Presidente~~

A large, stylized handwritten signature in blue ink, written over the printed text 'El Presidente'. The signature is highly cursive and appears to be 'Juan Carlos'.