

Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en substratos marinos

Production of inhibitory substances among bacterial biofilms on marine substrates

Rubén Avendaño-Herrera, Mario Lody y Carlos E. Riquelme

Laboratorio de Microbiología Marina, Departamento de Acuicultura, Universidad de Antofagasta,
Casilla 170, Antofagasta, Chile
reavendano@yahoo.com

Resumen.- Se estudió la relación antagonica entre bacterias benticas que conforman biopelículas en diferentes substratos marinos. Se examinó un total de 29 cepas aisladas a partir de la macroalga *Lessonia nigrescens* y los substratos artificiales utilizados en el asentamiento de larvas de ostión (*Argopecten purpuratus*) y abalón (*Haliotis discus hannai*). Además, se realizaron ensayos de antibiosis de los 29 aislados contra una bacteria conocida por producir sustancias inhibitorias (*Vibrio* C33). Los resultados confirmaron la ocurrencia de interacciones antagonistas entre los microorganismos aislados a partir de la microbiota adherida a superficies marinas (20,7%). En ninguna de las 329 pruebas de inhibición, se detectó actividad auto-inhibitoria entre los morfotipos seleccionados. *L. nigrescens* mostró una población microbiana estable con la dominancia de cuatro cepas, siendo una bacteria del grupo β -Proteobacteria (SL5) susceptible a las sustancias inhibitorias producidas en el mismo microhábitat. Actividad inhibitoria entre bacterias aisladas de colectores de ostión fue observada solamente con un *Vibrio* sp. (7,7%). Al evaluar el efecto de la cepa *Vibrio* C33 contra los 29 aislados, detectamos un efecto antibacteriano frente al 53,8% de las cepas aisladas de los colectores de ostión. No se observaron efectos inhibitorios en los ensayos realizados con las cepas aisladas de la macroalga y colectores de abalón. El análisis filogenético de las cepas susceptibles al *Vibrio* C33 mostró que todas las bacterias pertenecen al grupo γ -Proteobacteria. Los resultados indican que la producción de sustancias inhibitorias es un fenómeno común entre bacterias aisladas de biopelículas, causando ventajas competitivas sobre otras bacterias y jugando importante rol en el control de funciones en microhábitat epifíticos.

Palabras clave: antagonismo, biopelículas, bacterias marinas

Abstract.- A study was made of antagonistic relations among benthic bacteria that form biofilms in different marine substrates. A total of 29 strains isolated from the seaweed *Lessonia nigrescens* and artificial substrates used for scallop (*Argopecten purpuratus*), and abalone (*Haliotis discus hannai*) larval settlement were examined for antagonistic activity against other bacteria isolated from the same substrates. Antibiosis assays of all isolates were carried out against a bacterium known to produce inhibitory substances (*Vibrio* C33). The results confirmed the occurrence of antagonistic interactions among microorganisms isolated from microbiota attached to the marine surfaces (20.7%). In the 329 inhibition tests, auto-inhibition activity among the selected morphotypes was not detected. *L. nigrescens* showed a stable bacterial population made up of four dominant strains, with one strain, a β -Proteobacteria (SL5) susceptible to the inhibitory substances produced in the same microhabitat. Inhibitory activity among the bacteria isolated from scallop collectors was observed only with one *Vibrio* sp. (7.7%). Evaluating the effect of strain *Vibrio* C33 against the 29 isolates, we detected a prominent antibacterial effect against 53.8% of the isolates from scallop settlement substrates. Inhibitory effects were not detected in antibiosis assays done on strains isolated from seaweed and abalone collectors. The phylogenetic analysis of the strains susceptible to C33 showed them all to be members of γ -Proteobacteria. Results indicate that production of inhibitory substances is a common phenomenon among bacteria isolated from bacterial biofilms, giving them a competitive advantage over other bacteria and playing an important controlling function in epiphytic microhabitats.

Key words: antagonism, biofilm, marine bacteria

Introducción

Las bacterias marinas han sido consideradas con frecuencia como productoras de sustancias

antibacterianas permitiendo mantener la estabilidad ecológica de los múltiples ecosistemas marinos, como también las interrelaciones entre microorganismos de ambientes epifíticos (Fredrickson & Stephanopoulos

1981, Lemos *et al.* 1985, Fabregas *et al.* 1991). En este contexto, microorganismos marinos, macroalgas y algunos invertebrados han sido descritos como productores de metabolitos biológicamente activos (Stierle *et al.* 1988). Por esta razón, el mundo marino es considerado una enorme fuente de sustancias bioactivas, dentro de las cuales están los agentes antibacterianos. Los mecanismos de acción o competencia entre estos microorganismos son diversos, incluyendo producción de antibióticos, bacteriocinas, sideróforos, lisosomas, proteasas e incluso la alteración de pH a través de la producción de ácidos orgánicos (Hamdan *et al.* 1991, Frey *et al.* 1996).

Los primeros estudios de bacterias marinas productoras de antibacterianos fueron realizados por Rosenfeld & Zobell (1947). Desde entonces, la búsqueda y aislamiento en los ecosistemas marinos de bacterias nativas con actividad antagónica sobre microorganismos patógenos marinos y terrestres, ha sido realizada en diversos hábitat como agua de mar, sedimentos, fitoplancton, vertebrados e invertebrados (Gauthier *et al.* 1976; Toranzo *et al.* 1982, Lodeiros *et al.* 1988, Austin *et al.* 1995, Riquelme *et al.* 1996, 1997). Estas interacciones antagónicas de tipo bacteria-bacteria que involucran la inhibición del crecimiento, corresponden a un mecanismo que puede ayudar a mantener la composición de especies bacterianas a nivel de micro-escala (Long & Azam 2001), ya sea mediante la competición por nutrientes, espacio, luz y/o a través de la producción de diversos metabolitos secundarios, entre ellos sustancias antibacterianas (Fredrickson & Stephanopoulos 1981, Dopazo *et al.* 1988, Lemos *et al.* 1991).

Numerosos son los estudios que han examinado la frecuencia de interacciones inhibitorias de microorganismos aislados de origen marino; la mayoría de ellos se han referido a investigaciones que evalúan el efecto de estas bacterias contra colecciones de bacterias patógenas de peces y moluscos, así como también frente a cepas no marinas patógenas de humanos (Lodeiros *et al.* 1989, Fabregas *et al.* 1991, Riquelme *et al.* 1996, León & García-Tello 1998).

En el caso de comunidades microbianas adheridas a sustratos naturales y artificiales, Armstrong *et al.* (2000) han reportado la existencia de numerosos microorganismos productores de metabolitos bacterianos, los cuales han sido purificados y utilizados para

contrarrestar la colonización de organismos no deseados en superficies sumergidas en ambientes marinos. Sin embargo, estos microorganismos en muchos casos colonizan inevitablemente la superficie de sustratos formando una matriz mucosa que envuelve las bacterias denominada "biofilms" (Keough & Raimondi 1995, Whiteley *et al.* 1997). Estas biopelículas microbianas muestran diferentes grados de colonización en la interfase agua-sustrato (Wienczek & Fletcher 1995), así como numerosas propiedades entre las comunidades microbianas. Sin embargo, la relación antagónica entre las bacterias adheridas que conforman una biopelícula y ocupan un mismo microcosmos, así como el rol de estas bacterias epifíticas contra otras cepas de la microcomunidad, han sido escasamente estudiados.

El presente estudio tiene como objetivo aislar, seleccionar y evaluar actividades antagonistas entre bacterias aisladas de micro-comunidades epifíticas de la macroalga *Lessonia nigrescens* y sustratos artificiales usados en el asentamiento de larvas de ostión (*Argopecten purpuratus*) y abalón (*Haliotis discus hannai*), los cuales han sido descritos previamente como productores de metabolitos biológicamente activos y favorecedores de las interacciones microbianas.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras

La obtención de las muestras se realizó en dos etapas. La primera etapa correspondió a la recolección de ejemplares adultos de *L. nigrescens* en Caleta Errázuriz localizada en el norte de Chile (23°53' S, 70°38' W). Los ejemplares fueron obtenidos mediante selección manual en la zona intermareal y transportados en cajas de aislapol, a 15°C, con esponjas húmedas de polietileno expandido, hasta el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Antofagasta. La segunda etapa fue realizada en el centro de cultivo de la Facultad de Recursos del Mar de la misma institución. Para ello, se seleccionaron colectores de "netlón"® y placas de policarbonato, sustratos artificiales comúnmente utilizados para el asentamiento de postlarvas de ostión y abalón, respectivamente (Bourne *et al.* 1989, Hahn 1989). Además, con el objeto de estimular la colonización de bacterias, los colectores fueron previamente sumergidos, durante 20 días, en agua de mar circulante y filtrada por 10 µm (Avendaño-Herrera *et al.* 2003).

Aislamiento de bacterias

El aislamiento de bacterias en la macroalga se realizó desde la superficie de diferentes láminas de 10 ejemplares de *L. nigrescens*. Trozos de 100 cm² de cada alga fueron lavados repetidas veces con agua de mar estéril, eliminando las bacterias no adheridas y dispuestas en botellas con 50 mL de solución salina marina (SSM). El aislamiento de bacterias de la superficie de mallas de “netlon”® y placas de policarbonato se realizó de acuerdo a la metodología de Avendaño-Herrera *et al.* (2002). Se cortaron veinte mallas de netlon y placas de policarbonato previamente colonizadas por microorganismos en áreas de 100 cm², las cuales fueron lavadas repetidas veces con SSM y los trozos obtenidos fueron dispuestos en botellas con 50 mL de SSM. Las bacterias adheridas a la superficie de las macroalgas y a los sustratos de asentamiento fueron removidas con un homogeneizador ultrasónico (Cole-Parmer) durante 60 s. Alícuotas de 100 µL de las diluciones seriadas de las muestras en SSM se sembraron sobre placas de agar de Soja Trypticaseína (Oxoid) suplementada con 2% NaCl (TSA2), las cuales fueron incubadas a 20°C durante una semana. El criterio utilizado para seleccionar las cepas de este estudio fue la dominancia de los morfotipos crecidos en las placas (Avendaño-Herrera *et al.* 2001, 2002). Los diferentes aislados bacterianos crecidos en las placas de TSA2 fueron congelados a -70°C en caldo de Soja Trypticaseína suplementado con 2% NaCl (TSB, Oxoid) y 10% (v/v) de glicerol.

Bioensayos de la capacidad inhibitoria de las bacterias seleccionadas

Con el objeto de determinar el antagonismo entre las bacterias aisladas que comparten un mismo micro hábitat, las cepas seleccionadas fueron agrupadas de acuerdo a su origen (Tabla 1). Posteriormente, se procedió a realizar ensayos de producción de sustancias inhibitorias mediante el método de doble capa, de Dopazo *et al.* (1988). Para ello, una placa con TSA2 se inoculó con 10 µL de un cultivo “overnight” de la bacteria prueba (A_{625} entre 0,08 a 0,1) e incubó a 20°C durante 24 h. La colonia crecida fue muerta por exposición a vapores de cloroformo por 30 min y cubierta con una doble capa de TSB suplementado con 2% NaCl y 0,9% agar bacteriológico (Oxoid), previamente inoculado con 100 µL de una dilución 1/10 del cultivo “overnight” de la cepa testigo (A_{625} entre 0,08 a 0,1). Después de un período de difusión de 15 a 30 min las placas fueron incubadas a 20°C durante 2 a 4

Tabla 1

Cepas empleadas en este estudio, aisladas de macroalgas y sustratos artificiales de postlarvas de ostión y abalón

Strains used in this study, isolated from seaweed and artificial substrates used for scallop and abalone larval settlement

Substrato de aislamiento	Nº cepas seleccionadas	Código
Láminas de <i>L. nigrescens</i>	4	Alga 1, alga 2, SL5, SBL
Colectores de <i>A. purpuratus</i>	13	A, B, C, FN, FV, FA, 2B, NC1, NC2, NV1, 2C, Ni1, Ni2
Colectores de <i>H. discus hannai</i>	12	C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12
Total	29	

días. La presencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor de la colonia se considero como resultado positivo. El estudio se realizó en triplicado y el grado de inhibición se determinó midiendo el diámetro del halo, considerándose valores mayores a 5 mm como fuerte inhibición. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un ANOVA y a una prueba de comparaciones múltiples LSD (Sokal & Rohlf 1980). Además, se consideró realizar pruebas de antibiosis entre todas las bacterias aisladas y el *Vibrio* C33, el cual ha sido reportado por la producción de sustancias inhibitorias de origen Hidroxi éter alifático sobre el crecimiento de patógenos de moluscos y humanos (Jorquera *et al.* 1999).

Caracterización de las bacterias

Las cepas bacterianas capaces de inhibir el crecimiento de al menos una bacteria, así como las bacterias susceptibles fueron caracterizadas microscópicamente mediante tinción Gram e identificadas a nivel de género mediante sistemas miniaturizados API 20E (BioMérieux) (Hansen & Sørheim 1991). Paralelamente, las cepas fueron caracterizadas filogenéticamente mediante la técnica de hibridización fluorescente *in situ* (FISH) como describe Jorquera *et al.* (2004). Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por Interactiva Co (Ulm, Alemania) y corresponden a:

- i) ALF968 (5'-GGTAAGGTTCTGCGCGTT-3')
- ii) BET42a (5'-GCCTTCCCCTTCGTTT-3')

- iii) GAM42a (5'-GCCTTCCCACATCGTT-3')
(Manz *et al.* 1992)
- iiii) *Vibrio* (5'-AGGCCACAACCTCCAAGTAG-3')
- iiiii) CF319a (5'-TGGTCCGT(G/A)TCTCAGTAC-3')
- (Manz *et al.* 1996)

los cuales se encuentran etiquetados con el fluorocromo indicarcocyanina (CY3). En la preparación de las muestras se utilizaron cultivos "overnight" de las bacterias crecidas en TSB, las cuales se fijaron en una solución de fosfato buffer salino (PBS, pH 7.2) con paraformaldehído 4% (Merck) durante 2 h a 4°C. Un mililitro de cada suspensión fijada fue dispuesto en microtubos de 2 mL y filtrado al vacío (20 kPa) a través de membranas de policarbonato con tamaño de poro 0,22- μm (Poretics Co.). Los filtros con las células fueron lavados con PBS 1X y deshidratados en una batería de alcohol de 50, 80 y 95% por 3 min, respectivamente. La hibridización se realizó colocando los filtros en una cámara húmeda a 46°C durante 90 min. Luego, las células bacterianas fueron expuestas a las sondas de oligonucleótidos en una concentración de 2,5 ng μl^{-1} y a una solución de hibridización (5M NaCl, 2M Tris-HCl pH 7.5; 1% sodio dodecil sulfato, 0,5M EDTA, 35% formamida). Las membranas que contenían las células fueron lavadas dos veces con la solución de hibridización sin formamida e incubadas a 48°C por 30 min. Tras su hibridación, las membranas fueron observadas en un microscopio Olympus BH51 (1000X) y excitadas con una longitud de onda entre 512 a 615 nm.

Diagrama experimental

Para determinar el número de cepas productoras de sustancias inhibitorias de un mismo sustrato, se procedió a realizar pruebas de inhibición entre los microorganismos mediante una matriz factorial como se describe en la Tabla 2.

Tabla 2

Diseño de la matriz factorial para pruebas de inhibición entre bacterias

Factorial matrix design for bacterial inhibition tests

	Bacterias		Testigos
Bacterias	A ₁	A ₂	
A ₁	A ₁₁	A ₁₂	R ₁
A ₂	A ₂₁	A ₂₂	R ₂
	C ₁	C ₂	N

A₁ y A₂ cepas seleccionadas como morfotipos dominantes, R₁ = A₁₁ + A₁₂; C₁ = A₁₁ + A₂₁ corresponden a pruebas de inhibición, N = total de cepas aisladas expuestas a pruebas de inhibición (R₁ + R₂ = C₁ + C₂), A₁₁ y A₂₂ cepas en estudio sometidas a pruebas de auto-inhibición

Un valor denominado "porcentaje de cepas inhibitorias" fue calculado relacionando el número total de cepas con actividad inhibitoria, con el número total de cepas seleccionadas que comparten un mismo micro hábitat. Mientras que el "porcentaje de pruebas inhibitorias" corresponde a la relación entre el número de pruebas de inhibición con resultado positivo y el número total de pruebas realizadas (329 bioensayos).

Resultados y discusión

De un total de 29 morfotipos diferentes de colonias bacterianas aisladas de la población microbiana adherida a la superficie de ejemplares de macroalgas y sustratos artificiales de asentamiento, sólo seis cepas (20,7%) producen sustancias inhibitorias (Tabla 2). Al comparar los resultados con estudios anteriores, se reporta que entre el 5 y 8% de las cepas expresa algún nivel de actividad (Krasilnikova 1961, Okami 1986, Nair & Simidu 1987). Sin embargo, estudios de antagonismo realizados por Long & Azam (2001) con bacterias pelágicas detectaron un 53,5% de actividad, siendo esta característica mas común en las bacterias asociadas a partículas en comparación a las bacterias de vida libre (66,7 y 40,9%, respectivamente). En nuestro estudio, las actividades inhibitorias de las cepas seleccionadas variaron desde simples halos de inhibición de escasos 2 mm hasta potentes antagonismos bacterianos de 30 mm de diámetro. De igual modo, los resultados fueron reproducibles independiente de las réplicas analizadas, no detectándose diferencias significativas entre los halos de las cepas que mostraron actividad inhibitoria ($P > 0,05$).

Un total de 329 pruebas de inhibición fueron realizadas no detectándose actividad de auto-inhibición entre ninguno de los morfotipos seleccionados. Desde la óptica ecológica, el no detectar el fenómeno de auto-inhibición entre las bacterias que conforman las biopelículas permite atribuir la carencia de uno de los mas importantes mecanismos de autorregulación poblacional. Esto difiere con los resultados reportados por Lemos *et al.* (1985) en bacterias epifíticas con actividad inhibitoria aislados de macroalgas verdes y pardas. Este fenómeno de auto-inhibición también ha sido descrito por León & García-Tello (1998) en cepas aisladas del bacterioneuston. Estos autores observaron

que al disminuir la temperatura de incubación de las bacterias estudiadas, se revela un marcado descenso de la actividad inhibitoria y, por el contrario, un incremento del carácter auto-inhibitorio. Lo anterior sugiere que podrían existir factores ambientales que determinan la presencia o ausencia de auto-inhibición; así, a temperaturas mas bajas las bacterias podrían no activar procesos de excreción o resistencia a sus propios productos debido a la carencia de catalizadores para enzimas específicas.

Al examinar la interacción individual entre las bacterias aisladas de *L. nigrescens*, los resultados muestran una microbiota estable y constituida por cuatro cepas dominantes, siendo sólo la cepa SL5 (β -Proteobacteria) susceptible a las sustancias inhibitorias producidas por las otras tres bacterias que comparten su micro-hábitat (Tabla 3). El espectro de actividad inhibitoria es alto y se manifiesta en halos de entre 10 a 12 mm. De acuerdo a la caracterización filogenética de las bacterias, la cepa SBL es miembro de las α -Proteobacteria, mientras que Alga 1 y Alga 2 se agruparon como miembros de β -Proteobacteria.

En general, los porcentajes de bacterias marinas productoras de sustancias inhibitorias en macroalgas muestran valores fluctuantes dependiendo en gran parte del origen de las cepas. Por ejemplo, estudios de producción de sustancias inhibitorias con bacterias aisladas de agua de mar, epibiontes de moluscos, corales, macroalgas y ascidias mostraron que sólo el 3% de las bacterias aisladas de las diferentes fuentes marinas produce inhibición contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio anguillarum*, ambas bacterias descritas como patógenas en organismos acuáticos

(Lodeiros *et al.* 1988). Sin embargo, el mismo grupo de investigadores al estudiar la especificidad entre monocultivos algales y sus poblaciones bacterianas, detectó que el 21% de un total de 206 bacterias es capaz de producir sustancias antibacterianas (Lodeiros *et al.* 1991). Lemos *et al.* (1985), al aislar y caracterizar la producción de antibióticos en bacterias asociadas a macroalgas marinas encontraron que un 16,9% de las cepas producía sustancias inhibitorias frente a un patógeno humano. Lodeiros *et al.* (1988) señalan que la producción de antibióticos en bacterias asociadas a macroalgas es un fenómeno frecuente, ya que de las 24 cepas caracterizadas como productoras de sustancias de naturaleza antibiótica, 9 se aislaron desde algas marinas.

Estudios previos han demostrado que las cepas Alga 1, Alga 2 y SBL se adhieren y forman una biopelícula sobre la macroalga, siendo favorecidas por las características de la superficie de *L. nigrescens* y la liberación de sustancias inhibitorias (datos no publicados). La asociación de estos factores podría interactuar para mantener la dinámica de la población bacteriana en la superficie de *L. nigrescens*, siendo sustentada esta hipótesis por el 75% de susceptibilidad que presenta la cepa SL5 a bacterias que comparten su microcosmos. Es interesante señalar que la cepa SL5 induce el asentamiento de miosporas de *L. nigrescens* (datos no publicados), sugiriendo que las bacterias con actividad antibacterianas regulan la colonización de bacterias heterótrofas en la lámina de la macroalga, manteniendo en los micro-ambientes epífitos un bajo nivel bacteriano y previniendo la colonización de otros epífitos como bacterias, algas e invertebrados marinos.

Tabla 3

Número y porcentaje de cepas bacterianas con actividad inhibitoria aisladas a partir de diferentes substratos marinos

Number and percentage of bacterial strains with inhibitory activity isolated from different artificial marine substrates

Substratos	Nº de muestras	(Cepas con actividad inhibitoria) (Nº total de cepas dominantes)	(Pruebas positivas) (Nº total de pruebas)
Macroalga <i>Lessonia nigrescens</i>	10	3 / 4 (75 %) ^a	3/16 (18,8 %) ^b
Colectores de <i>Argopecten purpuratus</i>	20	1 / 13 (7,7 %)	3/169 (1,8 %)
Colectores de <i>Haliotis discus hannai</i>	20	2 / 12 (16,7 %)	4/144 (2,8 %)
Total		6 / 29 (20,7 %)	10/329 (3,0 %)

^a Porcentaje de cepas con actividad inhibitorias en relación al número total de cepas dominantes

^b Porcentaje de pruebas inhibitorias en relación al número de pruebas realizadas

Boyd *et al.* (1999), al aislar bacterias asociadas a las macroalgas *Fucus serratus*, *Laminaria digitata* y *Codium fragile*, señalan a estas cepas como controladoras de la población microbiana de las algas ya sea mediante mecanismos de inhibición o de repulsión competitiva. Dobretsov & Qian (2002) demuestran que algunas bacterias epibiontes protegen a macroalgas de la colonización de micro y macro incrustaciones, mediante la síntesis de sustancias antimicrobianas. Por otro lado, está bien documentado que las macroalgas presentan mecanismos químicos que protegen su superficie como la secreción de sustancias anti-adhesión liberadas en la interfase agua-alga, las cuales inhiben la colonización bacteriana (Sastry & Rao 1994, De Nys *et al.* 1995, Schmitt *et al.* 1995).

Al evaluar el efecto del *Vibrio* C33 sobre las 29 bacterias seleccionadas en este estudio, se detectó un relevante efecto antagonista sobre el crecimiento del 53,8% de las cepas originarias de substratos de asentamiento de postlarvas de ostión. Sin embargo, los ensayos de antagonismo efectuados sobre cepas aisladas de ejemplares de macroalga y colectores de postlarvas de abalón no detectaron inhibición. El análisis filogenético de las cepas susceptibles al *Vibrio* C33 permite agrupar a todas ellas como miembros de γ -Proteobacteria, concordando con lo señalado por Jorquera *et al.* (2004), quienes han demostrado que este grupo bacteriano es uno de los principales componentes del bacterioplancton asociado con el cultivo de *A. purpuratus*.

Considerando que *Vibrio* C33 es una bacteria asociada a la microbiota nativa de *A. purpuratus* (Riquelme *et al.* 1997), nosotros sugerimos que la cepa *Vibrio* C33 requiere de algún tipo de precursor para la producción y liberación de sustancias inhibitorias, actuando selectivamente sobre bacterias que ocupan su nicho ecológico. McCarthy *et al.* (1994) señalan que la síntesis activa de sustancias antagonistas realizadas por bacterias de géneros y especies relacionadas a su propio nicho ecológico es un fenómeno frecuente. Estudios realizados por Avendaño & Riquelme (1999) demuestran ventajas competitivas del *Vibrio* C33 frente a otras seis bacterias reportadas como antagonistas de *V. anguillarum* (Riquelme *et al.* 1995) cuando son cultivadas en productos extracelulares de la microalga *Isochrysis galbana*. Nosotros hemos detectado que la presencia de los productos extracelulares de la microalga interfiere la producción de metabolitos antibacterianos de tres cepas estudiadas contra *V. anguillarum*. Los antecedentes expuestos evidencian la

posibilidad que en ecosistemas acuáticos las interacciones bacteria-bacteria sean específicas entre especies que co-existen en un microcosmos, provocando un efecto positivo (simbiosis) o negativo (antagonismo), dependiendo de las condiciones del ecosistema (Riquelme & Avendaño-Herrera 2003).

Respecto a la actividad inhibitoria entre las bacterias aisladas de colectores de ostión, sólo se observó antagonismo con la cepa "C" (7,7%). Es importante señalar la alta susceptibilidad de las cepas codificadas como "2B" y "2C" cuando fueron expuesta a pruebas de antagonismo con el *Vibrio* C33 (12 y 30 mm, respectivamente) y a la cepa "C" (10 y 8 mm, respectivamente). La comparación de los halos de inhibición de estas cepas sobre los miembros de γ -Proteobacteria permite sugerir una naturaleza similar de los metabolitos inhibitorios. A nivel genérico, la cepa "C" también pertenece al género *Vibrio*, lo cual no deja de ser interesante, ya que Vibrionaceas productoras de sustancias antagonistas han sido reportadas en escasas ocasiones (Olsson *et al.* 1992, Austin *et al.* 1995, Bergh 1995, Tamaru *et al.* 1995).

Es destacable que ambos microorganismos son componentes constantes y dominantes de la población bacteriana asociada a *A. purpuratus*, siendo demostrado el efecto protector de *Vibrio* C33 contra numerosas bacterias patógenas de cultivos larvales de este organismo (Riquelme *et al.* 1997). Además, otros estudios han demostrado su incorporación, ingesta y colonización del tracto digestivo de larvas y ejemplares adultos de *A. purpuratus* (Avendaño & Riquelme 1999, Riquelme *et al.* 2001, Avendaño-Herrera *et al.* 2001). Por otro lado, ensayos realizados en un criadero comercial de ostión han reportado a la cepa "C" como promotora del asentamiento de postlarvas de *A. purpuratus*, debido a que se encuentra adaptada para adherirse y formar una biopelícula bacteriana sobre netlones de asentamiento de postlarvas de ostión, siendo favorecida por las características del sustrato y su explosivo crecimiento en forma de "swarming" (Avendaño-Herrera *et al.* 2002). La búsqueda, el aislamiento y la caracterización de cepas nativas de biopelículas productoras de sustancias inhibitorias contra otros géneros del mismo hábitat, podrían ser consideradas como una alternativa para biocontrolar la densidad bacteriana mediante el principio de exclusión competitiva (Williams & Vicker 1986, McCarthy *et al.* 1994) y/o producción de sustancias antibióticas (Jorquera *et al.* 1999).

En el caso de las cepas aisladas de sustratos de asentamiento de larvas de abalón se pudo apreciar actividad inhibitoria con las cepas "C2" y "C7" (3,0%), las cuales fueron identificadas como miembros de γ -Proteobacteria y *Cytophaga-Flavobacterium*, respectivamente. Ambas bacterias mostraron una débil actividad inhibitoria, no superando 2 mm de halo y presentan una capacidad inhibitoria recíproca.

La interacción que ocurre entre estos microorganismos aislados a partir de la microbiota asociada a colectores de postlarvas de abalón difiere completamente de lo señalado en bacterias obtenidas desde macroalgas y colectores de ostión. Probablemente, los resultados obtenidos se fundamentan en que *H. discus hannai* no es una especie nativa del ecosistema marino de nuestras costas, y es su primera introducción en el norte de Chile, por lo cual la población microbiana constituyente de las placas de poliestireno quizás sean microorganismos oportunistas con alta capacidad de adherencia.

Los resultados indican que la producción de sustancias inhibitorias es un fenómeno común entre bacterias aisladas de los sustratos estudiados, proporcionando una ventaja competitiva a las bacterias capaces de producirlos sobre las bacterias no-productoras. Esta interrelación de competencia juega un rol de controlador en micro-hábitat epifíticos, como aquellos que pueden formarse en superficie de algas y sustratos artificiales para el asentamiento de postlarvas de especies acuícola.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el proyecto FONDEF-CHILE N° D00I1168.

Literatura citada

- Armstrong E, KG Boyd & JG Burgess. 2000.** Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotechnology Annual Review* 6: 221-241.
- Austin B, LF Stuckey, PA Roberston, I Effendi & DR Griffith. 1995.** A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 18: 93-96.
- Avendaño R & C Riquelme. 1999.** Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research* 30: 893-900.
- Avendaño-Herrera R, M Dekovic & C Riquelme. 2001.** Establecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo y gónada de adultos de *Argopecten purpuratus* en cultivo masivo. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 36: 31-41.
- Avendaño-Herrera R, C Riquelme & F Silva. 2002.** Utilización de biopelículas bacterianas en el asentamiento de larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en un hatchery comercial. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 37: 35-41.
- Avendaño-Herrera R, C Riquelme, F Silva, M Avendaño & R Irgang. 2003.** Optimisation of settlement of larvae *Argopecten purpuratus* using natural diatom biofilms. *Journal of Shellfish Research* 22: 393-399.
- Bergh Ø. 1995.** Bacteria associated with early life stages of halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of pathogenic *Vibrio* sp. *Journal of Fish Diseases* 18: 31-40.
- Bourne N, CA Hodgson & JNC White. 1989.** A manual for scallop culture in British Columbia. Canadian Technology Report Fish Aquatic Science 19: 64-215.
- Boyd KG, DR Adams & JD Burgess. 1999.** Antibacterial and repellent activities of marine bacteria associated with algal surfaces. *Biofouling* 14: 227-236.
- De Nys R, PD Steinberg, P Willemsen, SA Dworjanyn, CL Gabelish & RY King. 1995.** Broad spectrum effect of secondary metabolites from red algae *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling* 8: 259-271.
- Dopazo CP, ML Lemos, J Bolinches, JL Barja & AE Toranzo. 1988.** Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 65: 97-101.
- Dobretsov SV & P Qian. 2002.** Effect of bacteria associated with the green alga *Ulva reticulata* on marine micro-and macrofouling. *Biofouling* 18: 217-228.
- Fabregas J, A Muñoz, A Otero, JL Barja & M Roruaris. 1991.** A preliminary study on anti-microbial activities of some bacteria isolated from the marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1377-1382.
- Fredrickson AG & G Stephanopoulos. 1981.** Microbial competition. *Science* 213: 272-278.
- Frey P, JJ Smith, L Albar, P Prior, GS Saddler, D Trigalet-Demery & A Trigalet. 1996.** Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race of French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 473-479.

- Gauthier MJ. 1976.** *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26: 459-466.
- Hahn KO. 1989.** Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. 348 pp. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Hansen JG & R Sørheim. 1991.** Improved method for phenotypic characterization of marine bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 13: 231-241.
- Hamdan H, DM Weller & LS Thomashow. 1991.** Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3270-3277.
- Jorquera M, C Riquelme, L Loyola & L Muñoz. 1999.** Production of bactericidal substances by a marine *Vibrio* isolated from culture of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture International* 7: 433-448.
- Jorquera M, M Lody, Y Leyton & C Riquelme. 2004.** Bacteria of subclass γ -Proteobacteria associated with commercial *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) hatcheries in Chile. *Aquaculture* 236: 37-51.
- Keough MJ & PT Raimondi. 1995.** Response of settling invertebrate larvae to bioorganic film: effects of different types of films. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 185: 235-253.
- Krasilnikova DN. 1961.** On antibiotic properties of microorganisms isolated from various depths of the world ocean. *Microbiology* 30: 545-550.
- Lemos ML, AE Toranzo & JL Barja. 1985.** Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweed. *Microbial Ecology* 11: 149-163.
- Lemos ML, CP Dopazo, AE Toranzo & JL Barja. 1991.** Competitive dominance of antibiotic-producing marine bacteria in mixed culture. *Journal of Applied Bacteriology* 71: 228-232.
- León J & P García-Tello. 1998.** Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Revista Peruana de Biología* 5: 47-64.
- Lodeiros CJ, E Fernandez, A Velez & J Bastardo. 1988.** Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en la acuicultura. *Boletín Instituto Oceanográfico Venezuela* 27: 63-69.
- Lodeiros C, A Espin, Y Ordaz & C González. 1989.** Actividad antibiótica de bacterias marinas ante bacterias patógenas de humanos. *Acta Científica Venezolana* 40: 254-256.
- Lodeiros C, Campos Y & N Marin. 1991.** Producción de antibióticos por la flora bacteriana asociada a monocultivos microalgales de utilidad en la acuicultura. *Society Natural Science La Salle, Tomo LI 135-136*: 213-223.
- Long RA & F Azam. 2001.** Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4975-4983.
- Manz W, RI Amann, W Ludwig, M Wagner & KH Schleifer. 1992.** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the mayor sub-classes of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 593-600.
- Manz W, RI Amann, W Ludwig, M Wagner & KH Schleifer. 1996.** Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacterium-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142: 1097-1106.
- McCarthy SA, RM Johnson & D Kakimoto. 1994.** Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* Gauthier 1982, 85 isolated from Kniko Bay, Japan. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 426-432.
- Nair S & U Simidu. 1987.** Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2957-2962.
- Okami Y. 1986.** Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microbial Ecology* 12: 65-78.
- Olsson JC, A Westerdahl, P Conway & S Kjelleberg. 1992.** Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) and dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 551-556.
- Riquelme C, G Hayashida, AE Toranzo, J Vilches & P Chavez. 1995.** Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing and epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* 22: 135-141.
- Riquelme C, G Hayashida, R Araya, A Uchida, M Satomi & Y Ishida. 1996.** Isolation of a native bacterial strain scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effect against pathogenic Vibrios. *Journal of Shellfish Research* 15: 369-374.
- Riquelme C, R Araya, N Vergara, A Rojas, M Guaita & M Candia. 1997.** Potential of probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819). *Aquaculture* 154: 17-26.

- Riquelme C, M Jorquera, A Rojas, R Avendaño-Herrera & N Reyes. 2001.** Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192: 11-119.
- Riquelme C & R Avendaño-Herrera. 2003.** Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y su potencial uso en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 725-736.
- Rosenfeld WD & CE Zobell. 1947.** Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of Bacteriology* 54: 393-398.
- Sastry VMVS & GRK Rao. 1994.** Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. *Botánica Marina* 37: 357-360.
- Schmitt TM, ME Hay & N Lindquist. 1995.** Constrains on chemically mediated co-evolution: multiple function for seaweed secondary metabolites. *Ecology* 76: 107-123.
- Sokal R & J Rohlf. 1980.** *Introducción a la bioestadística.* 362 pp. Ed. Reverte S.A., Barcelona.
- Stierle AC, JH Cardellina & FL Singleton. 1988.** A marine *Micrococcus* produce metabolites ascribed to sponge *Tedanis ignis*. *Experientia* 44: 1021.
- Tamaru T, T Araki, H Amago, H Mori & T Morishita. 1995.** Purification and characterization of an extracellular B-1,4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4454-4458.
- Toranzo AE, JL Barja & FM Hetrick. 1982.** Antibacterial activity of antibiotic-producing marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 231-238.
- Whiteley M, E Brown & RJC McLean. 1997.** An inexpensive chemostat apparatus for the study of microbial biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 30: 125-132.
- Wiencek RM & M Fletcher. 1995.** Bacterial adhesion to hydroxyl-terminated methyl-terminated alkanethiol self-assembled monolayers. *Journal of Bacteriology* 177: 1959-1966.
- Williams T & JC Vicker. 1986.** The ecology of antibiotic production. *Microbial Ecology* 12: 43-52.

Recibido en mayo de 2005 y aceptado en octubre de 2005