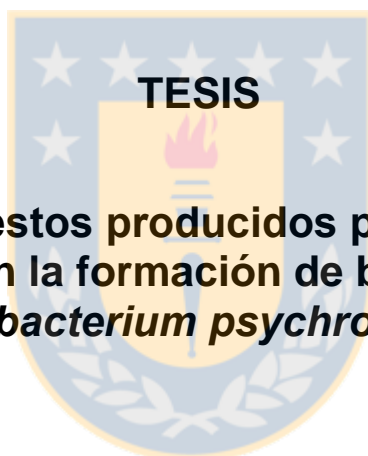




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa Magíster en Ciencias, mención Microbiología



**“Efecto de compuestos producidos por cepas bacterianas
antárticas en la formación de biopelículas de
Flavobacterium psychrophilum”**

ARELY FERNANDA LEYTON DOMÍNGUEZ

CONCEPCIÓN, CHILE

2013

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

Profesor Guía:

Dr. Homero Urrutia Briones
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dra. Katherine Sossa Fernández
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Dra. Helia Bello Toledo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Mariana Domínguez Yévenes
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director de Programa:

Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis de Magíster ha sido posible gracias al financiamiento de:

- **Proyecto Fondecyt 1101009**

“Development of a biofilm for the settlement control of *Flavobacterium psychrophilum*: model of study for fish pathogens biocontrol in aquaculture”.

Investigador responsable: Dr. Homero Urrutia Briones.

Co-investigadores: Dr. Germán Aroca y Dra. Katherinne Sossa.

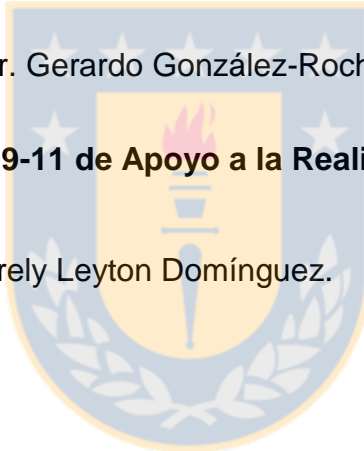
- **Proyecto INACH-17-08**

“Biodiversidad y capacidades metabólicas de la comunidad bacteriana en diferentes hábitat de la península Fildes (Isla Rey Jorge) y cabo Shirreff (Isla Livingston) en el Territorio Chileno-Antártico”.

Investigador responsable: Dr. Gerardo González-Rocha.

- **Proyecto INACH M_09-11 de Apoyo a la Realización de Tesis de Postgrado**

Investigador responsable: Arely Leyton Domínguez.



Agradecimientos

A mi familia, pilar clave y fundamental durante la realización de esta tesis de Postgrado.

Al Dr. Homero Urrutia Briones por instarme a estudiar el apasionante mundo de la Microbiología, así como también al Laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental de la Universidad de Concepción, especialmente a Mery de la Fuente por heredarme el estudio del “fastidioso” patógeno de peces Flavobacterium psychrophilum y por su contribución crítica durante las correcciones del manuscrito, a Pía Oyarzúa por su apoyo en el manejo de las técnicas de laboratorio y por su buena disposición en la discusión y resolución de problemáticas metodológicas y a José Miguel Vidal por su apoyo en el análisis crítico de cada uno de los diseños experimentales que permitieron cumplir los objetivos planteados en esta investigación.

A los profesores del Programa de Magíster en Cs. Mención Microbiología de la Universidad de Concepción por su buena disposición en la resolución de interrogantes, a mis amigos Fabiola y Pablo por su compañía durante estos años de estudio y a mis compañeros, en especial a Violeta y Alejandra, amigas con quienes compartimos no sólo actividades académicas, sino también aquellas que permitieron fortalecer una relación de amistad que espero se mantenga en el tiempo.

Finalmente, a todas aquellas personas que hicieron posible de alguna manera u otra la realización de esta tesis y de este programa de estudios.



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Salmonicultura en Chile	1
1.2 <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	4
1.2.1 Características generales del microorganismo.....	4
1.2.2. Enfermedad bacteriana del agua fría.....	5
1.2.3. Patogénesis.....	7
1.3 Resistencia a antibióticos	10
1.4 Biopelículas.....	13
1.4.1 Características generales.....	13
1.4.2 Mecanismos de control de las biopelículas.....	16
1.5 Bacterias antárticas	19
1.6 Conclusiones de la revisión bibliográfica	21
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	22
OBJETIVO GENERAL:	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	23
2.2 Obtención de sobrenadantes libres de células	24
2.3 Detección de la actividad inhibitoria de la formación de biopelículas.....	24
2.4 Identificación molecular de la cepa bacteriana inhibidora de biopelícula	26
2.5 Caracterización del compuesto antibiopelículas.....	26
2.5.1 Efecto de los compuestos extraídos con distintos solventes orgánicos desde el sobrenadante de la cepa M ₁₉ B sobre la formación de biopelículas y caracterización química de los compuestos.....	26
2.5.2 Detección de proteínas en el sobrenadante y su efecto sobre la formación de biopelículas	28
2.6 Análisis estadísticos.	29

3. RESULTADOS	30
3.1 Actividad inhibitoria del sobrenadante de las cepas bacterianas antárticas sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i>	30
3.2 Identificación molecular de la cepa bacteriana inhibidora de biopelículas	33
3.3 Caracterización del compuesto antibiopelículas	34
3.3.1. Extracción con solventes orgánicos de los compuestos presentes en el sobrenadante de la cepa M ₁₉ B y su efecto sobre la formación de biopelículas..	34
3.3.2 Detección de proteínas en el sobrenadante y su efecto sobre la formación de biopelículas.	38
4. DISCUSIÓN	41
5. CONCLUSIONES.....	48
6. BIBLIOGRAFÍA	49



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lesión ulcerativa profunda del pedúnculo caudal provocado por <i>F. psychrophilum</i> en una trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)..	6
Figura 2. Etapas del ciclo de desarrollo de una biopelícula.	14
Figura 3. Efecto antibiopelículas fuerte de los sobrenadantes de las cepas antárticas sobre la formación de la biopelícula de <i>F. psychrophilum</i>	31
Figura 4. Sobrenadantes de las cepas antárticas sin efecto en la formación de la biopelícula de <i>F. psychrophilum</i>	32
Figura 5. Cálculo específico de la formación de biopelículas (SBF).	33
Figura 6. Efecto de distintas concentraciones del compuesto extraído con el solvente hexano sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i> ...	37
Figura 7. Efecto de distintas concentraciones de los compuestos extraídos con el solvente diclorometano sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i>	37
Figura 8. Efecto de distintas concentraciones del compuesto extraído con el solvente acetato de etilo sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i>	38
Figura 9. Gel SDS-PAGE al 16% acrilamida revelado con solución Azul de Coomassie donde se aprecia la banda de proteínas presentes en el sobrenadante de la cepa M ₁₉ B en carril A.....	39
Figura 10. Efecto de distintas concentraciones proteicas presentes en el sobrenadante de la cepa M ₁₉ B sobre la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i>	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción mundial de salmón y trucha cultivado.....	2
Tabla 2. Clasificación del efecto de sobrenadantes de las cepas antárticas en la formación de biopelículas de <i>F. psychrophilum</i>	30
Tabla 3. Pruebas de identificación fenotípicas realizadas a la cepa M ₁₉ B	34
Tabla 4. Compuestos químicos presentes en el sobrenadante de <i>Pseudomonas fragi</i> extraídos con los solventes orgánicos hexano, diclorometano y acetato de etilo.....	35



RESUMEN

En nuestro país, uno de los principales productores mundiales de salmones, las enfermedades causadas por patógenos de acuicultura ocasionan significativas pérdidas económicas, producto de las altas mortalidades que causa en los estados iniciales de desarrollo de las principales especies de cultivo: *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Oncorhynchus kisutch*.

El patógeno de peces *Flavobacterium psychrophilum* es una bacteria psicrófila Gram negativa cuya temperatura óptima de crecimiento es de 15 °C, es altamente proteolítica e incapaz de degradar los carbohidratos. Es el agente etiológico de la enfermedad del agua fría y del síndrome del alevín de la trucha arcoíris que afecta a salmones y truchas a nivel mundial.

El control de las enfermedades producidas por *F. psychrophilum* se lleva a cabo mediante terapia antibiótica. En Chile, los principales antibióticos usados para el tratamiento de las enfermedades provocadas por este patógeno son florfenicol, oxitetraciclina y ácido oxolínico. Sin embargo, actualmente se han reportado elevados porcentajes de cepas resistentes de *F. psychrophilum* a los principales antibióticos usados en acuicultura. Por otro lado, la capacidad de este patógeno de formar biopelículas es un factor que disminuye la efectividad de la terapia antimicrobiana ya que las células bacterianas que la constituyen presentan mayor resistencia a los antibióticos en comparación con las bacterias planctónicas. Es así como surge la necesidad de buscar nuevas alternativas de control de microorganismos patógenos y la Antártica se presenta como una potencial fuente de recursos biotecnológicos. Considerando la diversa bioactividad de bacterias antárticas, se evaluó el efecto inhibitorio de la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* por compuestos secretados por cepas bacterianas antárticas.

Se trabajó con los sobrenadantes libres de células de 67 cepas bacterianas antárticas, aisladas de distintas muestras recolectadas en Península Fildes, isla

Rey Jorge, Territorio Antártico Chileno. La cuantificación de la biopelícula *in vitro* se realizó mediante tinción con cristal violeta y la selección del sobrenadante de la cepa que presentó el mayor efecto inhibitorio de la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum* se realizó mediante el cálculo del índice específico de la formación de biopelículas, *Specific Biofilm Formation* (SBF). La cepa seleccionada fue identificada mediante análisis de la secuencia del gen ADNr 16S y se evaluó el efecto antibiopelículas de extractos de la cepa en distintos solventes orgánicos y también de las proteínas secretadas.

Los resultados obtenidos mostraron que un 26,9 % de los sobrenadantes de cultivos de las cepas bacterianas antárticas estudiadas presentó un efecto antibiopelículas fuerte, siendo la cepa M₁₉B la que presentó un mayor efecto inhibitorio. Esta cepa fue identificada como *Pseudomonas fragi* de acuerdo al análisis de la secuencia del ADNr 16S.

Los compuestos presentes en el sobrenadante de la cepa y extraídos con diferentes solventes orgánicos no mostraron un efecto inhibitorio de la formación de la biopelícula del patógeno. Sin embargo, las proteínas secretadas por la cepa inhibieron la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* en un rango de concentraciones entre 0,5 y 1,5 mg ml⁻¹. Análisis con SDS-PAGE permitieron detectar la presencia de proteínas de un peso molecular entre 48 y 56 kDa en el sobrenadante de la cepa antártica.

Estos resultados permiten establecer de manera preliminar que las proteínas serían las responsables de la actividad inhibitoria de la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.

ABSTRACT

In our country, one of the main farmed salmon producing countries, the diseases caused by aquaculture pathogens cause significant economic losses due to high mortalities in the early stages of development of the main reared species: *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Oncorhynchus kisutch*.

The fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* is a Gram-negative psychrophilic bacterium whose optimal growth temperature is 15 °C, is highly proteolytic and unable to degrade carbohydrates. It is the etiologic agent of coldwater disease and the rainbow trout fry syndrome affecting salmon and trout worldwide.

Control of diseases caused by *F. psychrophilum* is performed by chemotherapy. In Chile, the main antibiotics used to treat diseases caused by the pathogen are florfenicol, oxytetracycline and oxolinic acid. However, there are reports of high resistant strain of *F. psychrophilum* to the main antibiotics used in aquaculture. Moreover, the ability of this pathogen to form biofilms is a factor that diminishes the effectiveness of antibiotic therapy since biofilm cells show much greater resistance to antibiotics than their free-living counterpart. Thus arises the need to seek new control alternatives of pathogens and Antarctica is presented as a potential biotechnological resource. Considering the diverse bioactivity of antarctic bacteria we evaluated the inhibitory effect of compounds secreted by antarctic strains on biofilm formation of *F. psychrophilum*.

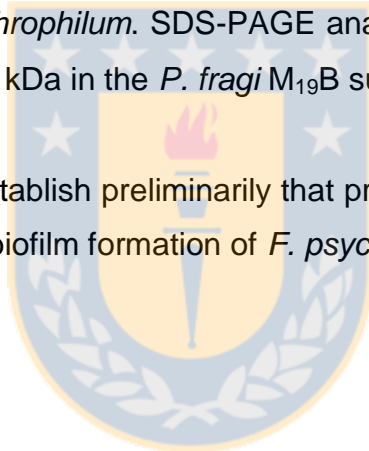
We evaluated the cell free supernatants of 67 antarctic strains isolated from different samples harvested in Fildes Peninsula, King George Island, Chilean Antarctic Territory. Quantification of biofilm formation *in vitro* was performed using crystal violet staining and selection of the supernatant of the strain that showed the higher inhibitory effect was performed by calculating the specific rate of biofilm formation, *Specific Biofilm Formation* (SBF).

The selected strain was identified by sequence analysis of the 16S rDNA gene and the effect of different compounds secreted by M₁₉B strain extracted with different organic solvents and also the antibiofilm effect of proteins secreted by this strain were evaluated.

The results showed that 26,9 % of the evaluated antarctic strains showed a strong antibiofilm effect and the highest effect was shown by M₁₉B strain. This strain was identified as *Pseudomonas fragi* based on 16S rDNA gene sequence analysis.

Compounds extracted with different organic solvents did not show any inhibitory effect on the biofilm formation of the pathogen. However, we found that only secreted proteins, at concentrations between 0.5 and 1.5 mg ml⁻¹, inhibited the biofilm formation of *F. psychrophilum*. SDS-PAGE analysis showed the presence of proteins between 48 and 56 kDa in the *P. fragi* M₁₉B supernatant

These results allow us to establish preliminarily that proteins would be responsible for the inhibitory activity of the biofilm formation of *F. psychrophilum*.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Salmonicultura en Chile

En Chile, la industria salmonera se inició a principios de la década de los '80 y desde entonces ha mostrado un gran crecimiento dentro del sector de cultivos hidrobiológicos (Buschmann *et al.*, 2009). Tal aumento es respaldado por cifras, las cuales indican que la producción de salmónes aumentó de 49.871 toneladas en 1992 a 311.000 toneladas en el año 2004 (Bushman & Fortt, 2005). Es así como la industria salmonera se ha convertido en una importante actividad económica en nuestro país, convirtiéndose junto a Noruega en uno de los principales países productores de salmónes a nivel mundial (FAO, 2013).

Dentro de los factores que han favorecido el cultivo del salmón en nuestro país se encuentran, entre otros, la calidad de las aguas y las condiciones ambientales que se dan en el sur de Chile, las cuales son favorables en comparación a otras regiones del Hemisferio Norte, donde también se realiza esta actividad productiva (Buschman & Fortt, 2005).

El gran desarrollo de la salmonicultura en Chile ha permitido que nuestro país haya desplazado al Reino Unido en 1992, situándose como el segundo productor mundial de salmónes y truchas, superado solamente por Noruega. Según cifras disponibles en 2008, la producción mundial de salmónes y truchas alcanzó 1.906 millones de toneladas, con un incremento de 7,8 % respecto al año anterior, situándose Chile como el segundo país productor, representando 34,5 % de la producción total, mientras que Noruega lideró con 44 % (Donoso, 2010), como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Producción mundial de salmón y trucha cultivado.

Miles de Ton	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Part. % 2008	Crec% Prom 2003-2008
Noruega	459	478	530	583	602	632	652	789	839	44,0	8,1
Chile	302	450	506	494	601	614	647	601	657	34,5	4,8
Reino Unido	134	147	133	162	137	130	128	139	137	7,2	1,1
Canadá	79	84	118	109	107	124	125	119	126	6,6	1,4
Australia	33	52	52	58	41	18	16	24	40	2,1	5,3
Islas Fanroe	14	13	13	14	15	18	17	18	26	1,4	13,3
Otros	91	103	86	88	83	81	76	78	81	4,2	-0,9
Total	1,112	1,327	1,438	1,508	1,586	1,617	1,661	1,768	1,906	100	
Tasa de Crecimiento %	10,1	19,3	8,4	4,9	5,2	2,0	2,7	6,4	7,8		4,8

Tomado de Donoso, 2010.

La importancia de la actividad acuícola en nuestro país, se ve reflejada por las exportaciones del Sector Pesca y Acuicultura, las cuales alcanzaron los US\$ 2.813 millones al mes de julio de 2012 según el Informe Sectorial de Pesca y Acuicultura del mes de agosto de 2012 (Sernapesca, 2012), representando un 6,2 % del total de las exportaciones nacionales. Del total consignado por el sector pesquero y acuicultor, el subsector acuícola aportó un 72,9 %, equivalente a US\$ 2.052 millones, valoración que muestra un aumento de 8,6 % respecto a lo registrado, a la misma fecha, el año 2011. En este punto, es importante mencionar que los principales recursos exportados del sector acuícola corresponden al Salmón del Atlántico y Trucha Arcoiris los que representan 29,2 % y 21,1 %, respectivamente del valor total de las exportaciones pesqueras y acuícolas y en tercer lugar se ubica el Salmón del Pacífico (Sernapesca, 2012).

Sin embargo, el crecimiento de la acuicultura y específicamente de la industria salmonera, no ha estado exento de problemas originados por las condiciones naturales en las que se realiza dicha actividad; basta simplemente con comparar las

condiciones de cultivo entre Noruega y Chile, en las que el primer país localiza sus centros de cultivo en una superficie de 1.700 km² en fiordos separados por acantilados, mientras que en Chile éstos se concentran en un radio de 300 km², lo que implica una mayor concentración geográfica y cercanía entre los centros de cultivo (Katz *et al.*, 2011). Lo anterior facilita la rápida difusión de enfermedades provocadas ya sea por virus o bacterias; como ejemplo se puede mencionar la aparición y rápida difusión del virus ISA causante de la anemia infecciosa del salmón, una enfermedad viral del Salmón del Atlántico la cual provocó que cerca del 60 % de los centros de cultivo fueran reportados como fuera de producción en 2009 (Katz *et al.*, 2011). Sumado a lo anterior, los cultivos de altas densidades de peces en los tanques provocan, por un lado, un alto grado de hacinamiento físico que conlleva a un aumento en la posibilidad de propagación de enfermedades (Cabello, 2006); y por otro, un estrés debido a la manipulación, lo que hace que su sistema inmune se deprima volviéndose más vulnerables a sufrir problemas de salud (Bushman y Fortt, 2005).

La presencia de agentes patógenos en el agua hace necesario implementar medidas de vigilancia y de control de las enfermedades provocadas por bacterias patógenas y/o patógenas oportunistas que afectan a los cultivos de salmónidos en nuestro país, considerando los importantes aportes económicos que genera la exportación de dichos productos. La Trucha Arcoíris y el Salmón del Pacífico son particularmente susceptibles a la “*enfermedad del agua fría*” y/o al “*síndrome del alevín de la trucha arcoíris*” (Nilsen *et al.*, 2011) las cuales son causadas por un microorganismo ubicado en agua dulce, *F. psychrophilum*, uno de los patógenos bacterianos que causa severos brotes de la enfermedad en la industria salmonera a nivel mundial (Nematollahi *et al.*, 2003; Álvarez & Guijarro, 2007; Högfors-Rönholm & Wiklund, 2010; Sundell & Wiklund, 2011).

1.2 *Flavobacterium psychrophilum*

1.2.1 Características generales del microorganismo

F. psychrophilum es un bacilo Gram negativo, largo y delgado cuyas dimensiones se encuentran entre 0,75 – 1 µm de ancho y 3 – 5 µm de largo (Starliper, 2010). Es un microorganismo psicrófilo, que crece entre 4 y 23 °C, siendo su temperatura óptima de crecimiento 15 °C (Holt *et al.*, 1993). Este microorganismo presenta movilidad deslizante, característica común de los miembros del grupo *Cytophaga – Flavobacterium*. Las bacterias que utilizan este tipo de movilidad requieren estar en contacto con una superficie para deslizarse y la velocidad de desplazamiento que pueden alcanzar es de 2 - 4 µm/seg en superficies de vidrio y, ocasionalmente, pueden invertir su movimiento (McBride, 2001).

En cuanto a las características bioquímicas, *F. psychrophilum* produce enzimas que degradan colágeno, fibrinógeno, caseína, gelatina, elastina y extractos musculares de peces (Nematollahi *et al.*, 2003; Secades *et al.*, 2003). Sin embargo, es incapaz de degradar carbohidratos simples o complejos, por lo que aminoácidos y oligopéptidos obtenidos de la degradación de las proteínas de su hospedador se transforman en su principal fuente de carbono, nitrógeno y energía (Nematollahi *et al.*, 2003). Es un microorganismo catalasa y oxidasa débilmente positivo, no produce indol ni ácido sulfhídrico y es incapaz de descarboxilar la ornitina y/o lisina (Nematollahi *et al.*, 2003). Además, es un microorganismo considerado “fastidioso” por los autores debido a la dificultad para su aislamiento y cultivo (Álvarez & Guijarro, 2007).

F. psychrophilum es un importante patógeno de agua dulce y el agente etiológico de la “enfermedad bacteriana del agua fría” y/o del “síndrome del alevín de la trucha arcoíris”.

1.2.2. Enfermedad bacteriana del agua fría.

La enfermedad bacteriana del agua fría corresponde a las manifestaciones clínicas de la enfermedad provocada por *F. psychrophilum* en peces adultos, mientras que el síndrome del alevín de la trucha arcoiris corresponde a las manifestaciones clínicas que sufren los peces en sus primeras etapas de vida (Duchaud *et al.*, 2007; Starliper, 2010).

La enfermedad del agua fría ocurre cuando la temperatura del agua se encuentra por debajo de los 16 °C, pero es más prevalente y seria cuando la temperatura del agua es inferior a los 10 °C. Esta enfermedad presenta distintas manifestaciones clínicas, siendo clásica la presencia de lesiones necróticas particularmente en el pedúnculo caudal o en la aleta caudal, como se observa en la Figura 1 (Barnes & Brown, 2011; Starliper, 2010). Dentro de los signos clínicos de la enfermedad se encuentran ulceraciones cutáneas en la mandíbula, branquias pálidas o necróticas, hiperplasia epidérmica, incremento en la producción de mucus, aumento de la pigmentación de la piel (ennegrecimiento local de la piel), exoftalmia, escleritis, ceguera y dentro de los signos clínicos que afectan a los órganos internos se encuentran esplenomegalia, palidez del hígado y riñón, anemia, agrandamiento del bazo, inflamación intestinal y acumulación del líquido ascítico en el peritoneo. También se ha reportado letargia, inapetencia y natación errática (Nematollahi *et al.*, 2003; Barnes & Brown, 2011).



Figura 1. Lesión ulcerativa profunda del pedúnculo caudal provocado por *F. psychrophilum* en una trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tomado de Duchaud *et al.*, 2007.

La tasa de mortalidad provocada por la enfermedad depende del tamaño del pez afectado, siendo más alta cuando la enfermedad afecta a los peces durante los primeros estados de desarrollo (Nematollahi *et al.*, 2003). En Noruega, se ha reportado la tasa más alta de mortalidad, siendo de 90 % en alevines de truchas arcoíris (Nilsen *et al.*, 2011); sin embargo, generalmente, ésta se encuentra entre 10 % y 30 %, pero en ciertos casos se ha reportado hasta 70 % de mortalidad en alevines de truchas arcoíris (Ström-Bestor & Wiklund, 2011). Tasas más bajas se han reportado en peces adultos, siendo las pérdidas menores al 20 % (Nematollahi *et al.*, 2003).

1.2.3. Patogénesis.

El genoma completo de una cepa virulenta de *F. psychrophilum* fue secuenciado por Duchaud *et al.* (2007) lo que ha permitido el conocimiento y mayor comprensión de las estrategias utilizadas por el patógeno para colonizar y degradar el tejido del hospedador.

F. psychrophilum es altamente proteolítico (Nematollahi *et al.*, 2003) y su virulencia se ha relacionado con la secreción de proteasas capaces de degradar colágeno y fibrinógeno (Secades *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2004; Duchaud *et al.*, 2007). En el genoma de *F. psychrophilum* se detectó la presencia de 13 genes que codificarían proteasas de secreción, las cuales podrían estar involucradas en la virulencia y en la destrucción del tejido del hospedador (Duchaud *et al.*, 2007). De ellas, las metaloproteasas Fpp1 y Fpp2 han sido las más estudiadas. Ambas enzimas son activadas con iones calcio y estroncio, su estabilidad térmica es aumentada por iones calcio y las dos proteasas presentan similares sustratos: proteínas de la matriz extracelular y proteínas musculares (Secades *et al.*, 2001; Secades *et al.*, 2006). Sin embargo, al evaluar los efectos de mutantes de ambas enzimas en la virulencia del patógeno se determinó que la disrupción de ambos genes no tenía efectos significativos en ésta (Pérez-Pascual *et al.*, 2011). Además, la secuenciación del genoma del patógeno permitió determinar la presencia de un gen que codifica una colagenasa extracelular que se encuentra interrumpida por una secuencia de inserción, además de la presencia de un gen que codifica una proteína que posee 53 % de similitud a la hemolisina VAH5 de *Vibrio anguillarum* (Duchaud *et al.*, 2007). Una característica importante de las bacterias patógenas es su capacidad de obtener hierro desde las células del hospedador y *F. psychrophilum* ha presentado una actividad altamente hemolítica sobre los eritrocitos de la trucha arcoíris (Högfors-Rönholm & Tom Wiklund, 2010).

Por otro lado, la adherencia del patógeno al tejido de las agallas de los peces puede ser un paso clave en las infecciones causadas por *F. psychrophilum*, ya que es un prerrequisito para la colonización y se ha encontrado que las cepas altamente virulentas de *F. psychrophilum* se adhieren más fácilmente al tejido de las branquias del hospedador que aquellas cepas menos virulentas (Nematollahi *et al.*, 2003). En el genoma del patógeno, se identificaron 27 genes probablemente involucrados en la adherencia, 15 de los cuales codificarían proteínas con repeticiones ricas en leucina, similares a las proteínas BspA y LrrA de *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola* (Duchaud *et al.*, 2007), las cuales están relacionadas con la adherencia a los tejidos orales (Sharma *et al.*, 1998; Ikegami *et al.*, 2004).

La información proporcionada por muchas investigaciones y la secuenciación del genoma del microorganismo ha permitido sugerir la secuencia de eventos que desencadenan la enfermedad, la cual comienza con la entrada del microorganismo al hospedador. En este punto, el patógeno ingresa al hospedador a través de lesiones presentes en la piel de los peces (Madetoja *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2004; Miwa & Nakayasu, 2005; Barnes & Brown, 2011). Una vez que el patógeno ingresa a su hospedador, secreta proteasas, las cuales permiten degradar las proteínas constituyentes del tejido conectivo y muscular, además de producir perforaciones en los radios de la aleta caudal producto de la secreción de compuestos por parte de la bacteria para obtener el calcio y así activar las metaloproteasas dependiente de calcio, lo que explicaría la afinidad del patógeno por los radios de la aleta caudal del pez durante los estadios iniciales de desarrollo de la infección (Martínez *et al.*, 2004, Barnes & Brown, 2011). Una vez que el patógeno se encuentra en la epidermis, se dispersa a través del tejido conectivo del pez, ya que presenta una alta afinidad por el colágeno (Miwa & Nakayasu, 2005; Barnes & Brown, 2011) y, posteriormente, se expande hacia la musculatura (Barnes & Brown, 2011). Finalmente, aparecen las típicas lesiones ulcerativas en la superficie externa del pez que caracterizan a la enfermedad bacteriana del agua fría (Nematollahi *et al.*, 2003; Starliper, 2010;

Barnes & Brown, 2011) con las subsecuentes lesiones en los órganos internos (Barnes & Brown, 2011).

En cuanto a la transmisión, *F. psychrophilum* puede ser transmitido tanto horizontal como verticalmente (Starliper, 2010; Barnes & Brown, 2011), siendo en el primer caso la columna de agua el reservorio de las células viables. En cuanto a la transmisión vertical, ésta es respaldada por trabajos en los que se ha recuperado dicha bacteria desde el fluido ovárico, del interior de óvulos y de la superficie de los mismos (Starliper, 2010). Además, Brown *et al.* (1997) demostraron que *F. psychrophilum* podía ser recuperado desde el interior de ovas fertilizadas y de ovas con ojo.

Actualmente, el control de las enfermedades causadas por *F. psychrophilum* se lleva a cabo mediante el uso de antibióticos, siendo oxitetraciclina el agente terapéutico más usado durante los brotes de la enfermedad bacteriana del agua fría (Nilsen *et al.*, 2011; Henríquez-Núñez *et al.*, 2012). En Chile, la salmonicultura se ha expandido rápidamente en los últimos 30 años, crecimiento que ha estado acompañado de un uso indiscriminado de antibióticos. El abuso en su uso permite que éstos se mantengan en el medio ambiente acuático, ejerciendo presión selectiva por largos períodos, lo que resulta en la aparición de bacterias resistentes a los mismos (Cabello, 2006). En Chile, la resistencia a antibióticos de cepas de *F. psychrophilum* ya ha sido reportada (Henríquez-Núñez *et al.*, 2012), lo cual disminuye la efectividad de los antibióticos usados para el tratamiento de la enfermedad.

1.3 Resistencia a antibióticos

En Chile, las enfermedades que afectan a la salmonicultura son controladas, principalmente, con el uso de antibióticos como ácido oxolínico, flumequina, oxitetraciclina, eritromicina, florfenicol, amoxicilina y sulfadoxina-trimetoprim (Bravo *et al.*, 2005).

En nuestro país, el tratamiento de las lesiones externas de los peces afectados por *F. psychrophilum* se lleva a cabo mediante baños de inmersión con oxitetraciclina, entre 100 y 125 ppm durante una hora en un flujo cerrado por tres días y el tratamiento de las infecciones internas se realiza vía administración oral de florfenicol, en dosis de 20 mg/kg durante 15 días (Henríquez-Núñez *et al.*, 2012). Además, desde el año 2006, muchas industrias salmoneras en Chile han reemplazado estos antibióticos por ácido oxolínico, desconociéndose la efectividad de este medicamento en el tratamiento de las enfermedades causadas por *F. psychrophilum* (Henríquez-Núñez *et al.*, 2012).

El problema en el uso de los antibióticos en acuicultura es que éstos son usados no sólo para el control de los brotes de las enfermedades, sino también como medida profiláctica, para lo cual son incorporados en la alimentación de los peces, pudiendo permanecer en el ambiente durante largos periodos (Cabello, 2004; Cabello, 2006).

Desde el descubrimiento y uso de los antibióticos, se han identificado bacterias resistentes que emplean diferentes mecanismos de resistencia (Tenover, 2006) y, como consecuencia del excesivo uso de los mismos, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia aún más complejos, apareciendo bacterias multirresistentes a los antibióticos (Levy & Marshall, 2004; Tenover, 2006).

El mecanismo de resistencia bacteriana puede ser intrínseco o adquirido. En el primer caso, la resistencia es una propiedad genética constitutiva que está codificada en el ADN cromosomal y que es compartida por todos los miembros del género

bacteriano (McManus, 1997). Según Tenover (2006), una bacteria puede ser intrínsecamente resistente a una o más clases de antibióticos. En cuanto a la resistencia adquirida, ésta puede aparecer por mutaciones o por la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal de genes (Tenover, 2006; Bennett, 2008), la cual confiere nuevas funciones a través de la adquisición de plásmidos, transposones e islas de patogenicidad (Coyne *et al.*, 2010). Últimamente, se ha sugerido la participación de bacteriófagos como vehículos de movilización de genes de resistencia contribuyendo éstos a la mantención y emergencia de nuevas cepas resistentes (Colomer-Lluch *et al.*, 2011a; Colomer-Lluch *et al.*, 2011b).

La adquisición de genes de resistencia le puede permitir a la bacteria sintetizar enzimas que provocan la destrucción del antibiótico, como ocurre en el caso de las betalactamasas que destruyen a las penicilinas (van Hoek *et al.*, 2011); expresar bombas de eflujo que eliminan el antibiótico de la célula, impidiendo que éste alcance su sitio activo y efectúe su acción (Magnet *et al.*, 2001; Wright 2005); modificar el sitio blanco del antibiótico (Lambert, 2005); y, producir una vía metabólica alternativa a aquella inhibida por el antibiótico (Levy & Marshall, 2004; Tenover, 2006).

En nuestro país, la resistencia a los antibióticos usados en acuicultura se ha convertido en un tema de interés. Es así como en un estudio realizado por Buschmann *et al.* (2012) se determinó la presencia de bacterias resistentes a tetraciclina, ácido oxolínico y florfenicol en sedimentos acuícolas ubicados a más de 8 km de los centros de cultivo, encontrándose un mayor número de cepas resistentes en el ambiente donde se realizan las actividades acuícolas. En este punto, el patógeno de peces, *F. psychrophilum*, no ha estado exento de presentar resistencia a los principales antibióticos usados en acuicultura. Henríquez-Núñez *et al.* (2012) evaluaron la susceptibilidad de 40 aislados chilenos de *F. psychrophilum* a los antibióticos oxitetraciclina, florfenicol y ácido oxolínico y se determinó que el porcentaje de resistencia a los mismos fue de 90 %, 92,5 % y 85 %, respectivamente.

respectivamente, lo que indica una elevada resistencia del patógeno a los principales antibióticos usados para su control.

Otro factor que influye en la resistencia bacteriana a la acción de los antibióticos es la formación de biopelículas (Mah & O'Toole, 2001; Davies, 2003; Høiby *et al.*, 2010). En ambientes acuáticos, las bacterias se encuentran predominantemente formando estas estructuras (Sundell & Wiklund, 2011). En acuicultura, las biopelículas son ubicuas y se forman en las paredes de las tuberías de suministro de agua, tanques de cultivo, incubadoras, sistemas de biofiltración, materia en suspensión, así como también en la superficie de los peces (King *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2013). A la fecha, se ha determinado que *F. psychrophilum* forma biopelículas *in vitro*, en vidrio y en pocillos de microplacas de poliestireno (Álvarez *et al.*, 2006; Sundell & Wiklund, 2011) y que las células de este microorganismo que se encuentran dentro de la biopelícula, presentan una mayor resistencia a los principales antibióticos usados en acuicultura (Sundell & Wiklund, 2011). La capacidad de formar biopelículas puede explicar el prolongado tiempo de sobrevivencia de *F. psychrophilum* fuera del hospedador (Duchaud *et al.*, 2007) el cual puede sobrevivir en ambientes acuáticos durante meses e incluso años fuera de su hospedero (Vatsos *et al.*, 2003).

Por lo mencionado anteriormente la efectividad de la terapia antimicrobiana en el control de las enfermedades causadas por este microorganismo se ve amenazada, tanto por la elevada resistencia que presenta *F. psychrophilum* a los antibióticos usados en acuicultura, como por su capacidad para formar biopelículas.

1.4 Biopelículas

1.4.1 Características generales

Una biopelícula se define como una comunidad de microorganismos sésiles cuyas células se encuentran adheridas a una superficie en la interfase líquido/sólido y embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares producida por las mismas células, las cuales exhiben un fenotipo alterado en relación a la tasa de crecimiento y a la transcripción genética con respecto a las células planctónicas (Donlan & Costerton, 2002).

La formación de biopelículas es una importante estrategia utilizada por los microorganismos para la supervivencia en ambientes naturales (Anwar *et al.*, 1992) y su formación es un proceso que comienza con la adhesión de las bacterias planctónicas a una superficie inerte o viva (Sundell & Wiklund, 2011). Luego de la adhesión bacteriana a una superficie, por efecto de fuerzas físicas como fuerzas de atracción de van der Waals, interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, las bacterias comienzan a dividirse y se comunican entre ellas mediante la liberación de moléculas señales que inducen la secreción de sustancias poliméricas extracelulares para así formar unas estructuras llamadas microcolonias (Sundell & Wiklund, 2011). Éstas, luego de un proceso de maduración, se diferenciarán en una biopelícula madura, la cual servirá como base para el anclaje de otros microorganismos aumentando así la biodiversidad de la comunidad. Desde esta biopelícula las bacterias pueden dispersarse para colonizar nuevos hábitats (Costerton *et al.*, 1999), como se observa en la Figura 2.

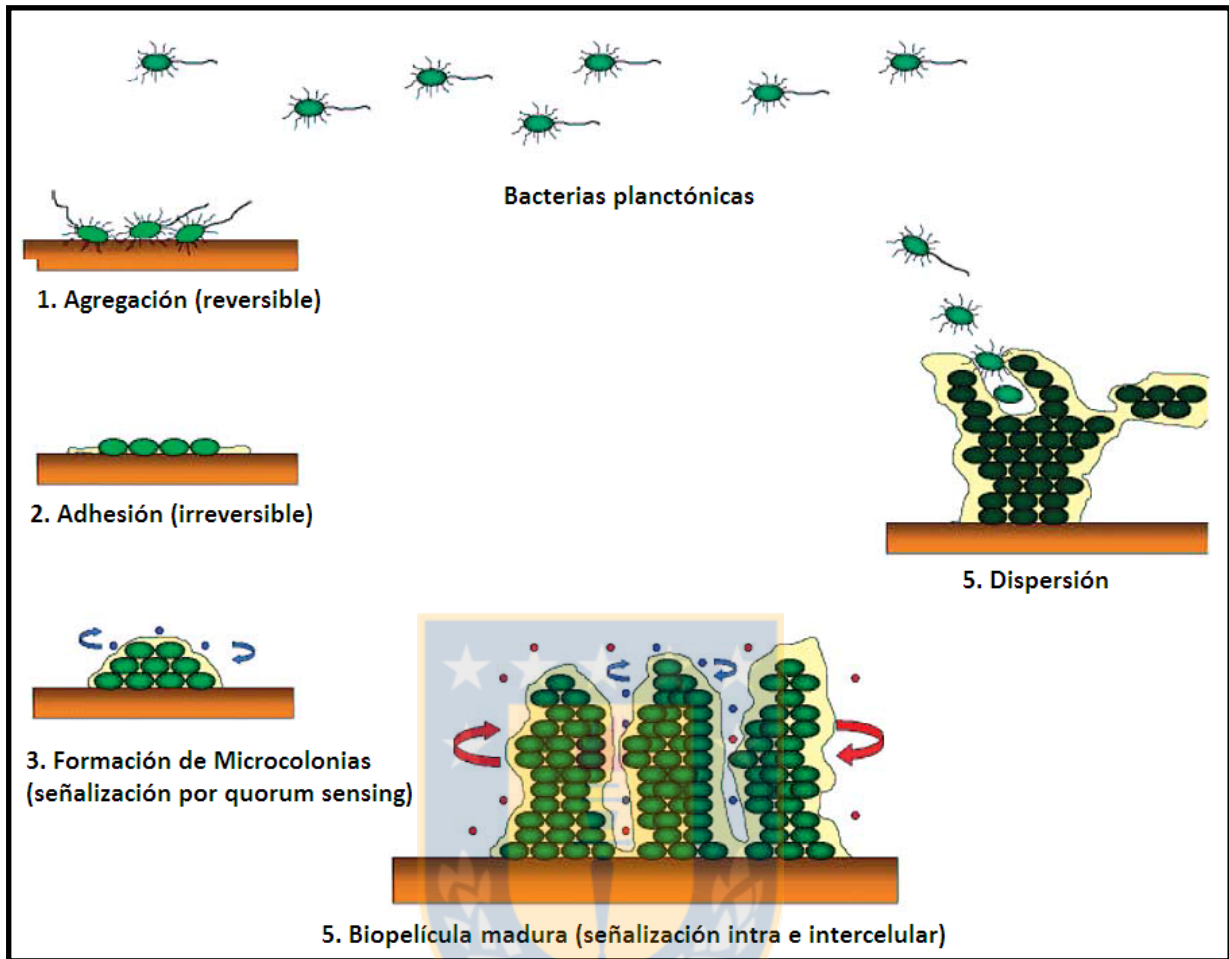


Figura 2. Etapas del ciclo de desarrollo de una biopelícula. Los distintos tonos de verde representan diferentes niveles de expresión transcripcional y traduccional entre los estados planctónicos y las diferentes etapas de desarrollo de una biopelícula bacteriana. Tomado de Behlau *et al.*, 2008.

Una biopelícula es una estrategia de supervivencia, ya que esta estructura protege a las células de compuestos tóxicos, agentes microbicidas, estrés térmico y de la depredación (Huq *et al.*, 2008). Además, una vez formada, las células aumentan el intercambio genético, resisten la radiación ultravioleta y son altamente resistentes al tratamiento con antimicrobianos (O'Toole *et al.*, 2000).

Dentro de los factores sugeridos que permiten explicar la elevada resistencia de una biopelícula al tratamiento con antimicrobianos se encuentran: la baja actividad metabólica de las células de la biopelícula, lo que explicaría la resistencia a aquellos antibióticos que son activos frente a bacterias en crecimiento; reducida penetración del antibiótico en la biopelícula debido a que el exopolisacárido de la matriz podría actuar como un adsorbente o reactante reduciendo la cantidad de agente disponible para interactuar con las células de la biopelícula (Davies, 2003). Finalmente, las células que forman estas estructuras son fisiológicamente diferentes a las células planctónicas, las cuales pueden expresar bombas de eflujo que les permiten eliminar y, por ende, resistir la acción de los agentes antibacterianos (Davies, 2003).

Los primeros antecedentes de la formación de biopelículas de *F. psychrophilum* fueron entregados por Álvarez *et al.* (2006), quienes aislaron una cepa mutante del gen *tlpB*, que codifica una tiol disulfuro oxidoreductasa, la cual fue deficiente en su virulencia pero exhibió una mayor capacidad para formar biopelículas. La secuenciación completa del genoma de *F. psychrophilum* cepa JIP02/86, realizada por Duchaud *et al.* (2007), respalda los resultados anteriores ya que en su genoma se encontró la presencia de muchos determinantes genéticos para la biosíntesis, exportación, modificación y polimerización de exopolisacáridos, principales componentes de la matriz extracelular de la biopelícula (Branda *et al.*, 2005).

La información proporcionada por las investigaciones anteriores permitieron a Sundell & Wiklund (2011) evaluar la resistencia que la biopelícula de *F. psychrophilum* presenta a dos de los principales antibióticos usados en acuicultura: oxitetraciclina y flumequina. Estos autores determinaron que a altas concentraciones celulares del patógeno (10^8 UFC/ml) y luego de 5 días de exposición a oxitetraciclina, este antibiótico no tuvo un efecto claro en el crecimiento y en la sobrevivencia de las células de la biopelícula con respecto al control. Similares resultados fueron obtenidos luego de la exposición de las células a

flumequina, ya que luego de 5 días de exposición a la concentración mínima inhibitoria del antibiótico, ésta afectó débilmente a las células de la biopelícula, disminuyendo de 5×10^6 UFC/ml, correspondientes al control, a $1,3 \times 10^6$ UFC/ml correspondientes al tratamiento, por lo que las células que forman parte de esta estructura no fueron significativamente afectadas por ambos antibióticos.

Las células que se encuentran asociadas a una biopelícula presentan una mayor resistencia al tratamiento con antibióticos que las células de la fase planctónica, producto del desarrollo de fenotipos de resistencia luego de la adhesión de las células a una superficie (Meyer, 2003). Es por lo anterior, que se han llevado a cabo investigaciones conducentes a desarrollar estrategias de prevención de la formación de biopelículas así como también de eliminación de las biopelículas ya formadas (Valle *et al.*, 2006; Kristensen, 2008; Davies & Marques, 2009; Cady *et al.*, 2012). En este punto y en la búsqueda de impedir que *F. psychrophilum* desarrolle una biopelícula, De la Fuente *et al.* (2013) inhibieron su formación mediante el desarrollo de una biopelícula antagónica formada por *Pseudomonas fluorescens* FF48 aislada desde una piscicultura. La importancia de impedir la formación de una biopelícula, ya sea de *F. psychrophilum* o de otro patógeno, radica en los problemas asociados a su formación producto de la dificultad para su erradicación, así como de la disminución de la efectividad de la terapia antimicrobiana sobre estas estructuras.

1.4.2 Mecanismos de control de las biopelículas

Los problemas asociados a la formación de biopelículas se relacionan por un lado, con la persistencia de los microorganismos en el ambiente en que las forman provocando una exposición recurrente a posibles agentes patógenos (King *et al.*, 2008) y por otro, con la elevada resistencia de una biopelícula al tratamiento con antimicrobianos (Mah & O'Toole, 2001; Davies, 2003; Jefferson, 2004).

Las estrategias enfocadas a controlar las biopelículas se pueden clasificar en dos tipos: aquellas cuyo blanco directo es la superficie, estrategias que tienen como objetivo el desarrollo de superficies antiadherentes para reducir al mínimo la adhesión inicial de los microorganismos, y aquellas cuyo blanco directo es el microorganismo, las cuales tienen como objetivo la búsqueda de moléculas capaces de afectar distintas etapas en la formación de las mismas (Kristensen *et al.*, 2008).

El control de las biopelículas utilizando como estrategia el desarrollo de superficies que previenen la adhesión inicial de los microorganismos se ha llevado a cabo mediante la construcción de materiales a los que se ha incorporado, por ejemplo, iones de plata o antibióticos, los cuales son liberados de manera gradual; materiales en los que sus propiedades intrínsecas como la hidrofobicidad de su superficie han sido alteradas; y, también, mediante el uso de superficies antiadhesivas, como por ejemplo, superficies cubiertas con moléculas como heparina que perturban las fuerzas físico-químicas necesarias para la adhesión inicial (Lindsay & von Holy, 2006).

Dentro de las estrategias de control de biopelículas cuyo blanco directo es el microorganismo, se incluye: la prevención de la adherencia inicial de la bacteria, ya sea a una superficie o a otra bacteria, mediante la inhibición de la síntesis de fimbria o pili; la interrupción de los mecanismos de *quórum sensing* que son requeridos para la expresión de genes necesarios para la producción de la biopelícula; la inhibición de la biosíntesis de los polisacáridos y componentes proteicos de la matriz extracelular; y, la búsqueda de enzimas que puedan degradar la matriz de la biopelícula para permitir el acceso de los antibióticos convencionales y de los mecanismos de defensa del hospedador (Cegelski *et al.*, 2008).

En este último enfoque, se ha propuesto el uso de enzimas para evitar la formación y/o el crecimiento de microorganismos en una biopelícula, ya sea impidiendo la adhesión bacteriana a la superficie, degradando la matriz extracelular o interfiriendo en la comunicación celular (Kristensen *et al.*, 2008). A la fecha existen

investigaciones realizadas con enzimas comerciales que han tenido efecto en impedir la adhesión de un microorganismo a una superficie. En este punto Leroy *et al.* (2008) indicaron que una proteasa (savinasa) fue la enzima más efectiva en inhibir la adhesión de una cepa de *Pseudoalteromonas* sp. formadora de biopelículas a los pocillos de microplacas de poliestireno. En otro estudio, se demostró que una arginina deiminasa producida por *Streptococcus intermedius* inhibió completamente el desarrollo de la biopelícula de *Porphyromonas gingivalis* al provocar la represión de la expresión de los genes *fimA* y *fma1*, que codifican las principales proteínas componentes de las fimbrias de *P. gingivalis* las que jugarían un rol importante en el desarrollo de la biopelícula del patógeno (Christopher *et al.*, 2010).

Debido a los problemas asociados a la formación de biopelículas, y con los antecedentes que existen a la fecha de que *F. psychrophilum* tiene la capacidad para formarlas, se hace necesario la búsqueda de alternativas de biocontrol más amigables con el medio ambiente. En este punto, surge la Antártica como una fuente de recursos inexplorada, la cual ofrece una gran diversidad microbiana cuyos microorganismos pueden sintetizar una amplia gama de compuestos bioactivos de importancia biotecnológica (Tindall, 2004; Gesheva & Vasileva-Tonkova, 2012). Las condiciones extremas que se dan en regiones polares, como la Antártica, favorecen la competencia entre microorganismos, la cual puede ocurrir de forma pasiva a través de adaptaciones de los microorganismos a las condiciones ambientales y de forma activa mediante la producción de compuestos antimicrobianos (Wong *et al.*, 2011; Bell *et al.*, 2013), los cuales pueden ser utilizados para el control de microorganismos patógenos (O'Brien *et al.*, 2004; Lo Giudice *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2011).

1.5 Bacterias antárticas

La Antártica es un continente rocoso cubierto casi completamente por una capa de hielo, con regiones de suelos fríos y desérticos y con temperaturas que rara vez sobrepasan los 0 °C (O'Brien *et al.*, 2004). Este continente presenta condiciones ambientales adversas, tales como: frío extremo, amplias fluctuaciones de temperatura, escasas fuentes de carbono y nitrógeno, bajos índices de humedad y escasa radiación solar, por lo que sus ecosistemas son de baja productividad debido a la situación oligotrófica a la que están sometidos (Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011). Las formas de vida en la Antártica deben adaptarse a vivir en condiciones extremas y son los procariontes quienes han colonizado este ambiente; se han encontrado en todos los hábitats de dicho continente, tales como: lagos, lagunas, ríos, arroyos, rocas y suelos y son quienes juegan un rol principal en las cadenas tróficas, en los ciclos biogeoquímicos y en la mineralización de los contaminantes (Gesheva & Vasileva-Tonkova, 2012). Los microorganismos que habitan este ambiente han debido hacer frente a los efectos deletéreos que provocan las bajas temperaturas en las células, los cuales afectan, principalmente, a la membrana plasmática y a las enzimas, las que tienden a rigidizarse cuando las temperaturas disminuyen (D'Amico *et al.*, 2006).

Muchas de las investigaciones realizadas con bacterias antárticas se han enfocado en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos y de enzimas de importancia comercial (O'Brien *et al.*, 2004; Lo Giudice *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011) justificándose estos estudios, en el caso de la búsqueda de compuestos antibacterianos, en que los microorganismos antárticos han desarrollado estrategias peculiares de sobrevivencia en este ambiente extremo, las cuales les otorgan ventajas competitivas, siendo una de ellas la secreción de compuestos antimicrobianos para reducir la competencia interespecífica (O'Brien *et al.*, 2004). En cuanto a la búsqueda de enzimas de importancia comercial, los estudios se sustentan en que las bacterias antárticas llevan a cabo todos sus

procesos metabólicos a temperaturas cercanas a 0 °C, a diferencia de los microorganismos mesófilos, los cuales son incapaces de realizar sus actividades a esas temperaturas, por lo que las enzimas de microorganismos psicrófilos presentan un aumento en la flexibilidad de su estructura, la cual puede darse en la proteína completa o estar restringida a partes de su estructura, especialmente a aquellas implicadas en la catálisis (D'Amico *et al.*, 2006), lo que les permite reducir la energía de activación resultando así en una alta eficiencia catalítica y una baja temperatura óptima (Vázquez *et al.*, 2004).

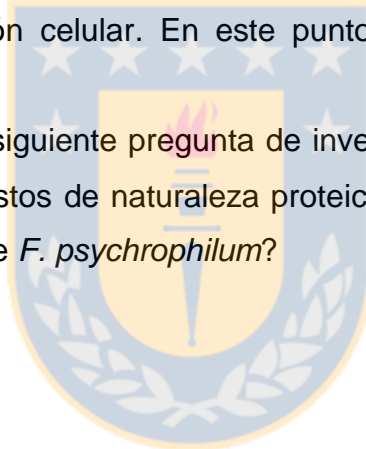
Los compuestos antibacterianos producidos por cepas antárticas han permitido inhibir el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos como *Listeria innocua*, *Pseudomonas fragi* y *Brochothrix thermosphacta* (O'Brien *et al.*, 2004) así como también, el crecimiento de microorganismos terrestres y/o patógenos para el hombre como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, entre otros (Lo Giudice *et al.*, 2007). Kan *et al.* (2012) detectaron que bacterias antárticas secretaron compuestos antibacterianos de naturaleza proteica sobre el patógeno de peces *Vibrio anguillarum*.

El efecto de compuestos producidos por bacterias antárticas en la inhibición de la formación de biopelículas o en la erradicación de una biopelícula ya formada no ha sido ampliamente estudiado. A la fecha, sólo hay un reporte de una cepa antártica identificada como *Pseudoalteromonas haloplanktis*, productora de compuestos inhibidores de la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* (Papa *et al.*, 2013). Los resultados de estas investigaciones revelan el potencial uso de cepas antárticas para aplicaciones de control biológico como fuente de compuestos con actividad antimicrobiana y también sobre las biopelículas de distintos patógenos, ya sea de importancia económica o clínica.

1.6 Conclusiones de la revisión bibliográfica

Al concluir la revisión bibliográfica se pone de manifiesto la necesidad de buscar medidas que permitan controlar y disminuir el efecto de la presencia de *F. psychrophilum* en las instalaciones acuícolas durante la fase de agua dulce del cultivo de salmones y truchas. Esto, debido a las grandes pérdidas económicas que provocan en la industria salmonera las enfermedades causadas por este patógeno. Una medida de control es evitar que dicho microorganismo forme biopelículas. Dentro de los compuestos descritos que han presentado un efecto antibiopelícula se proponen compuestos de naturaleza proteica como enzimas, ya que éstas pueden impedir la adhesión de la bacteria a la superficie, degradar la matriz extracelular o interferir en la comunicación celular. En este punto surge la Antártica como una nueva fuente de recursos.

Es así como se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Bacterias de origen antártico producen compuestos de naturaleza proteica con actividad inhibitoria en la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*?



HIPÓTESIS DE TRABAJO

Cepas de bacterias quimiorganotróficas de origen antártico producen compuestos extracelulares de naturaleza proteica que inhiben la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto inhibitorio de compuestos extracelulares producidos por cepas bacterianas antárticas en la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Seleccionar una cepa bacteriana antártica con actividad inhibitoria en la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.
2. Determinar el efecto inhibitorio de compuestos proteicos secretados por la cepa bacteriana seleccionada en la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas y condiciones de cultivo

Las 67 cepas antárticas usadas en este estudio fueron aisladas de distintas muestras (superficie de rocas, columna de agua, sedimento y rizósfera de musgos) recolectadas en la península Fildes, isla Rey Jorge (62° 12' S – 58° 57' O), Territorio Antártico Chileno, durante el mes de enero de 2010. Las cepas fueron mantenidas a -80 °C en caldo Tripticasa de Soya (TSB) diluido al 50 % y suplementado con glicerol al 20 % (O'Brien *et al.*, 2004).

El patógeno, *F. psychrophilum* cepa 19749 (Código de la Compañía), fue adquirido en *Aquagestion Chile Company* y aislado de un salmón moribundo que presentaba los signos clínicos típicos de la enfermedad de agua fría como úlceras en la piel y lesiones en la aleta caudal. La cepa fue mantenida a -80 °C en caldo Triptona Extracto de Levaduras y Sales (TYES) compuesto por MgSO_4 (0,5 g L⁻¹), CaCl_2 (0,5 g L⁻¹), triptona (4 g L⁻¹) y extracto de levadura (0,4 g L⁻¹) (Cain & LaFrentz, 2007) y suplementado con glicerol al 12 %.

Todos los cultivos bacterianos, tanto de las cepas antárticas como del patógeno, fueron realizados en caldo TYES a pH 7,2 y en agitación (120 rpm) por 48 h a 15 °C. La cuantificación celular de *F. psychrophilum* se realizó mediante recuento en placas de agar TYES incubadas a 15 °C durante 5 días.

2.2 Obtención de sobrenadantes libres de células

Las cepas antárticas fueron cultivadas en agar TYES por 72 h a 15 °C. Colonias aisladas fueron transferidas a tubos de ensayo que contenían 5 ml de agua estéril y las suspensiones bacterianas fueron ajustadas a una densidad óptica de 0,5 (DO_{600}). 240 μ l de estos tubos fueron transferidos a tubos Falcon que contenían 4,8 ml de medio TYES. Los tubos fueron incubados a 15 °C durante 48 h a 120 rpm de agitación. Posteriormente, los cultivos bacterianos fueron centrifugados (15 min, 5.500 rpm, 4 °C) y el sobrenadante filtrado a través de filtros de acetato de celulosa de 0,20 μ m de diámetro de poro. Los sobrenadantes libres de células fueron usados inmediatamente en los ensayos de inhibición de la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.

2.3 Detección de la actividad inhibitoria de la formación de biopelículas

Para detectar el efecto de los sobrenadantes de cultivos de las cepas antárticas en la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*, la cuantificación *in vitro* de ésta se realizó mediante el método de tinción con cristal violeta descrito por Christensen *et al.* (1985) con modificaciones. Para ello, el cultivo de 48 h de *F. psychrophilum* fue ajustado ($DO_{540} = 0,8$), correspondiendo a 10^9 UFC ml^{-1} . A continuación, fue diluido (10^{-1}) en medio TYES y 15 μ l de la dilución fueron agregados por triplicado a los pocillos de las microplacas de poliestireno de 96 pocillos (CytoOne, USA) que contenían 60 μ l de medio TYES diluido al 20 %. Posteriormente, se agregó 75 μ l del sobrenadante de las cepas antárticas. Pocillos conteniendo solamente medio de cultivo fueron usados como control abiótico, mientras que pocillos conteniendo medio TYES diluido al 20 % e inóculo de *F. psychrophilum* fueron usados como control de formación de biopelículas. La microplaca fue incubada a 15 °C con agitación a 120 rpm durante 4 días. Luego del tiempo de incubación, la fase planctónica fue retirada y traspasada a otra microplaca para su posterior lectura a 540 nm en un lector de

microplacas (Bio-Tek, USA). Los pocillos con las células remanentes fueron lavados con 300 µl de agua destilada estéril tres veces y las células adheridas fueron fijadas con 250 µl de metanol y luego de 15 min las microplacas fueron vaciadas y secadas al aire durante 45 min (Stepanović *et al.*, 2004). Luego, 200 µl de una solución de cristal violeta al 1 % (p/v) fueron agregados a cada pocillo. Después de 20 min de agitación, el exceso de cristal violeta fue removido, los pocillos fueron lavados tres veces con 300 µl de agua destilada estéril y 250 µl de etanol al 70 % (v/v) fueron agregados a los pocillos, para solubilizar el cristal violeta adherido a la microplaca. La biopelícula fue cuantificada midiendo la absorbancia del cristal violeta a 595 nm (Álvarez *et al.*, 2006).

Para seleccionar el sobrenadante de la cepa que presentó los mejores resultados, se realizó el cálculo específico de la formación de biopelículas, *Specific Biofilm Formation* (SBF) (Niu & Gilbert, 2004; Naves *et al.*, 2008); el cual fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$SBF = (AB - CW)/G$$

De acuerdo a ésta, AB corresponde a la DO_{595nm} de las bacterias adheridas y teñidas con cristal violeta, CW corresponde a la DO_{595nm} de los pocillos teñidos que contenían solamente medio de cultivo sin bacterias y G que es la DO_{540nm} de la fase planctónica, a la cual se le restó el promedio de la DO_{540nm} de los pocillos que contenían solamente medio de cultivo.

El criterio establecido por Naves *et al.* (2008) indica que las células son fuertes productoras de biopelículas si $SBF > 1$ y débiles si $SBF \leq 1$. Este criterio se utilizó para establecer el efecto de las cepas antárticas en la formación de biopelículas, siendo su efecto fuertemente inhibitor si $SBF \leq 1$ y débilmente inhibitor y/o sin efecto si $SBF > 1$. Entre los sobrenadantes cuyo efecto fue fuertemente inhibitor se seleccionó el sobrenadante de la cepa que presentó el valor del SBF más bajo.

Finalmente, se consideró un efecto bactericida del sobrenadante si éste impidió el crecimiento planctónico del patógeno.

2.4 Identificación molecular de la cepa bacteriana inhibidora de biopelícula

El ADN genómico de la cepa antártica seleccionada fue extraído usando el kit de extracción de ADN ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor, y empleado como templado para la amplificación por PCR con los partidores 9-27f y 1542r, específicos para la región conservada del ADNr 16S del Dominio *Bacteria* (Joulian *et al.*, 1998; Weisburg *et al.*, 1991). El producto de PCR fue secuenciado por Macrogen Inc. (Seúl, Korea). La secuencia obtenida del gen del ADNr 16S se ingresó como una secuencia problema en el programa de alineamiento de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) identificándose la cepa con la secuencia que presentó mayor identidad (> 95 %). Además se realizaron pruebas fenotípicas clásicas de identificación bacteriana: tinción Gram, movilidad a fresco, test de oxidasa y se determinó la capacidad del microorganismo para fermentar distintos azúcares.

2.5 Caracterización del compuesto antibiopelículas

2.5.1 Efecto de los compuestos extraídos con distintos solventes orgánicos desde el sobrenadante de la cepa M₁₉B sobre la formación de biopelículas y caracterización química de los compuestos.

Para determinar si la actividad inhibitoria de la formación de biopelículas fue producto de compuestos apolares presentes en el sobrenadante del cultivo de la cepa, se

realizó una extracción con solventes orgánicos con distinta polaridad. Para ello, un cultivo líquido de 48 h de la cepa seleccionada fue filtrado mediante un sistema de filtración al vacío de 47 mm para microfiltración, usando filtros de membrana Durapore (PVDF) de 0,22 μm . La extracción líquido-líquido se realizó en un embudo de decantación por triplicado con los solventes orgánicos de polaridad creciente: hexano, diclorometano y acetato de etilo. La fase orgánica resultante de cada extracción fue secada con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar los residuos de la fase acuosa. Finalmente, la fase orgánica con los compuestos de interés fue concentrada en un equipo de destilación al vacío (rotavapor) obteniéndose el extracto total seco.

La caracterización y cuantificación a partir de los extractos básicos que fueron obtenidos en la etapa de extracción del medio de cultivo en suspensión, se realizó empleando la técnica de Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa (CG-EM), facilitado en el laboratorio de Química de Productos Naturales Dr. Mario Silva, de la Universidad de Concepción. El análisis por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa (CGEM), se realizó en un equipo HP 5890/MS 5970, utilizando Helio como gas de arrastre, con un flujo de 1,0 mL/min, columna capilar HP5-MS Agilent (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), temperatura del inyector a 250 °C y detector a 280 °C. El programa de temperatura se inició en 100 °C, la cual permaneció constante por 3 minutos aumentando luego a 10 °C/minuto hasta llegar a 280 °C, la cual se mantuvo constante hasta los 40 minutos finales. La energía de ionización empleada fue de 70 eV. El volumen de inyección fue de 1 μL . Los espectros de masas fueron obtenidos a partir de Cromatograma de iones totales (TIC) y comparados con los espectros de masas de biblioteca, NIST05a, Base de datos NIST (2008) National Institute of Standards and Technology.

Los ensayos de inhibición de la formación de biopelículas fueron realizados en microplacas y en cada pocillo se agregó 100 μl del inóculo del patógeno (10^7 UFC ml^{-1})

¹) y 100 µl de los compuestos obtenidos en cada una de las porciones extraídas y disueltos en medio TYES diluido al 20 %. Se evaluó las siguientes concentraciones de los compuestos obtenidos 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 2; 4; 6; 8 y 10 mg ml⁻¹. Pocillos conteniendo medio TYES diluido al 20% e inóculo de *F. psychrophilum* fueron usados como control de formación de biopelículas. La cuantificación de la biopelícula se realizó mediante tinción con cristal violeta (Christensen *et al.*, 1985). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

2.5.2 Detección de proteínas en el sobrenadante y su efecto sobre la formación de biopelículas

Para detectar si fueron proteínas las involucradas en la actividad antibiopelícula, el sobrenadante libre de células de la cepa seleccionada fue concentrado por ultrafiltración en una centrifuga (1 h, 5.500 rpm, 4 °C) con un dispositivo de filtro de membrana con poro de corte de 3.000 Da (Amicon Ultra-15, 3K, Millipore). El retenido fue visualizado en un gel denaturante SDS-PAGE. Previamente las muestras fueron mezcladas con buffer de carga (20 µl de muestra y 8 µl de buffer de carga) y se procedió a realizar una denaturación térmica calentando la muestra a 100 °C durante 5 min. Luego, 20 µl de la mezcla fueron analizados usando un gel de poliacrilamida al 16 %. La electroforesis se llevó a cabo a 150 V durante 2,5 h y el buffer de corrida de electroforesis contenía Tris 1M, tricina 1M y SDS 1 % (p/v), pH 8,25. Para su visualización, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

La cuantificación de las proteínas presentes en el sobrenadante de la cepa M₁₉B se realizó con el kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor, para posteriormente realizar ensayos de inhibición de formación de biopelículas, los cuales se realizaron en microplacas y con distintas concentraciones proteicas. Para ello, un cultivo de 48 h de *F. psychrophilum* fue ajustado (DO₅₄₀ = 0,8) y el inóculo del patógeno fue de 10⁷ UFC ml⁻¹. A los pocillos

de las microplacas se les agregó el inóculo del microorganismo, medio TYES diluido al 20 % y distintos volúmenes del concentrado proteico siendo evaluadas las siguientes concentraciones finales de proteínas: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mg ml⁻¹ (volumen final 150 µl). La microplaca fue incubada a 15 °C con agitación a 120 rpm durante 4 días. La cuantificación de la biopelícula se realizó mediante el método de tinción con cristal violeta (Christensen *et al.*, 1985).

2.6 Análisis estadísticos.

Para los ensayos de inhibición de la formación de biopelículas, se realizó un análisis ANOVA de una sola vía ($p < 0,050$) entre los tratamientos y el control y una comparación de medias mediante el test de Dunnett (Cady *et al.*, 2012).



3. RESULTADOS

3.1 Actividad inhibitoria del sobrenadante de las cepas bacterianas antárticas sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*

De los sobrenadantes obtenidos de las 67 cepas estudiadas, 18 de ellos (26,9 %) exhibieron un efecto antibiopelículas fuerte, mientras que 17 (25,4 %) no presentaron un efecto antibiopelículas. Las 32 cepas restantes (47,7 %) mostraron un efecto bactericida sobre el crecimiento planctónico de *F. psychrophilum* (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación del efecto de sobrenadantes de las cepas antárticas en la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*.

Efecto del sobrenadante	Nº de cepas	%	Rango SBF
Anti-biopelícula fuerte	18	26,9	0,17 – 0,86
Sin efecto	17	25,4	4,2 – 5,9
Bactericida	32	47,7	ND

Los sobrenadantes de las cepas antárticas que presentaron un efecto antibiopelícula fuerte mostraron una disminución significativa en la fase biopelícula con respecto al control positivo de formación de la misma (Figura 3).

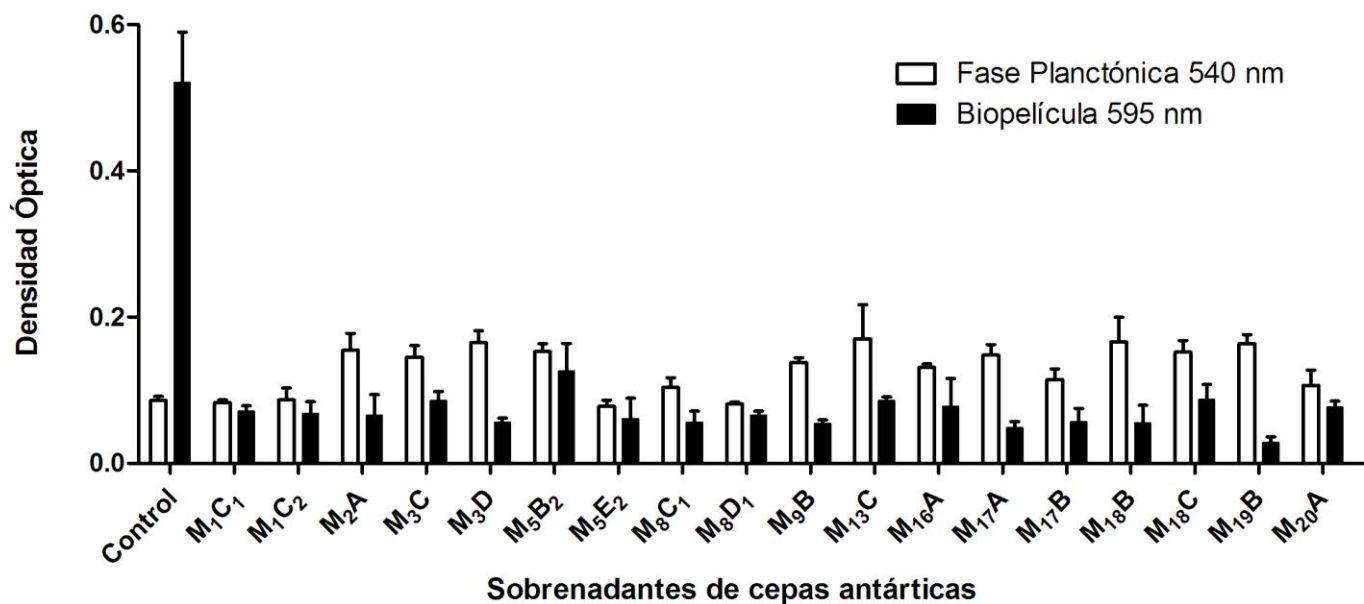


Figura 3. Efecto antibiopelículas fuerte de los sobrenadantes de las cepas antárticas sobre la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum*. Todos los tratamientos presentan una diferencia significativa en la fase biopelícula con respecto al control ($p < 0,05$). El control corresponde al patógeno en medio de cultivo sin la presencia de sobrenadante.

Los sobrenadantes de las 17 cepas antárticas que no presentaron efectos en la formación de la biopelícula del patógeno, no mostraron diferencias significativas en dicha fase con respecto al control (Fig. 4).

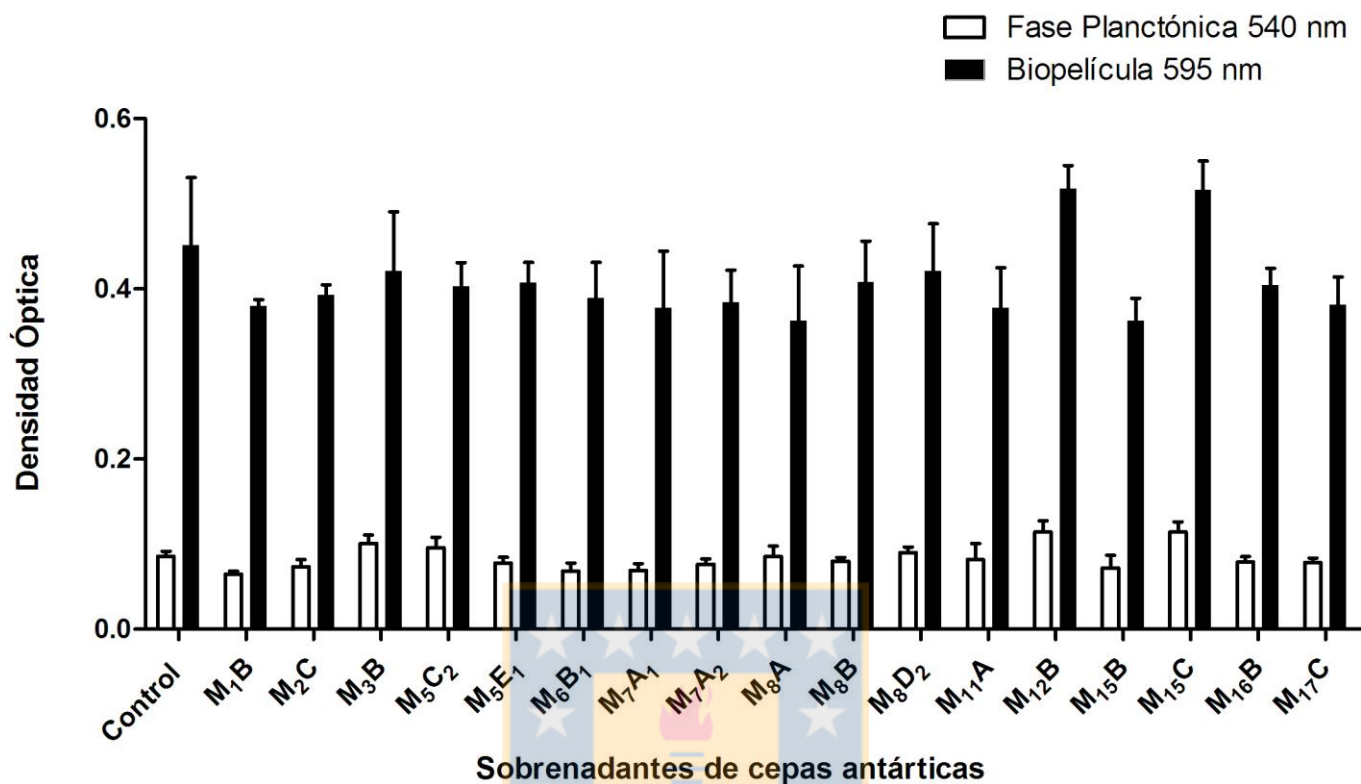


Figura 4. Sobrenadantes de las cepas antárticas sin efecto en la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum*. El control corresponde al patógeno en medio de cultivo sin la presencia de sobrenadante.

De los 18 sobrenadantes que mostraron el efecto esperado, se eligió el sobrenadante de la cepa M₁₉B como el mejor representante, ya que exhibió el menor índice de formación de biopelículas (SBF = 0,19) comparado con el control (SBF = 4,9). Por lo tanto, fue el sobrenadante que inhibió en mayor medida la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum* (Fig. 5).

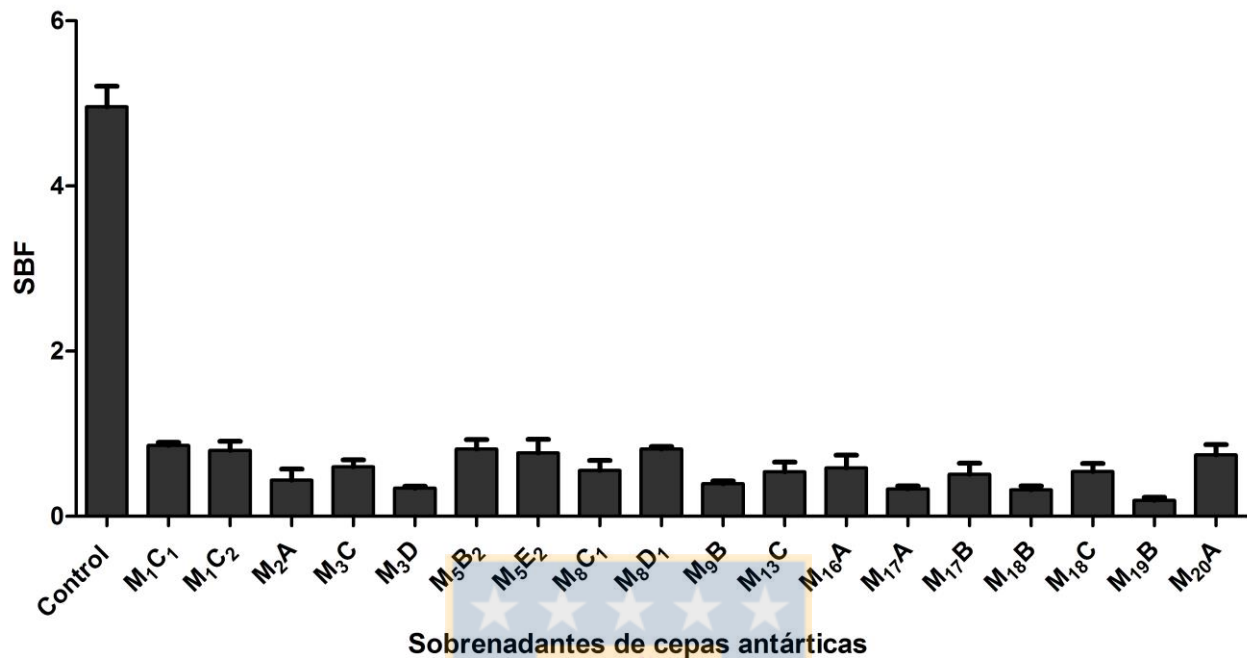


Figura 5. Cálculo específico de la formación de biopelículas (SBF). Todos los SBF presentan diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

3.2 Identificación molecular de la cepa bacteriana inhibidora de biopelículas

Respecto de la identificación molecular de la cepa M₁₉B, se determinó que el fragmento de ADNr 16S amplificado y secuenciado presentó 99 % de identidad con la especie *Pseudomonas fragi* (número de acceso GenBank [AB685646.1](#)). La secuencia obtenida en este trabajo fue ingresada en el GenBank con el código de acceso KC854411.

Los resultados de las pruebas fenotípicas para la confirmación del género *Pseudomonas* se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Pruebas de identificación fenotípicas realizadas a la cepa M₁₉B

Característica	Resultado
Tinción Gram	Bacilos cortos, Gram (-)
Movilidad a fresco	(+)
Oxidasa	(+)
TSI	0/0

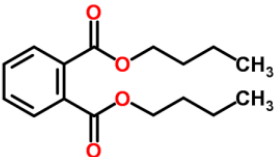

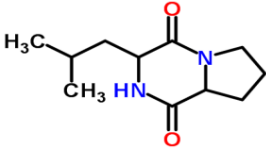
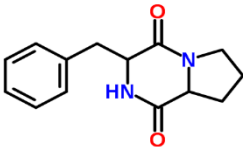
(+) Reacción Positiva; 0/0: No hay fermentación de ningún carbohidrato.

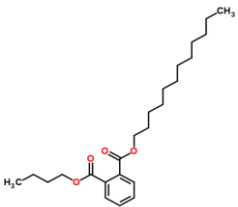
3.3 Caracterización del compuesto antibiopelículas

3.3.1. Extracción con solventes orgánicos de los compuestos presentes en el sobrenadante de la cepa M₁₉B y su efecto sobre la formación de biopelículas.

Los compuestos obtenidos en cada una de las fracciones por extracción con los solventes orgánicos hexano, diclorometano y acetato de etilo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Compuestos químicos presentes en el sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas fragi* extraídos con los solventes orgánicos hexano, diclorometano y acetato de etilo.

Compuesto extraído con el solvente hexano	
<p>Compuesto: Dibutyl phthalate</p> <p>Fórmula: C₁₆H₂₂O₄</p> <p>Peso: 278.343506 Da</p>	
Compuestos extraídos con el solvente diclorometano	
<p>Compuesto: Spiro[1,3-benzoxazine-2,1'-cyclopentan]-4(3H)-one</p> <p>Fórmula: C₁₂H₁₃NO₂</p> <p>Peso: 203.094635 Da</p>	
<p>Compuesto: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-</p> <p>Fórmula: C₁₁H₁₈N₂O₂</p> <p>Peso: 210.272797 Da</p>	
<p>Compuesto: 3-Benzylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione</p> <p>Fórmula: C₁₄H₁₆N₂O₂</p> <p>Peso: 244.28904 Da</p>	

Compuesto extraído con el solvente acetato de etilo	
<p>Compuesto: Butyl dodecyl phthalate</p> <p>Fórmula: C₂₄H₃₈O₄</p> <p>Peso: 390.556091 Da</p>	

El compuesto extraído con el solvente orgánico hexano no mostró actividad antibiopelícula. Sin embargo, a concentraciones de 0,9; 2 y 4 mg ml⁻¹ presentó un aumento significativo en la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum* con respecto al control (Figura 6).

Los compuestos extraídos con el solvente orgánico diclorometano no mostraron una disminución significativa en la formación de la biopelícula del patógeno con respecto al control. Sin embargo, a las concentraciones evaluadas de 0,7; 0,9 y 2 mg ml⁻¹, los compuestos favorecieron significativamente la formación de la biopelícula del microorganismo (Figura 7).

Finalmente, el compuesto extraído con el solvente orgánico acetato de etilo tampoco mostró una actividad antibiopelícula a las concentraciones evaluadas, pero sí provocó un aumento significativo en la formación de ésta a concentraciones entre 0,7 y 0,9 mg ml⁻¹ (Figura 8).

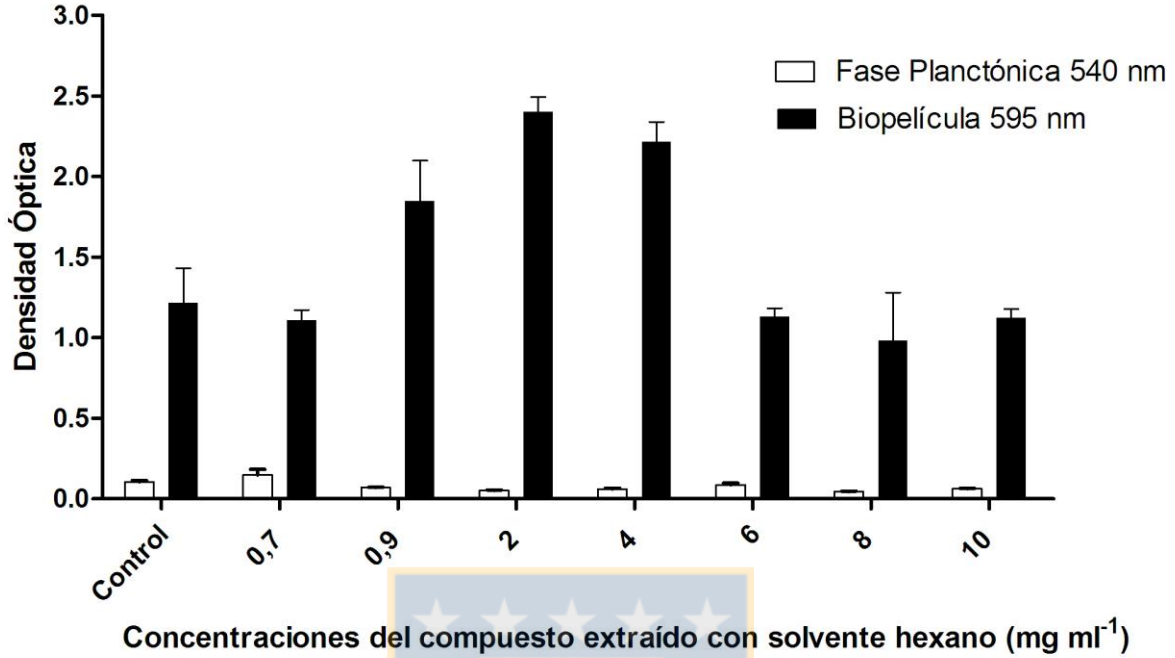


Figura 6. Efecto de distintas concentraciones del compuesto extraído con el solvente hexano sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*. El control corresponde a *F. psychrophilum* en medio de cultivo TYES.

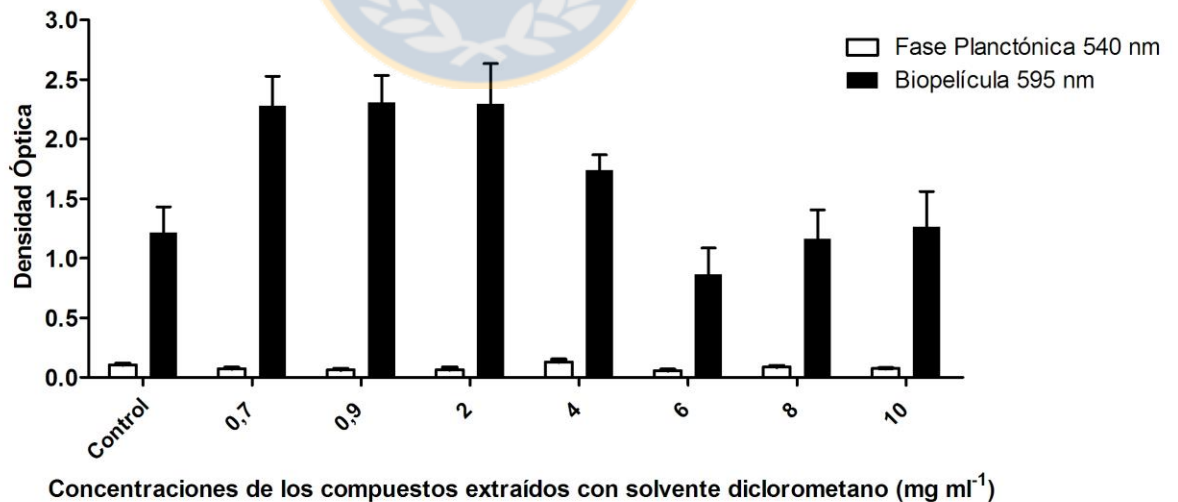


Figura 7. Efecto de distintas concentraciones de los compuestos extraídos con el solvente diclorometano sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*. El control corresponde a *F. psychrophilum* en medio de cultivo TYES.

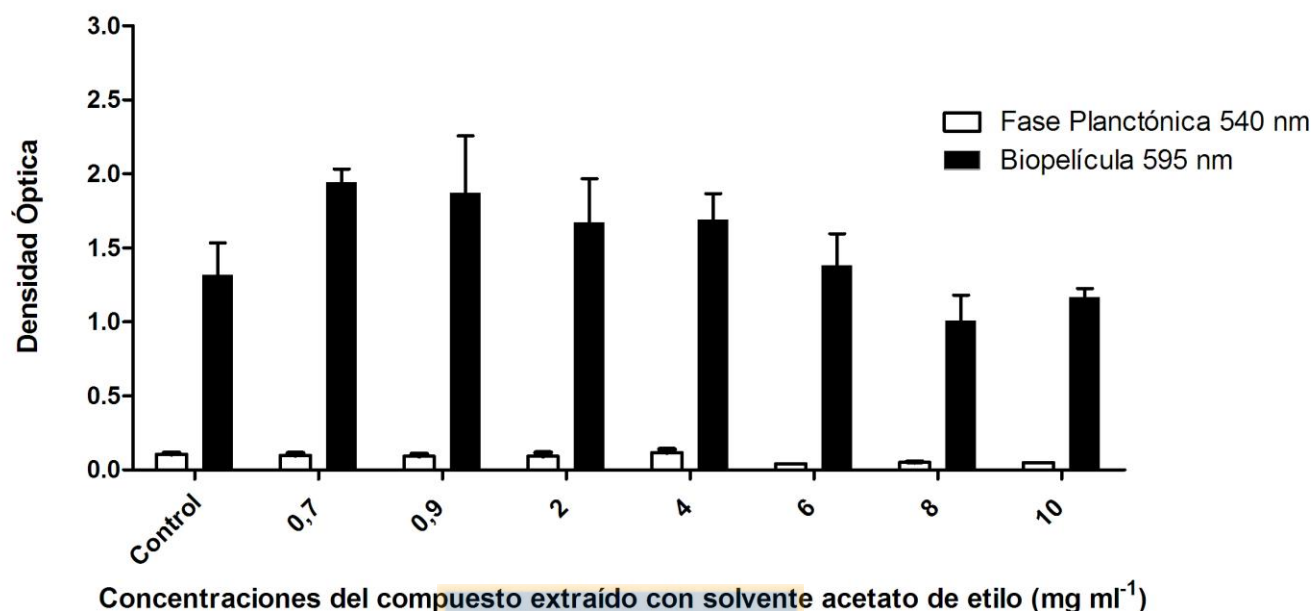


Figura 8. Efecto de distintas concentraciones del compuesto extraído con el solvente acetato de etilo sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*. El control corresponde a *F. psychrophilum* en medio de cultivo TYES.

3.3.2 Detección de proteínas en el sobrenadante y su efecto sobre la formación de biopelículas.

Para determinar si el efecto del sobrenadante de la cepa seleccionada sobre la formación de biopelículas se debía a la presencia de compuestos proteicos, el sobrenadante concentrado fue utilizado para la visualización de proteínas en un gel denaturante SDS-PAGE. El gel permitió detectar proteínas en el sobrenadante de la cepa seleccionada con una masa estimada entre 46 y 58 kDa (Figura 9).

La cuantificación de proteínas en el sobrenadante indicó una concentración máxima de 3,6 mg ml⁻¹ y con el rango de concentraciones proteicas utilizadas en los estudios

de actividad antibiopelícula (entre 0,5 y 3,0 mg ml⁻¹), los resultados mostraron que concentraciones entre 0,5 y 1,5 mg ml⁻¹ tuvieron un efecto inhibitorio fuerte (SBF < 1) en la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum*, mientras que concentraciones superiores a 1,5 mg ml⁻¹, si bien inhibieron la formación de biopelículas comparado con el control, esta inhibición fue producto del efecto inhibitorio sobre el crecimiento planctónico del patógeno, el cual fue significativamente menor que el control (Figura 10).

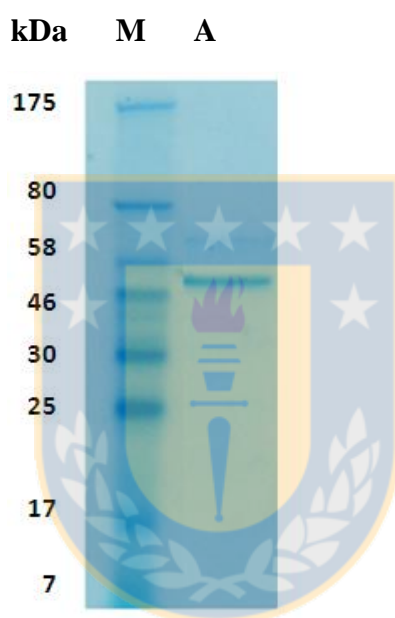


Figura 9. Electroforesis en gel SDS-PAGE (16 % acrilamida) de proteínas en sobrenadante de cepa M₁₉B. M: Marcador de peso molecular; A: sobrenadante de la cepa M₁₉B.

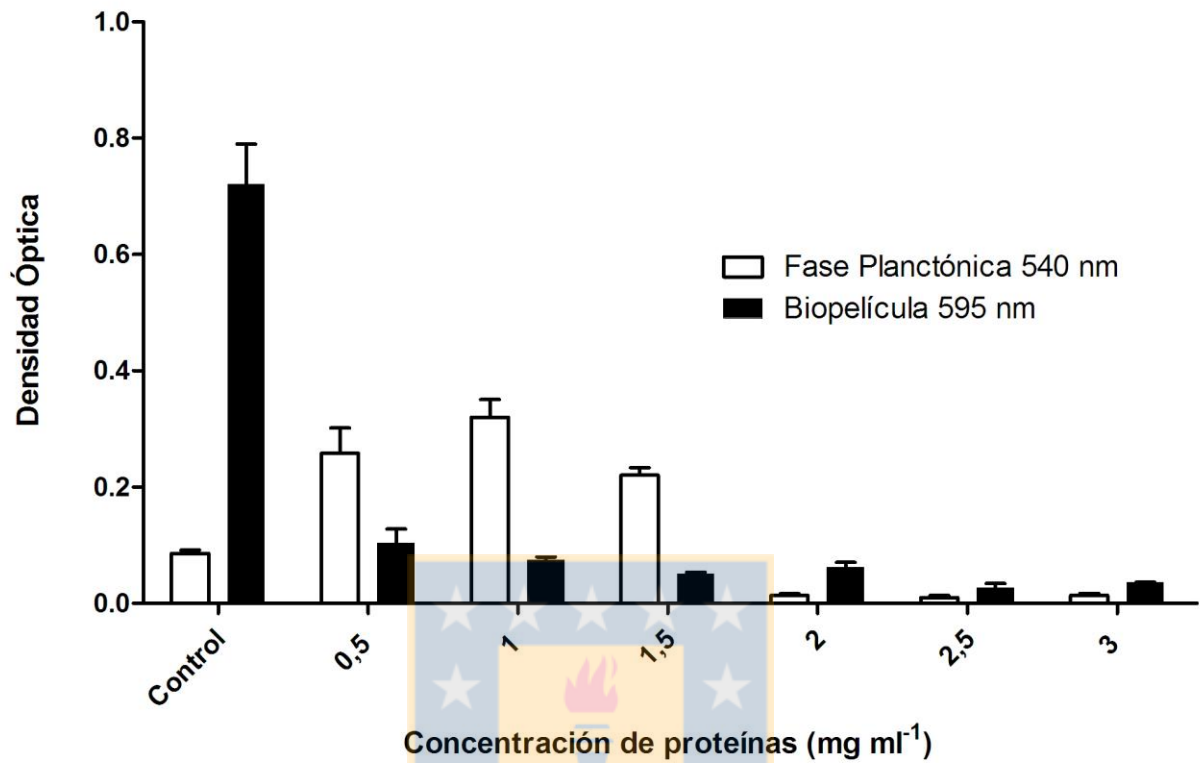


Figura 10. Efecto de distintas concentraciones proteicas presentes en el sobrenadante de la cepa M₁₉B sobre la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*. El control corresponde al patógeno en medio de cultivo TYES.

4. DISCUSIÓN

La bacteria psicrófila *F. psychrophilum* es un importante patógeno de acuicultura que afecta, principalmente, a salmones y truchas provocando altas mortalidades cuando los brotes se producen durante los estados iniciales de desarrollo de los peces (Starliper, 2010; Korkea-aho *et al.*, 2011). Es el agente etiológico de la enfermedad del agua fría que provoca languidez, pérdida de apetito y erosiones en el extremo de las aletas durante sus etapas iniciales, mientras que en estados avanzados las lesiones necróticas que provoca en la región caudal pueden progresar hasta dejar expuesta la vértebra caudal (Starliper, 2010). En Chile, de acuerdo a la distribución de los diagnósticos informados por los laboratorios, la enfermedad del agua fría es la segunda patología que afecta a los salmónidos en cultivo después de la piscirickettsiosis cuyo agente etiológico es *Piscirickettsia salmonis* (Avendaño-Herrera *et al.*, 2009).

En nuestro país, el tratamiento de las enfermedades que afectan a los salmónidos se lleva a cabo mediante el uso de seis antibióticos oficialmente registrados para su uso en salmonicultura: flumequina, amoxicilina, oxitetraciclina, eritromicina, florfenicol y ácido oxolínico (Avendaño-Herrera *et al.*, 2009; Henríquez-Núñez *et al.*, 2012). Aunque la mortalidad provocada por los brotes de *F. psychrophilum* puede ser controlada mediante el uso de algunos de los antibióticos mencionados, la enfermedad causada por este patógeno tiene una gran importancia económica debido a que provoca una disminución en la calidad de los peces, así como también, genera altos costos asociados con el uso de los agentes antimicrobianos para su control, principalmente oxitetraciclina y florfenicol, los cuales contribuyen a la rápida aparición de cepas resistentes disminuyendo así el efecto de la terapia antimicrobiana (Avendaño-Herrera *et al.*, 2009).

Durante el año 2012, se utilizaron 334.99 toneladas de antimicrobianos en la industria salmonera según el *Informe Sobre Uso de Antimicrobianos en la*

Salmonicultura Nacional (Sernapesca, 2012). Lo anterior, sumado a la aparición de cepas resistentes de *F. psychrophilum* a los principales antibióticos usados para su control (Henríquez-Núñez *et al.*, 2012) y a los antecedentes existentes a la fecha, de que este microorganismo tiene la capacidad de formar biopelículas, aumentando de esta forma la resistencia al tratamiento con antibióticos (Sundell & Wiklund, 2011), puso de manifiesto la necesidad de buscar nuevas estrategias de control utilizando como fuente de potenciales recursos biotecnológicos a la Antártica.

Entre las investigaciones realizadas con bacterias antárticas, muchas de ellas se han enfocado en la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos y de enzimas de importancia comercial (O'Brien *et al.*, 2004; Vázquez *et al.*, 2004; Lo Giudice *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Sin embargo, en esta tesis se investigó la capacidad de cepas antárticas de producir compuestos con actividad inhibitoria de la formación *in vitro* de biopelículas de *F. psychrophilum*.

En esta investigación, se encontró que un alto número de cepas bacterianas antárticas secretaron compuestos con actividad inhibitoria sobre la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum*. La proporción de cepas es similar a la obtenida en un estudio en el que 27 de 88 sobrenadantes de cultivos de actinomicetes marinos inhibieron la formación de la biopelícula del patógeno de peces *V. anguillarum* mediante compuestos presentes en su sobrenadante (You *et al.*, 2007). Sin embargo, los actinomicetes no eran de origen antártico. A la fecha, sólo hay un reporte de una cepa antártica identificada como *Pseudoalteromonas haloplanktis*, inhibidora de biopelículas, en este caso de la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis*, inhibición realizada mediante la producción de compuestos de naturaleza sacarídica (Papa *et al.*, 2013).

Cabe destacar que cerca de la mitad de las cepas antárticas produjo compuestos que inhibieron el crecimiento en fase planctónica del microorganismo en estudio, por lo que sumado al efecto antibiopelículas, 75 % del total de los sobrenadantes de las

cepas evaluadas presentó algún efecto sobre *F. psychrophilum*, probablemente debido a que sus condiciones de crecimiento son similares, ya que tanto las cepas antárticas como el patógeno son microorganismos psicrófilos o psicrotolerantes, por lo que requieren similares condiciones de cultivo. Además, esta alta proporción de cepas antárticas con efecto sobre este patógeno se debe a que las condiciones extremas de la región obligan a estos microorganismos a secretar compuestos antimicrobianos para hacer frente a potenciales competidores (Lo Giudice *et al.*, 2007), por lo que la Antártica ofrece microorganismos capaces de sintetizar un amplio rango de potenciales compuestos bioactivos (Jayatilake *et al.*, 1996).

La cepa M₁₉B presentó la mayor actividad antibiopelícula. Esta cepa disminuyó significativamente la fase de biopelícula del patógeno pero no impidió el crecimiento planctónico del mismo. Mediante el índice de SBF se discrimina que el efecto del sobrenadante de la cepa se produce solamente en la fase de biopelícula y no es consecuencia del efecto que pueda tener el sobrenadante sobre la fase planctónica, puesto que de haber sido así el SBF no hubiese podido ser calculado. EL SBF se puede relacionar también, con el grosor de la biopelícula (Naves *et al.*, 2008) lo que indicaría que un menor SBF, producido por la cepa seleccionada, estaría relacionado con una menor producción de la misma. Sin embargo, estudios de microscopía deberán ser realizados para confirmar el efecto antibiopelícula del sobrenadante de la cepa sobre la estructura final de la biopelícula de *F. psychrophilum*.

La cepa antártica M₁₉B que presentó el mejor efecto antibiopelícula fue aislada desde una muestra de agua de lago e identificada como *P. fragi*, especie psicrotrofa capaz de crecer a temperaturas que oscilan entre 2 °C y 35 °C, la cual ha sido frecuentemente usada como fuente de lipasas y caracterizada también por ser responsable de la descomposición de alimentos refrigerados (Franzetti & Scarpellini, 2007; Ercolini *et al.*, 2010).

A la fecha existen antecedentes de estudios realizados con especies pertenecientes al género *Pseudomonas* con fines de biocontrol en acuicultura (Bly *et al.*, 1997) y específicamente en el biocontrol de *F. psychrophilum* (Korkea-aho *et al.* 2011; Strom-Bestor & Wiklund, 2011). Las bacterias pertenecientes a este género han sido ampliamente estudiadas como potenciales probióticos para su uso en la acuicultura, ya que forman parte de la microbiota normal de los peces (Smith & Davey, 1993; Bly *et al.*, 1997). Es así como un efecto inhibitorio del crecimiento del patógeno, además de una disminución en la mortalidad de los peces que fueron alimentados con la bacteria *Pseudomonas* M174 e infectados con *F. psychrophilum*, sugieren a esta bacteria como un potencial probiótico contra el patógeno (Korkea-aho *et al.* 2011). Además, el aislado MSB1 perteneciente al género *Pseudomonas* inhibió significativamente el crecimiento de *F. psychrophilum* mediante la secreción de sustancias antagónicas (Strom-Bestor & Wiklund, 2011). Por otro lado, De la Fuente *et al.*, (2013) informan de la inhibición de la formación de biopelícula de *F. psychrophilum* mediante la formación de una biopelícula antagónica desarrollada por una cepa de *Pseudomonas fluorescens* mediante un mecanismo dependiente de hierro. Los estudios llevados a cabo con cepas de *P. fragi* se han enfocado en su capacidad de producir lipasas activas a bajas temperaturas (Alquati *et al.*, 2002), por su efecto en la descomposición de alimentos (Franzetti & Scarpellini, 2007) y también por su capacidad para degradar aceite de motores (Adelowo *et al.*, 2006), siendo esta investigación el primer reporte del efecto antibiopelículas de compuestos secretados por la bacteria antártica *P. fragi*.

En cuanto al compuesto con actividad antibiopelícula, en esta tesis éste no pudo ser extraído con solventes orgánicos, lo que indica que no se trataría de un compuesto apolar. Por el contrario, el compuesto ftalato de dibutilo extraído en la fracción hexánica, así como los aquellos presentes en la fracción diclorometano y acetato de etilo, mostraron un aumento significativo en la formación de la biopelícula del patógeno. En cuanto a compuestos activos extraídos con los solventes orgánicos hexano, diclorometano y acetato de etilo, se han obtenido algunos de ellos desde el

sobrenadante de bacterias, los que han presentado efectos antifúngicos como en el caso de los compuestos activos secretados por *Bacillus subtilis*, los cuales tuvieron un efecto preventivo de la antracnosis que afecta a orquídeas (Prapagdee *et al.*, 2012) y también se han extraído con estos solventes orgánicos compuestos con efecto antibacteriano sobre bacterias patógenas humanas. Es así como compuestos activos extraídos con el solvente acetato de etilo y secretados por bacterias asociadas al cirrípedo *Balanus amphitrite* han presentado actividad antibacteriana sobre importantes patógenos humanos como *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli*, entre otros (Jebasingh & Murugan, 2011). Sin embargo, a pesar de que hay antecedentes de compuestos extraídos con los solventes orgánicos utilizados en esta tesis, que han presentado efectos inhibidores del crecimiento de patógenos, los cuales podrían ejercer un efecto inhibitorio en biopelículas, en esta investigación no se encontró un efecto antibiopelículas sobre *F. psychrophilum* al utilizar los compuestos extraídos con cada uno de los solventes orgánicos en los ensayos de inhibición de las mismas.

Los resultados de este estudio sugieren que la actividad antibiopelículas fue producto de proteínas secretadas por *P. fragi* M₁₉B, con un rango de masa molecular entre 46 y 58 kDa. Estos resultados difieren de lo reportado por Papa *et al.*, (2013), quienes encontraron que el sobrenadante de la cepa antártica *P. haloplanktis* contenía un compuesto activo antibiopelículas con características de polisacárido. Sin embargo, los resultados obtenidos en cuanto a la naturaleza peptídica del compuesto inhibitorio coinciden con Kan *et al.*, (2012) quienes encontraron un compuesto de la misma naturaleza secretado por una cepa antártica perteneciente al género *Pseudoalteromonas*, compuesto que fue responsable de la actividad antagónica sobre el crecimiento del patógeno de peces *V. anguillarum*. A pesar de que en esta tesis el compuesto tuvo un efecto sobre una biopelícula, se transforma en un nuevo antecedente de compuestos activos de naturaleza proteica secretados por bacterias antárticas.

A la fecha existen varias investigaciones que respaldan el efecto antibiopelículas de compuestos proteicos secretados por cepas bacterianas, como en el caso de una proteína de 48 kDa secretada por *Streptococcus intermedius*, la cual fue identificada como una arginina deiminasa, proteína que impidió la formación de la biopelícula de *Porphyromonas gingivalis* mediante la represión de la expresión de los genes que codifican las principales subunidades proteicas de los dos tipos de fimbrias presentes en su superficie y responsables de la adherencia y posterior formación de biopelículas (Christopher *et al.* 2010). Así como también, de péptidos/proteínas presentes en el sobrenadante de una especie bacteriana perteneciente al género *Streptomyces*, los cuales interfirieron en la formación de la biopelícula de *P. aeruginosa* (Kim *et al.*, 2012). En esta tesis cuando se evaluó el efecto de distintas concentraciones proteicas en la formación de la biopelícula, se produjo una fuerte inhibición dosis-dependiente de ésta, por lo que se sugiere que el efecto inhibitorio fue provocado por las proteínas presentes en el sobrenadante de la cepa *P. fragi* M₁₉B.

Los posibles mecanismos que podrían explicar el efecto inhibitorio de las proteínas secretadas por *P. fragi* M₁₉B en la formación de la biopelícula del patógeno son muy variados, por lo que estudios conducentes a dilucidar el mecanismo de inhibición deben ser realizados para poder entender cómo se produce dicho efecto. En este punto, cabe destacar que el compuesto activo antibiopelículas no pudo haber provocado su inhibición mediante la interferencia de *quorum sensing* ya que *F. psychrophilum* no presentaría este tipo de comunicación intercelular puesto que ésta no ha sido reportada en este microorganismo y tampoco se ha reportado la detección de la molécula inductora acil-homoserina lactona (Bruhn *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010). Otro mecanismo que puede ser descartado es la inhibición de biopelículas mediante la producción de sideróforos. Se ha reportado la inhibición de biopelículas mediante compuestos quelantes de hierro, como ocurre en el caso de *P. aeruginosa*, microorganismo que al ser expuesto a condiciones subinhibitorias de lactoferrina, se estimula el movimiento celular (*twitching motility*) y se evita la formación de

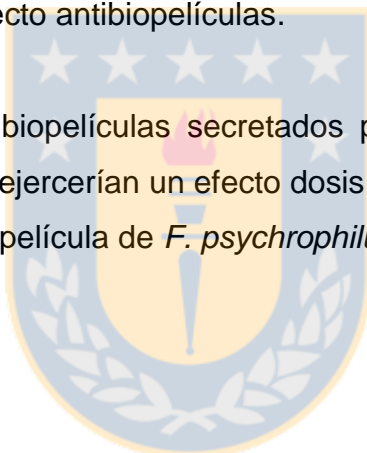
biopelículas (Singh *et al.*, 2002). En este punto, se puede descartar que el compuesto activo secretado por *P. fragi* M₁₉B sea de tipo sideróforo y que ejerza su efecto antibiopelículas mediante el secuestro de hierro ya que no se ha descrito la producción de éstos por esta cepa. Cabe mencionar que Champomier-Vergès *et al.* (1996) fracasaron en todos sus intentos de detectar sideróforos en sobrenadantes de cultivos deficientes de hierro de *P. fragi*, sugiriendo que el citrato producido por esta especie podría ser el transportador más eficiente de hierro para la mayoría de las cepas de *P. fragi*. Lo mencionado anteriormente reafirma los resultados obtenidos en esta investigación en cuanto a la naturaleza proteica del compuesto inhibitorio secretado por *P. fragi* M₁₉B.

Finalmente, la cepa identificada como *P. fragi* fue la cepa que presentó el mejor efecto antibiopelículas y se sugiere que produjo el efecto a través de la secreción de proteínas. Esta cepa se convierte en un microorganismo con potencial uso en acuicultura ya que los compuestos que produce pueden ser usados para mejorar el efecto de la terapia antimicrobiana al evitar la formación de la biopelícula del patógeno, quedando así las células planctónicas expuestas a la acción de los antibióticos. La incorporación de estas proteínas al medio, en que se encuentran tanto los peces como el patógeno, puede evitar la persistencia de *F. psychrophilum* en las instalaciones acuícolas, disminuyendo así la cantidad de antibióticos usados en el control de las enfermedades causadas por el patógeno.

5. CONCLUSIONES

La hipótesis establecida en esta tesis “cepas de bacterias quimiorganotróficas de origen antártico producen compuestos extracelulares de naturaleza proteica que inhiben la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*” es aceptada según los siguientes puntos:

- Un alto porcentaje de cepas antárticas secretan compuestos que afectan tanto el crecimiento en fase planctónica como la formación de biopelículas de *F. psychrophilum*. Del total de cepas que afectaron la formación de la biopelícula del patógeno, el sobrenadante de la cepa M₁₉B, identificada como *P. fragi*, presentó el mayor efecto antibiopelículas.
- Los compuestos antibiopelículas secretados por *P. fragi* corresponderían a proteínas, las cuales ejercerían un efecto dosis dependiente en la inhibición de la formación de la biopelícula de *F. psychrophilum*.



6. BIBLIOGRAFÍA

Adelowo, O. O., Alagbe, S. O., & Ayandele, A. A. 2006. Time-dependent stability of used engine oil degradation by cultures of *Pseudomonas fragi* and *Achromobacter aerogenes*. *African Journal of Biotechnology*, **5**(24): 2476-2479.

Alquati, C., De Gioia, L., Santarossa, G., Alberghina, L., Fantucci, P., & Lotti, M. 2002. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. *European Journal of Biochemistry*, **269**(13): 3321-3328.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**(3): 403-410.

Álvarez, B., Secades, P., Prieto, M., McBride, M. J., & Guijarro, J. A. 2006. A mutation in *Flavobacterium psychrophilum tlpB* inhibits gliding motility and induces biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(6): 4044-4053.

Álvarez, B., & Guijarro, J. A. 2007. Recovery of *Flavobacterium psychrophilum* viable cells using a charcoal-based solid medium. *Letters in Applied Microbiology*, **44**(5): 569–572.

Anwar, H., Strap, J. L., & Costerton, J. W. 1992. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**(7): 1347-1351.

Avendaño-Herrera, R., Araya, P., & Fernández, J. 2009. Molecular analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from salmonid farms in Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **29**(6): 184-192.

Barnes, M. E., & Brown, M. L. 2011. A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. *Open Fish Science Journal*, **4**: 40-48.

Behlau, I., & Gilmore, M. S. 2008. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Archives of Ophthalmology*, **126**(11): 1572.

Bennett, P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, **153**(S1): S347-S357.

Bly, J. E., Quiniou, S. A., Lawson, L. A., & Clem, L. W. 1997. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Fish Diseases*, **20**(1): 35-40.

Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, **13**(1): 20-26.

Bravo, S., Dolz H., Silva M., Lagos, C., Millanao, A., Urbina, M. 2005. Informe Final. Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Pesquerías y Oceanografía, Instituto de Acuicultura. Casilla 1327. Puerto Montt, Chile. Proyecto No. 2003; 28.

Brown, L. L., Cox, W. T., & Levine, R. P. 1997. Evidence that the causal agent of bacterial coldwater disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms*, **29**(3): 213-218.

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

Buschmann, A., & Fortt, A. 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Revista Ambiente y Desarrollo*, **21**(3): 58-64.

Buschmann, A. H., Cabello, F., Young, K., Carvajal, J., Varela, D. A., & Henríquez, L. 2009. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean & Coastal Management*, **52**(5): 243-249.

Buschmann, A. H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M. A., Henríquez, L. A., Ivanova, L., Moy, F., Godfrey, H. P., & Cabello, F. C. 2012. Salmon Aquaculture and Antimicrobial Resistance in the Marine Environment. *PloS One*, **7**(8): e42724.

Cabello, F. C. 2004. Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health. *Revista Médica de Chile*, **132**(8): 1001–1006.

Cabello, F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, **8**(7): 1137-1144.

Cady, N. C., McKean, K. A., Behnke, J., Kubec, R., Mosier, A. P., Kasper, S. H., Burz, D. S., & Musah, R. A. 2012. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. *PloS One*, **7**(6): e38492.

Cain, K. D., & LaFrentz, B. R. 2007. Laboratory maintenance of *Flavobacterium psychrophilum* and *Flavobacterium columnare*. In: Coico R., Kowalik T., Quarles J.M., Stevenson B., Taylor R.K., Simon A.E. (Eds.), Current protocols in microbiology. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ. pp. 13B.1.1-13B.1.12.

Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R., & Hultgren, S. J. 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*, **6**(1): 17-27.

Champomier-Vergès, M. C., Stintzi, A., & Meyer, J. M. 1996. Acquisition of iron by the non-siderophore-producing *Pseudomonas fragi*. *Microbiology*, **142**(5): 1191-1199.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. 1985. Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, **22**(6): 996-1006.

Christopher, A. B., Arndt, A., Cugini, C., & Davey, M. E. 2010. A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development. *Microbiology*, **156**(11): 3469-3477.

Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., & Muniesa, M. 2011a. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**(10): 4908-4911.

Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. 2011b. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One*, **6**(3): e17549.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**(5418): 1318-1322.

Coyne, S., Courvalin, P., & Galimand, M. 2010. Acquisition of multidrug resistance transposon Tn6061 and IS6100-mediated large chromosomal inversions in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbiology*, **156**(5): 1448-1458.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., & Gerday, C. 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*, **7**(4): 385-389.

Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**(2): 114–122.

Davies, D. G., & Marques, C. N. 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, **191**(5): 1393-1403.

De la Fuente, M., Vidal, J. M., Miranda, C. D., González, G., & Urrutia, H. 2013. Inhibition of *Flavobacterium psychrophilum* biofilm formation using a biofilm of the antagonist *Pseudomonas fluorescens* FF48. *SpringerPlus*, **2**(1): 1-9.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**(2): 167-193.

Donoso, W. 2010. Informe Sectorial Sector Pesca y Salmonicultura. Disponible en: https://www.google.cl/#hl=es&q=Fitch+Ratings.+Subpesca+informe+sector+pesca+y+acuicultura&spell=1&sa=X&ei=BhFCUf_jNeTd2QXHq4DgDQ&sqi=2&ved=0CC0QvwUoAA&bav=on.2,or.r_cp.r_qf.&bvm=bv.43287494,bs.1,d.eWU&fp=90aba95a2ca8b722&biw=1600&bih=1039

Consultado: 20/12/2012

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

Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Ferranti, P., Mauriello, G., & Villani, F. 2010. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *International Journal of Food Microbiology*, **142**(1): 120-131.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/publications/en>. Consultado 20/02/2013.

Franzetti, L., & M. Scarpellini. 2007. Characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, **57** (1): 39-47.

Gesheva, V., & Vasileva-Tonkova, E. 2012. Production of enzymes and antimicrobial compounds by halophilic Antarctic *Nocardioides* sp. grown on different carbon sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**(5): 2069-2076.

Henríquez-Núñez, H., Evrard, O., Kronvall, G., & Avendaño-Herrera, R. 2012. Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture*, **354**: 38–44.

Högfors-Rönholm, E., & Wiklund, T. 2010. Hemolytic activity in *Flavobacterium psychrophilum* is a contact-dependent, two-step mechanism and differently expressed in smooth and rough phenotypes. *Microbial Pathogenesis*, **49**(6): 369-375.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **35**(4): 322-332.

Holt, R. A., Rohovec, J. S., & Fryer, J. L. 1993. Bacterial cold-water disease. In: *Bacterial Diseases of Fish* (ed. by V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage), pp. 3-23. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Huq, A., Whitehouse, C. A., Grim, C. J., Alam, M., & Colwell, R. R. 2008. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**(3): 244-247.

Ikegami, A., Honma, K., Sharma, A., & Kuramitsu, H. K. 2004. Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infection and Immunity*, **72**(8): 4619-4627.

Jayatilake, G. S., Thornton, M. P., Leonard, A. C., Grimwade, J. E., & Baker, B. J. 1996. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products*, **59**(3): 293-296.

Jebasingh, S. E. J., & Murugan, A. 2011. Antagonistic activity of the barnacle (*Balanus amphitrite*) associated bacteria against human bacterial pathogens. *World Journal of Medical Sciences* **6**(1): 36-41.

Jefferson, K. K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, **236**(2): 163-173.

Joulian, C., Ollivier, B., Patel, B. K. C., & Roger, P. A. 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiology Ecology*, **25**(2): 135-145.

Kan, G. F., Shi, C. J., Wang, M. C., & Wang, M. 2012. Screening of antarctic antagonism against *Vibro anguillarum* and preliminary research of the antibacterial substances. *Advanced Materials Research*, **347**: 635-638.

Katz, J., Izuka, M., & Muñoz, S. 2011. Creciendo en base a los recursos naturales, “tragedias de los comunes” y el futuro de la industria salmonera chilena. Cepal, Serie de Desarrollo Productivo N° 191.

Disponible en: http://www.giz-cepal.cl/publicaciones_chile. Consultado: 15/11/2012

Kim, Y. G., Lee, J. H., Kim, C. J., Lee, J. C., Ju, Y. J., Cho, M. H., & Lee, J. 2012. Antibiofilm activity of *Streptomyces* sp. BFI 230 and *Kribbella* sp. BFI 1562 against *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **96**(6): 1607-1617.

King, R.K., Flick Jr. G.J., Smith, S.A., Pierson, M.D., Boardman, G.D., & Coale Jr. C.W. 2008. Response of bacterial biofilms in recirculating aquaculture systems to various sanitizers. *Journal of Applied Aquaculture*, **20**(2):79-92.

Korkea-aho, T. L., Heikkinen, J., Thompson, K. D., von Wright, A., & Austin, B. 2011. *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology*, **111**(2): 266-277.

Kristensen, J. B., Meyer, R. L., Laursen, B. S., Shipovskov, S., Besenbacher, F., & Poulsen, C. H. 2008. Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. *Biotechnology Advances*, **26**(5): 471-481.

Lambert, P. A. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**(10): 1471-1485.

Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C., & Combes, D. 2008. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. *Biofouling*, **24**(1): 11-22.

Levy, S. B., & Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, **10**: S122-S129.

Lindsay, D., & Von Holy, A. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, **64**(4): 313-325.

Lo Giudice, A., Bruni, V., & Michaud, L. 2007. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms. *Journal of Basic Microbiology*, **47**(6): 496-505.

Madetoja, J., Dalsgaard, I., & Wiklund, T. 2002. Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments. *Diseases of Aquatic Organisms*, **52**(2): 109-118.

Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. 2001. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**(12): 3375-3380.

Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, **9**(1), 34-39.

Martínez, J. L., Casado, A., & Enríquez, R. 2004. Experimental infection of *Flavobacterium psychrophilum* in fins of Atlantic salmon *Salmo salar* revealed by scanning electron microscopy. *Diseases of Aquatic Organisms*, **59**(1): 79-84.

Martínez-Rosales, C., & Castro-Sowinski, S. 2011. Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Research*, **30**: 7123.

McBride, M. J. 2001. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annual Reviews in Microbiology*, **55**(1): 49-75.

McManus, M. C. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, **54**(12): 1420-1433.

Meyer, B. 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **51**(4): 249-253.

Miwa, S., & Nakayasu, C. 2005. Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **67**(1): 93-104.

Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Dahbi, G., Blanco, M., Ponte, M., & Soriano, F. 2008. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis*, **45**(2): 86–91.

Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. 2003a. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, **26**(10): 563-574.

Nilsen, H., Olsen, A. B., Vaagnes, Ø., Hellberg, H., Bottolfsen, K., Skjelstad, H., & Colquhoun, D. J. 2011. Systemic *Flavobacterium psychrophilum* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farmed in fresh and brackish water in Norway. *Journal of Fish Diseases*, **34**(5): 403-408.

Niu, C., & Gilbert, E. S. 2004. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(12): 6951-6956.

O'Brien, A., Sharp, R., Russell, N. J., & Roller, S. 2004. Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology*, **48**(2): 157-167.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, **54**(1): 49-79.

Papa R., Parilli E., Sannino F., Barbato G., Tutino M.L., Artini M., & Selan L. 2013. Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Research in Microbiology*, (en prensa)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2013.01.010>.

Pérez-Pascual, D., Gómez, E., Álvarez, B., Méndez, J., Reimundo, P., Navais, R., Duchaud, E., & Guijarro, J. A. 2011. Comparative analysis and mutation effects of *fpp2–fpp1* tandem genes encoding proteolytic extracellular enzymes of *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiology*, **157**(4): 1196-1204.

Prapagdee, B., Tharasaithong, L., Nanthaphot, R., & Paisitwiroj, C. 2012. Efficacy of crude extract of antifungal compounds produced from *Bacillus subtilis* on prevention of anthracnose disease in *Dendrobium* orchid. *Environment Asia*, **5**(1): 32-38.

Romero, M., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Cámara, M., & Otero, A. 2010. Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the Cytophaga–Flavobacterium–Bacteroides (CFB) group. *FEMS Microbiology Letters*, **304**(2): 131-139.

Secades, P., Álvarez, B., & Guijarro, J. A. 2001. Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(6): 2436-2444.

Secades, P., Álvarez, B., & Guijarro, J. A. 2006. Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *FEMS Microbiology Letters*, **226**(2): 273-279.

Sernapesca, 2012. Informe Sectorial de Pesca y Acuicultura, Agosto 2012. Disponible en: http://www.subpesca.cl/controls/neochannels/neo_ch847/neochn847.aspx?appinstan ceid=855&pubid=1588

Consultado: 02/12/2012

Sharma, A., Sojar, H. T., Glurich, I., Honma, K., Kuramitsu, H. K., & Genco, R. J. 1998. Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infection and Immunity*, **66**(12): 5703-5710.

Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, **417**(6888): 552-555.

Smith, P., & Davey, S. 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *Journal of Fish Diseases*, **16**(5): 521-524.

Starliper, C. 2010. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research*, **2**(2): 97-108.

Stepanović, S., Ćirković, I., & Ranin, L. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, **38**(5): 428-432.

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

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

Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, **119**(6): S3-S10.

Tindall, B. J. 2004. Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. *Microbial Ecology*, **47**(3): 271-283.

Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., & Ghigo, J. M. 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(33): 12558-12563.

Van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, **2**.

Vatsos, I. N., Thompson, K. D., & Adams, A. 2003. Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Diseases of Aquatic Organisms*, **56**(2), 115-126.

Vázquez, S. C., Coria, S. H., & Mac Cormack, W. P. 2004. Extracellular proteases from eight psychrotolerant Antarctic strains. *Microbiological Research*, **159**(2): 157-166.

Wang, Q. F., Hou, Y. H., Xu, Z., Miao, J. L., & Li, G. Y. 2008. Purification and properties of an extracellular cold-active protease from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ276. *Biochemical Engineering Journal*, **38**(3): 362-368.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, **173**(2): 697-703.

Wong, C. M. V. L., Tam, H. K., Alias, S. A., González, M., González-Rocha, G., & Domínguez-Yévenes, M. 2011. *Pseudomonas* and *Pedobacter* isolates from King George Island inhibited the growth of foodborne pathogens. *Polish Polar Research*, **32**(1): 3-14.

Wright, G. D. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**(10): 1451-1470.

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

