

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Relaciones Simbióticas y Antagónicas entre *Leptospira saprófita* y
bacterias fotosintéticas**

María Eugenia Mejía Artieda

Tesis para la obtención del Grado de B.S. en Biotecnología

Quito

Mayo de 2007

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Relaciones Simbióticas y Antagónicas entre *Leptospira saprófita* y bacterias
fotosintéticas**

María Eugenia Mejía Artieda

Gabriel Trueba Piedrahita, DMV, M.Sc., Ph.D.

Director de Tesis y Miembro del Comité

María de Lourdes Torres Proaño, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Sonia Zapata Mena, M.Sc

Miembro del Comité de Tesis

Hugo Valdebenito Milling, B.S., Ph.D.

Decano del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, mayo 2007

© Derechos de autor
María Eugenia Mejía Artieda
2007

DEDICATORIA

A Dios por que ha puesto en vida siempre a las personas correctas que me han guiado hasta culminar con éxito mi carrera.

A mis abuelitos que son el pilar sobre el cual se establece mi familia y por quienes tengo unos padres maravillosos que me han apoyado incondicionalmente para cumplir una meta más en mi vida, y de esta manera seguir adelante cumpliendo mis sueños y mis nuevas metas con fuerza y valentía para enfrentar y superar cada obstáculo que se presente en el transcurso de este largo camino que es la vida.

A mi hermana que es mi alegría, mi amiga fiel, por quien debo seguir adelante para que en mi tenga un ejemplo de fuerza y constancia.

A mi novio que siempre ha sido mi apoyo incondicional durante estos años universitarios.

AGRADECIMIENTO

A Dios por siempre estar en el momento preciso.

Mi eterna gratitud a mis abuelitos, mis padres y mi hermana por estar siempre conmigo apoyándome y forjándome como una persona de bien y ante todo responsable.

A mi novio quien ha estado en todo momento incondicionalmente con todo su amor y su paciencia.

Un agradecimiento especial al Dr. Gabriel Trueba y a la Dra. Sonia Zapata por haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto y a todo el equipo de microbiología de la USFQ, quienes me apoyaron en todo momento durante el desarrollo de este proyecto.

Igualmente quiero agradecer a la Dra. María de Lourdes por su apoyo e interés.

Agradezco infinitamente a Verónica Barragán quién me guió y me ayudó incondicionalmente para obtener excelentes resultados en este proyecto.

RESUMEN

El principal objetivo de esta investigación fue determinar las posibles relaciones simbióticas y antagónicas entre *Leptospira* saprofítica y bacterias fotosintéticas identificando el género de estas bacterias mediante técnicas moleculares.

Para este estudio se caracterizó una cepa de *Leptospira* saprofítica y varias cepas de bacterias ambientales, todas aisladas de ríos de la Costa y Oriente ecuatorianos. También se realizó ensayos *in vitro* de co-cultivo de bacterias fotosintéticas y leptospiros saprofíticas, monitoreando la supervivencia de las leptospiros por un período de cuatro meses junto a las bacterias fotosintéticas.

Se determinó que en los ensayos de co-cultivo, ciertas bacterias fotosintéticas permitían la supervivencia de las leptospiros mientras que otras resultaron ser antagónicas logrando que las leptospiros desaparecieran a los pocos días del co-cultivo inicial. Para lograr identificar el género de las bacterias fotosintéticas simbióticas y antagónicas fue necesario utilizar técnicas metagenómicas, amplificando la región V3 del segmento 16S rDNA. De los segmentos amplificados y clonados se obtuvo que las bacterias fotosintéticas pertenecían al género *Sphingomonas* y *Flavobacterium*.

Estos resultados sugieren que las *Sphingomonas* pueden sustentar el crecimiento de leptospiros en el agua. Los mismos pueden ser útiles para investigar la posible multiplicación de leptospiros patógenas en agua.

ABSTRACT

The main goal of this research was to study the symbiotic and antagonistic relationships between saprophytic *Leptospira* and photosynthetic bacterium. For this purpose we characterized a strain of saprophytic *Leptospira*, and several strains of environmental bacteria, all obtained from Ecuadorian rivers.

Co-culture assays were also carried out with photosynthetic bacteria and saprophytic *Leptospira*, in order to find the associations that promote the survival of Leptospires. The experiments were monitorized for a period of four months in distilled water. In some of the co-cultures assays, photosynthetic bacteria seemed to be antagonist, killing leptospires in few days.

It was necessary to use metagenomics techniques to identify the photosynthetic symbiotic bacterial genus by amplifying the V3 region from 16S rDNA gene. According to the obtained data, the photosynthetic bacteria belong to the *Sphingomona* and *Flavobacterium* genus.

These results suggest that some *Sphingomonas* may provide leptospires with suitable environment and nutrients. The results of this research are crucial for the understanding of the replication of pathogenic leptospires in the environment.

1	INTRODUCCION.....	1
1.1	Generalidades del género <i>Leptospira</i>	1
1.2	Clasificación del género <i>Leptospira</i>	1
1.3	Epidemiología de la Leptospirosis.....	2
1.4	Leptospiras saprófitas vs. leptospiras patógenas.....	3
1.5	Simbiosis bacteriana.....	4
1.5.1	Comunidades Bacterianas, Simbiosis e identificación de microorganismos.....	5
1.6	Técnicas metagenómicas.....	6
1.7	Identificación del segmento 16S rRNA en bacterias	7
2	JUSTIFICACION.....	9
3	OBJETIVOS.....	11
4	AREA DE ESTUDIO.....	11
5	MATERIALES Y METODOS.....	12
5.1	Materiales.....	12
5.2	Métodos.....	15
5.2.1	Cultivo de <i>Leptospira</i>	15
5.2.2	Cultivo de bacterias fotosintéticas.....	16
5.2.3	Co-cultivo de Leptospiras con bacterias fotosintéticas y conteo inicial de supervivencia de <i>Leptospira</i>	16
5.2.4	Aislamiento y cultivo de bacterias fotosintéticas favorables y antagónicas.....	17
5.2.5	Extracción DNA de bacterias fotosintéticas y <i>Leptospira</i>	18
5.2.6	Amplificación 16S rDNA de bacterias fotosintéticas favorables, antagónicas y de <i>Leptospira</i> por PCR.....	19
5.2.7	Inserción de los productos de PCR en el vector TOPO TA clonng y transformación.....	20
5.2.7.1	Extracción de plásmido sin kit.....	21
5.2.7.2	Corte de plásmido.....	22
5.2.7.3	Extracción de plásmido con kit.....	22
5.2.7.4	Conservación de colonias con inserto.....	23
5.2.8	Envío de muestras para secuenciar.....	24
6	RESULTADOS.....	25
6.1.	Cultivo bacterias fotosintéticas.....	25
6.2.	Co-cultivo de <i>Leptospira</i> con bacterias fotosintéticas.....	25
6.3.	Aislamiento y cultivo de bacterias fotosintéticas favorables y antagónicas.....	25
6.4.	Extracción DNA de bacterias fotosintéticas	26

6.5. Amplificación DNA de bacterias fotosintéticas favorables, antagónicas y de <i>Leptospira</i> por PCR.....	27
6.6. Inserción de los productos de PCR en el plásmido, transformación y extracción del plásmido.....	27
6.7. Secuenciamiento	28
7 DISCUSION.....	31
8 CONCLUSIONES.....	34
9 RECOMENDACIONES.....	35
10 BIBLIOGRAFIA.....	36
11 TABLAS.....	38
Tabla 1:Nombre de río y número de cultivos.....	38
Tabla 2:Cronograma de co-cultivos.....	39
Tabla 3: Número de co-cultivos con leptospiras viables.....	40
Tabla 4: Número de co-cultivos con bacterias fotosintéticas antagónicas.....	40
Tabla 5: Género bacteriano de las bacterias fotosintéticas antagónicas.....	41
Tabla 6: Género bacteriano de las bacterias fotosintéticas favorables.....	42
Tabla 7: <i>Leptospira</i> secuenciada.....	42
12 FIGURAS.....	43
Figura 1:Cultivo primario de leptospiras.....	43
Figura 2:Colonias aisladas de bacterias fotosintéticas.....	43
Figura 3: Co-cultivo in Vitro de bacterias fotosintéticas con leptospiras.....	44
Figura 4: Amplificación de DNA de bacterias fotosintéticas favorables utilizando puRe Taq- To-Go PCR Beads® y primers 16SV3r y 16SV3f.....	45
Figura 5: Muestras de plásmidos cortados y sin cortar de bacterias fotosintéticas antagónicas.....	46
Figura 6: Muestras de plásmidos cortados de bacterias fotosintéticas favorables que presentan el inserto	47
Figura 7: Árbol filogenético de bacterias fotosintéticas antagónicas.....	48
Figura 8: Árbol filogenético de las bacterias fotosintéticas favorables agrupadas de acuerdo a su homología más cercana con los diferentes tipos de <i>Sphingomonas</i>	49
Figura 9: Árbol filogenético de las bacterias fotosintéticas favorables.....	50
Figura 10: Árbol: Árbol filogenético de <i>Leptospira</i>	51
13 ANEXOS.....	50

1. INTRODUCCION

1.1. Generalidades del género *leptospira*

La familia Leptospiraceae, está constituida por tres géneros *Leptospira*, *Leptonema*, y *Turneria* (Faine S, 1999). El género *Leptospira* comprende espiroquetas delgadas con extremos (uno o ambos) pueden estar doblados en forma de un signo de interrogación. El tamaño de las leptospiras varía entre los 6 y 20 μm de largo por 0.1 μm de ancho, y poseen dos endoflagelos para movilizarse (Madigan, 2000, Levet, 2001), (Anexo 1).

Son bacterias que se caracterizan por ser aerobias obligadas a una temperatura óptima entre los 28 y 30 °C, son Gram negativas poseen una doble membrana separada por un espacio periplásmico, y en la membrana externa se encuentra el lipopolisacárido (LPS), con una composición similar a otras bacterias Gram negativas, pero de baja actividad endotóxica. Requieren de ácidos grasos de cadena larga como única fuente de carbono, vitamina B1 y B12 como factores de crecimiento, generalmente su crecimiento es lento pero en condiciones óptimas se duplican cada 6 u 8 horas. Además, las leptospiras son catalasa y oxidasa positivas (Levet, 2001).

Las leptospiras son las únicas espiroquetas patógenas que pueden vivir en el medio ambiente, fuera de un organismo vivo, a diferencia de otras espiroquetas patógenas como *Treponema pallidum* o *Borrelia burdoferi* que son los agentes que causan la sífilis y la enfermedad de Lyme respectivamente (Vinetz, 2001).

1.2. Clasificación del género *Leptospira*

Hasta 1989 el género fue clasificado en dos especies *L. interrogans* en la cual se incluían a todas las especies patógenas y *L. biflexa* que abarca las cepas que son saprofitas, y que se encuentran en el medio ambiente. Originalmente se distinguió a *L. interrogans* de *L. biflexa*, por un lado, porque, *L. biflexa*, es capaz de crecer en menor tiempo aproximadamente de 4 a 7 días tanto a 13°C, como en presencia de 8-azaguanina; a diferencia de *L. interrogans* que se demora en crecer de 4 a 5 semanas

bajo las mismas condiciones (Noubade, 2002). Por otro lado, está la tendencia de *L. interrogans* de formar células esféricas cuando se encuentra en una concentración de NaCl 1M (Levet 2001). Ambas especies están constituidas por más de 250 serovariedades y éstas a su vez han sido clasificadas en serogrupos (Faine S., 1999; Levet 2001).

Existe una nueva clasificación que se basa en estudios de la secuencia del ADN, con la cual se han definido 16 genoespecies de *Leptospira*, obteniendo una clasificación totalmente diferente a la anterior debido a que tanto serovariedades patogénicas y no patogénicas pueden encontrarse dentro de una misma especie (Levet, 2001).

Pero la clasificación que se mantiene es la serológica porque revela la diversidad antigénica de la *Leptospira*, aunque no tiene importancia taxonómica es de gran aporte en el campo de diagnóstico y el epidemiológico, para evitar confusiones se utiliza los términos *sensu lato* (clasificación serológica) y *sensu stricto* (clasificación genómica), (Levet, 2001).

1.3. Epidemiología de la Leptospirosis

La leptospirosis es una zoonosis causada por la infección con especies patógenas de *Leptospira*. La fuente de infección en el ser humano es el contacto directo o indirecto con orina de animales infectados, (Anexo 2). La mayor incidencia se da en las zonas tropicales por su temperatura cercana de los 30 °C (Faine S., 1999).

De acuerdo con Faine S., 1999 existen tres patrones epidemiológicos en la leptospirosis. El primero ocurre en climas templados donde están involucrados pocos serovares y la infección humana ocurre invariablemente por el contacto directo con animales infectados. El segundo caso ocurre en zonas tropicales húmedas donde existen más serovares que pueden infectar personas, animales y un gran número de reservorios incluyendo roedores y animales domésticos; la exposición humana no está limitada

solamente a la ocupación sino también a la contaminación ambiental especialmente durante la estación lluviosa. Y el tercer caso comprende la leptospirosis urbana que está asociada principalmente a la transmisión por roedores y perros como reservorios potenciales.

Actualmente la leptospirosis es considerada como una enfermedad infecciosa emergente, debido a que, en los últimos años se han presentado gran cantidad de brotes en Centro y Sur América, Asia, Estados Unidos, y en zonas rurales como en urbanas (Levet, 2001).

La bacteria ingresa al organismo a través de lastimaduras en la piel o a por la conjuntiva del ojo, los brotes se han dado por contacto prolongado de la piel con agua, inhalación o contacto de las mucosas y el tracto respiratorio por aerosoles de agua contaminada.

La supervivencia de la bacteria en el medio ambiente esta dada por varios factores como son: pH, temperatura y presencia o ausencia de compuestos inhibidores. Por esta razón la tasa de transmisión de la enfermedad depende mucho de los factores climáticos, densidad poblacional, y de el grado de contacto entre huéspedes de mantenimiento y accidentales (Levet, 2001).

1.4. Leptospiras saprófitas versus leptospiras patógenas

Leptospira biflexa fue la primera en ser descrita, y por mucho tiempo ésta fue ignorada. Años antes de que las leptospiras patogénicas fueran descubiertas, se pensaba que estas evolucionaron de las leptospiras de vida acuática libre, la cual desarrollaba su patogenicidad al ingresar en un animal. Luego de varios experimentos se determinó que solo las leptospiras patógenas son las responsables de infectar al humano y a los animales, porque las leptospiras avirulentas al llegar al torrente sanguíneo son rápidamente destruidas por fagocitosis, a diferencia de las patógenas que crecen en

forma exponencial en la sangre y en los tejidos por que evaden a los fagocitos (Faine, 1999).

Con el avance de la microbiología se ha ido descubriendo que las leptospiras patógenas pueden vivir tanto en agua, como en suelo húmedo, en lodo e incluso en el agua potable. La diferencia entre las leptospiras saprofíticas llamadas *L. biflexa sensu lato*, y las leptospiras patógenas llamadas *L. interrogans sensu lato*, hasta la actualidad no está muy claro pero generalmente, las leptospiras patógenas han sido aisladas de la orina de animales, incluyendo humanos y de agua limpia o estancada, a diferencia de las leptospiras saprofíticas que únicamente han sido aisladas del agua o del suelo húmedo (Johnson, 1970; Terpstra WJ, 2006).

El análisis de DNA ha facilitado la identificación de especies, confirmando de una manera más rápida las genopecies de leptospiras y su relación filogenética. (Ramadass, 1992).

1.5. Simbiosis bacteriana

Simbiosis es una íntima interacción entre 2 poblaciones, que permite a los organismos sobrevivir en un medio en el cual solos no lo lograrían y siendo al menos una población la beneficiada (Handelsman, 2004).

1.5.1. Comunidades bacterianas, simbiosis e identificación de microorganismos

Han pasado 3.500 millones de años y la existencia de los organismos superiores depende de los complejos bacterianos. La manera en que las bacterias resuelven sus requerimientos alimenticios para sobrevivir en un medio adverso aún es un misterio.

Se conoce que las bacterias no realizan esfuerzos individualmente, bajo condiciones naturales utilizan una comunicación química para formar comunidades, ya que al actuar juntas pueden usar las fuentes de energía disponibles en cualquier tipo de medio ambiente, y en un entorno hostil cuando las probabilidades de sobrevivencia son mínimas, éstas tienen que lograr adaptarse al medio rápidamente actuando colectivamente (Jacob, E. et al. 2004).

Generalmente se agrupan formando biofilms, constituyendo agregados de células, creando consorcios en los cuales interactúan con cierto grado de libertad, debido a que cada especie bacteriana posee una tarea específica, la cual beneficia a toda la comunidad. Esta agrupación se mantiene gracias a la comunicación bioquímica y celular, para intercambiar importante información entre colonias de especies diferentes e incluso con otros organismos. Estas estructuras bacterianas son morfológica y fisiológicamente diferentes a las colonias cultivadas en medios artificiales. (Davies, 1998).

Los biofilms pueden estar formados por poblaciones de una sola especie o por una comunidad proveniente de varias especies bacterianas, generando productos extracelulares que permiten su mantenimiento en superficies bióticas y abióticas (Davey, 2000).

En efecto, los biofilms proveen un ambiente ideal para que las bacterias establezcan relaciones simbióticas, en las cuales, 2 o más tipos de microorganismos metabólicamente diferentes dependen uno del otro y de ciertos sustratos producidos por éstos para producir energía. Para entender el comportamiento bacteriano y la formación de comunidades es necesario realizar una identificación y cuantificación de los miembros que integran estos complejos bacterianos, para esto se utilizan varias técnicas: de cultivo, moleculares y metagenómicas (Davey, 2000).

Estas poblaciones bacterianas son generalmente estudiadas mediante la identificación del segmento 16S rDNA presente en los microorganismos, para esta identificación se toman muestras de las comunidades bacterianas, de las cuales se extrae DNA, posteriormente mediante el uso de la técnica de PCR se amplifica específicamente el segmento deseado utilizando primers determinados. Estos segmentos amplificados son insertados en plásmidos y clonados, para obtener varias colonias bacterianas con el inserto deseado, finalmente se extrae el DNA del plásmido y se lo secuencía, obteniendo de esta manera el género de las bacterias que integran una determinada comunidad bacteriana (Handelsman, 2004).

1.6. Técnicas metagenómicas

Este proyecto se basó en el uso de técnicas metagenómicas para la identificación de géneros bacterianos presentes en cultivos de bacterias ambientales.

La metagenómica es un campo nuevo de investigación genética el cual busca obtener secuencias del genoma de diferentes microorganismos que componen una comunidad, extrayendo y analizando su DNA de forma global. Este DNA representa todos los genomas de las bacterias que conforman la población. (Sebat et al., 2003).

Es así como la metagenómica se convierte en una herramienta útil para acceder a la elevada biodiversidad de microorganismos ambientales no cultivables en medios artificiales (Sebat et al, 2003; Handelsman, 2004).

1.7. Identificación general del segmento 16S rRNA en bacterias

El ARN ribosómico (rRNA) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en la visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Handelsman, 2004).

La secuencia del rRNA 16S provee una medida de la semejanza genómica que permite hacer comparaciones de parentesco entre especies de todo el dominio bacteriano y por lo tanto establecer su relación taxonómica. Las especies bacterianas cercanamente relacionadas a menudo tienen secuencias de rRNA similares.

Entre las características principales se tiene que los genes que codifican para el RNA ribosomal son funcionalmente constantes, no son transferidos horizontalmente, se encuentran distribuidas universalmente y sus secuencias son moderadamente conservadas en la mayoría de los organismos, debido a que es una molécula muy antigua presente en las bacterias actuales, constituyendo una diana universal para su identificación (Rodicio, 2004).

En este proyecto se realizaron ensayos in vitro de co-cultivo de leptospiros junto a bacterias fotosintéticas para demostrar una posible relación simbiótica o antagónica entre estas bacterias.

Para identificar el género de las bacterias fotosintéticas simbióticas o antagónicas de *Leptospira* fue necesario recurrir al uso de técnicas metagenómicas que involucraron: extracción de DNA de cultivos puros de estas bacterias, amplificación por PCR de la región V3 del segmento 16S rDNA, (Anexo 3), inserción de este segmento a un vector plásmido PCRII, transformación de estos plásmidos en células competentes de *E. coli*, siembra de estas células en medios selectivos de modo que solo las células portadoras de estos vectores pueden crecer, selección de colonias lactosa negativas

debido a que estas deberían contener el inserto, extracción de plásmido de estas colonias, liofilización y envío de muestras a MACROGEN para su secuenciamiento.

2. JUSTIFICACION

Se decidió realizar este estudio por varias razones. Primero, porque la leptospirosis es una de las zoonosis más difundidas en el mundo, por lo tanto tiene importancia

económica como sanitaria ya que afecta tanto al hombre como a los animales silvestres y domésticos.

La repercusión económica más importante se da en la ganadería debido a que la leptospirosis afecta la reproducción del ganado, causando abortos, nacimientos de animales débiles e infertilidad, dejando una secuela crónica de la enfermedad en las reproductoras. (Ellis, 1994).

Los países tropicales y subtropicales son los más afectados por sus condiciones climáticas como: precipitación de lluvias, aumento de caudal de ríos, temperatura y humedad relativa así como el pH y la composición del suelo son factores favorables para que la leptospirosis se presente. (Levet, 2001)

Además el agua ha sido identificada como un vehículo de transmisión de leptospiras debido a su permanencia en esta por periodos de tiempo prolongados, pero los factores involucrados no han sido estudiados (Trueba et al., 2002).

En Latino América en los últimos años se han reportado con mayor frecuencia casos de leptospirosis, debido a la presencia del fenómenos climáticos como el Niño (Levet, 2001), el cual incrementa el flujo de lluvias, elevando el caudal de los ríos, inundando ciudades y propagando esta espiroqueta entre animales y humanos.

De acuerdo con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador durante fenómeno del Niño en el año 1998 en el mes de enero surgió un brote epidémico que comenzó en la provincia Guayas luego de unas lluvias torrenciales. En octubre de ese mismo año se reportaron 338 casos confirmados de leptospirosis con 19 personas fallecidas en varias provincias de la Costa ecuatoriana. En la ciudad de Guayaquil se notificaron 152 casos sospechosos de leptospirosis. De los pacientes hospitalizados, 52 casos (68%) dieron positivo a la enfermedad y 40% de los pacientes tenían anticuerpos contra varios

serogrupos. Este aumento de casos se atribuyó a que la población estuvo expuesta a agua de inundación contaminada con orina animal (Ministerio de Salud Pública, 1998).

El propósito del presente estudio fue recrear in vitro el proceso de simbiosis o antagonismo de *Leptospira* saprofítica junto a bacterias fotosintéticas las cuales podrían ayudar a ésta a permanecer en el agua. En el Ecuador este es el primer estudio realizado sobre las relaciones entre leptospiras y otras bacterias.

Este estudio se inició con leptospiras saprofíticas debido a su fácil manipulación por no ser virulentas, además al estar estas bacterias generalmente más adaptadas al agua su interacción con bacterias fotosintéticas se generaría de una manera más rápida.

Posteriormente una vez determinado el género de las bacterias fotosintéticas simbiotes o antagonistas la investigación continuaría pero con leptospiras patógenas.

De esta manera se podría determinar si mantienen un patrón de comportamiento similar a las saprofíticas, entablando las mismas interacciones bacterianas para prolongar su permanencia en superficies acuáticas hasta encontrar hospedadores animales infectándolos y propagando la leptospirosis.

3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo general

Determinar las posibles relaciones de simbióticas y antagónicas entre una cepa de *Leptospira* saprofítica aislada de la provincia de Esmeraldas del río Santiago y cepas de bacterias fotosintéticas aisladas del Oriente Ecuatoriano de los ríos Jondachi,

Misahualli, Napo en la provincia del Napo y de la provincia de Esmeraldas, del río Santiago.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterización de la cepa de *Leptospira* aislada del río Santiago haciendo uso de técnicas moleculares.
- Aislar cepas de bacterias fotosintéticas de los ríos anteriormente mencionados utilizando técnicas microbiológicas convencionales.
- Realizar ensayos de co-cultivo de leptospiros con bacterias fotosintéticas.
- Identificar mediante el uso de técnicas metagenómicas el género de las bacterias fotosintéticas simbióticas y antagónicas.

4. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de agua fueron recolectadas de los ríos Jondachi, Misahualli, Napo pertenecientes a la provincia del Napo y del río Santiago perteneciente a la provincia de Esmeraldas para aislar bacterias ambientales. La cepa de *Leptospira* fue aislada previamente del río Santiago de la provincia de Esmeraldas. La amplificación, transformación y clonación de las bacterias fotosintéticas se efectuó en el Laboratorio de Biología Molecular de la USFQ y el secuenciamiento de las muestras se hizo en MACROGEN, USA.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Cultivo *Leptospira*

- Medio EMJH que consta de: Medio Basal = NH_4Cl ; Piruvato de Sodio; Tiamina; Glicerol; NaCl ; NH_4Cl ; KH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 . Suplemento de Albúmina =

FeSO₄; ZnSO₄ · 7H₂O; MgCl₂ · 6H₂O; BSA; CaCl₂ · 2H₂O; Tween 80; Cianocobalamina (vitamina B12).

- Agua Bidestilada

5.1.2. Cultivo bacterias fotosintéticas:

- Medio BG-11 que consta de: NaNO₃; K₂HPO₄ o Na₂HPO₄; MgSO₄ · 7H₂O; CaCl₂ · 2H₂O; Acido cítrico; Citrato de amonio férrico; EDTA (0.5 M, pH 8, 186.1 g disodium EDTA aforar a 800ml de agua); NaCO₃; Mix A5 (mix de metales) consta de: H₃BO₃; MnCl₂ · 4H₂O; ZnSO₄ · 7H₂O; NaMoO₄ · 2H₂O; CuSO₄ · 5H₂O; Co (NO₃)₂ · 6H₂O.
- Agar
- Agua destilada
- Agua de los ríos del Oriente Ecuatoriano de la provincia de Napo: Napo, Jondachi, Misahualli y de la provincia de Esmeraldas, el río Santiago

5.1.3. Co-cultivo de *Leptospiras* con bacterias fotosintéticas

- Cultivo puro de *Leptospira*
- Colonias aisladas de bacterias fotosintéticas en medio BG-11 sólido
- Agua bidestilada estéril

5.1.4. Conteo inicial de supervivencia de *Leptospira* luego del co cultivo

- Cámara de Petroff Hauser
- Microscopio de fase oscura

5.1.5. Extracción DNA de bacterias fotosintéticas y *Leptospira*

- DNAzol (Invitrogen)
- TE (10X: 100 mM Tris Cl (pH 7.6); 100 mM EDTA pH 8)

5.1.6. Amplificación 16S rDNA de bacterias fotosintéticas favorables, antagónicas y de *Leptospira* por PCR

- Pure Taq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences) 25µM muestra total
- Agua destilada estéril
- DNA de la extracción de las bacterias fotosintéticas y de la *leptospira*
- DNA control de E. coli
- Primers para amplificar región V3 que corresponde a la región 16S rDNA
- Primer Foward: 16SV3f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')
- Primer Reverse: 16SV3r (5'-ATTACCGCGGTGCTGG-3')
- Termociclador (Biometra)

5.1.6.1. Comprobación de la presencia de DNA y de la amplificación del segmento 16S

- Gel de agarosa 0.8%
- Cámara de electroforesis (Maxicell Ec 360M)
- TBE (5X: 54gr Tris base, 27.5 ácido bórico, 20 ml de 0.5M EDTA en 1lt de agua)
- Buffer de carga (20% ficol en agua $\frac{3}{4}$ del volumen, 0,196 de azul de bromofenol,)
- Ladder 100 bp (invitrogen)
- Muestras de DNA amplificado de bacterias fotosintéticas y *Leptospira*

5.1.7. Inserción en el plásmido

- TOPO TA cloning kit (que incluye solución de sales, vector TOPO)
- Producto PCR fresco de DNA de bacterias fotosintéticas

5.1.7.1. Transformación

- Transforming One Shot TOP 10 Competent Cells kit (Invitrogen) (que incluye, tubos con células *E. coli* competentes, medio S.O.C.)

- Baño de arena a 42°C (transformación química)
- Medio LB + Kanamicina
- 40mg/ml de XGAL
- MKL (para cepario de colonias transformadas)
- Agar nutritivo (para sembrar masivamente y extraer plásmido)

5.1.7.2.Extracción plásmido

- TE estéril
- 0.2M NaOH-1% SDS (lisis para romper membranas)
- Acetato de potasio
- Etanol 100%
- Etanol 75%
- Para secuenciar se extrajo con el siguiente kit: S.N.A.P Miniprep kit (Simple Nucleic Acid Prep.).

5.1.7.3.Corte de plásmido

- Enzima EcoRI
- Buffer de reacción
- DNA

5.1.7.4.Conservación de colonias con inserto

- BHI o LB + Glicerol

5.1.8. Envío de muestras para secuenciar

- Liofilizador (Biometra)
- Producto de PCR en caso de *Leptospira*
- DNA de extracción de plásmido de bacterias fotosintéticas

5.2. Métodos

5.2.1. Cultivo de *Leptospira*

El cultivo inicial comenzó el 12 de octubre del 2005 en el Laboratorio de Microbiología de la USFQ, para esto se tomó muestras de *Leptospira* que había sido aislada del río Santiago el cual se encuentra en la provincia de Esmeraldas y que aún no estaba sido bien caracterizada pero por resultados preliminares de PCR se la clasificó como una *L. biflexa*. Para cultivarla se utilizó el medio EMJH (Levet, 2001).

Para preparar 1 litro del medio se pesó 2.3 g de medio basal EMJH y se lo disolvió en 900ml de agua bidestilada, posteriormente se midió el pH que debía estar en 7.4, luego se mandó a autoclavar. Una vez frío en condiciones asépticas se adicionó 100 ml de suplemento de albúmina y se procedió a repartir en tubos estériles de 10 ml y en frascos de 250 ml en los cuales se colocó 50 ml de medio para un posterior cultivo masivo, el medio ya repartido se lo conservó a temperatura de refrigeración. Se realizó un cultivo primario en tubos con 10 ml de medio EMJH, se inoculó 1ml de *Leptospira* en cada tubo y se los dejó en la incubadora a 30°C, durante 10 días, (Figura 1).

Descontaminación de cultivos y cultivo masivo: para descontaminar los cultivos se filtró con una jeringa y un filtro de nitrocelulosa milipore 0.22 um (TM) por donde solo pueden pasar las leptospiras. Después de obtener un crecimiento sin contaminación en los tubos, se procedió a realizar el cultivo masivo en los frascos de 250ml. Para el cultivo masivo, se vertió en los 50 ml de medio EMJH, el tubo con cultivo puro de *Leptospira*, dentro de la cámara de flujo, y se incubó a 30°C.

5.2.2. Cultivo bacterias fotosintéticas

Las bacterias fotosintéticas fueron aisladas de muestras de agua recolectas en frascos estériles de los ríos Santiago, Jondachi, Misahualli. Para aislar las bacterias fotosintéticas se preparó el medio específico BG-11. Antes de preparar el medio se midió el pH del agua la cual debía tener un pH de 7.1, se repartió el medio en tubos

estériles de 10 ml hasta completar 500 ml de medio repartido, a los otros 500 ml se colocó 50 gr. de agar y luego se autoclavó.

En los tubos con medio líquido BG-11 se colocó 2 ml de las muestras de agua recolectadas, en el medio sólido se colocó una gota de agua por caja y se estrió para obtener colonias aisladas, (Figura 2), posteriormente se colocó los tubos y las cajas petri a temperatura ambiente y bajo luz blanca para estimular el crecimiento de las bacterias fotosintéticas.

Luego de un mes de incubación se tomó diferentes colonias verdes posibles fotosintéticas, a estas colonias se las cultivó en medio líquido y sólido para tratar de obtener un cultivo axénico de bacterias fotosintéticas.

5.2.3. Co-cultivo de *Leptospiras* con bacterias fotosintéticas y conteo inicial de supervivencia de *Leptospira*.

Se procedió a lavar el cultivo masivo de *Leptospira* centrifugándolas a 15000 rpm, por cinco minutos, el sobrenadante fue eliminado, de esta manera se obtuvo células libres de medio, posteriormente fueron resuspendidas en 9ml de agua bidestilada estéril y co-cultivadas con el cultivo axénico de bacterias fotosintéticas libres de medio de cultivo BG11, los tubos con co-cultivo fueron colocados bajo luz blanca, a temperatura ambiente, (Figura 3), y se los monitoreó aproximadamente cada cinco días para evitar contaminación.

La viabilidad de las leptospiras resuspendidas se observó en el microscopio de campo oscuro, una vez realizado el co-cultivo se empezó un conteo inicial del número de leptospiras para monitorear la supervivencia de éstas. Para el recuento se utilizó una cámara de Petroff Hauser y se realizó la técnica de contaje directo, la cual consiste en contar el número de células de una población bacteriana. Se tomaron 10 cuadros al azar según la escala Z, utilizando la siguiente fórmula:

$$X \text{ Media} = \sum n \text{ bacterias}/10$$

$$Z = n \text{ bacterias contadas (media)} * 400 * 50 * 100$$

Con ésta técnica se realizó el monitoreo inicial para observar si el número de leptospiras aumentaba, disminuía o se mantenía. Aproximadamente se monitoreó de esta manera por cuatro meses, hasta determinar si existía supervivencia de leptospiras.

5.2.4. Aislamiento y cultivo de bacterias fotosintéticas favorables y antagónicas

Luego de monitorear los co-cultivos por un período de 4 meses, se tomaron muestras de las bacterias fotosintéticas de los co-cultivos en los cuales se observó permanencia y viabilidad de las leptospiras.

De igual manera se lo hizo con los co-cultivos en los cuales a partir de los 3 días de iniciado el ensayo las leptospiras murieron, quedando solo las bacterias fotosintéticas sin contaminación alguna, a estas bacterias se las consideró antagónicas para la supervivencia de las leptospiras. Los tubos que presentaron contaminación con otro tipo de bacterias se los descartó.

Para evitar cualquier tipo de contaminación, todo el proceso se lo realizó dentro de la cámara de flujo laminar, se procedió a introducir un hisopo estéril para tomar una muestra de las bacterias fotosintéticas y se sembró en placas con medio BG-11 sólido utilizando la técnica de estriado para aislar colonias.

Las colonias que crecieron de forma aislada se las volvió a sembrar en BG-11 sólido pero como cultivo masivo en toda la placa sin estriar, para proceder a realizar la extracción de DNA, después de 3 semanas hasta observar crecimiento en las placas.

5.2.5. Extracción DNA de bacterias fotosintéticas y *Leptospira*

Se realizó extracción de DNA de las bacterias fotosintéticas que resultaron ser antagónicas y favorables. La extracción de DNA de las bacterias fotosintéticas favorables y antagónicas se realizó con DNAzol®, siguiendo el protocolo descrito por

el fabricante (invitrogen). Para esto se tomó 1000 µl de DNAzol®, se colocó en las cajas de cultivo masivo y se homogenizó.

El sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 µl, posteriormente se procedió a precipitar el DNA adicionando 500µl de etanol 100%, se invirtió varias veces los tubos y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos, luego de este tiempo se observó en la superficie del tubo el DNA precipitado, con la punta de la pipeta se retiró el DNA y se lo transfirió a otro tubo. Finalmente se realizó 3 lavados con etanol 75%, se centrifugó el DNA a 1000rpm por 1minuto, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 15 minutos. Para resuspender el DNA se adicionó de 200 a 300 µl de TE estéril, de acuerdo al tamaño del pellet, finalmente una vez diluido el pellet se guardó las muestras a – 20°C.

Para la extracción de DNA de leptospiras se tomó un tubo con cultivo puro y de este se cogió 1ml y se colocó en tubos eppendorf, se centrifugó, descartando el sobrenadante y dejando el pellet, se adicionó 500 µl de DNAzol® y se siguió el mismo protocolo de extracción utilizado para las bacterias fotosintéticas.

Para comprobar que la extracción de DNA fue exitosa se realizó electroforesis, con un gel de agarosa al 0.8%, una vez determinada la presencia de DNA se procedió a realizar la amplificación de las muestras.

5.2.6. Amplificación 16S rDNA de bacterias fotosintéticas favorables, antagónicas y de *Leptospira* por PCR

La amplificación de DNA se lo realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se amplificó el segmento 16S rDNA utilizando los primers 16SV3f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 16SV3r (5'-ATTACCGCGGTGCTGG-3'), estos primers amplifican la región correspondiente al segmento 16S rDNA que corresponde a la posición 341 a la 534 en *E. coli* (Muyzer et

al., 1993). El PCR se lo realizó utilizando los tubos de Pure Taq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences).

Para el PCR de las bacterias fotosintéticas en cada tubo eppendorf Pure Taq Ready-To-Go se añadió: 18µl dH₂O; 2.5µl 16SV3f; 2.5µl 16SV3r; 2µl DNA bacterias fotosintéticas; obteniendo un volumen final de 25 µl.

En cambio para el PCR de DNA de *Leptospira* en cada tubo eppendorf Pure Taq Ready-To-Go se añadió: 20.5µl dH₂O; 2µl 16SV3f; 2µl 16SV3r; 0.5µl DNA de *Leptospira*; obteniendo un volumen final de 25 µl.

Las condiciones programadas en el termociclador para el PCR fueron las mismas tanto como para las bacterias fotosintéticas como para la *Leptospira*: 94°C por 4 minutos para la denaturación inicial, seguido por 40 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, el primer annealing a 54°C por 30 segundos, la elongación a 72°C por 30 segundos y la extensión final a 72°C por 20 min.

La comprobación se la realizó mediante electroforesis con un gel de agarosa al 0.8%, a 85 voltios por una hora y media aproximadamente, se corrió las muestras de PCR junto un control de *E. coli*, se utilizó un ladder de 100 bp. Posteriormente se fotografió con una cámara Kodak con su ensamblaje en la oscuridad, las imágenes fueron procesadas con el programa Kodak 1D.

5.2.7. Inserción de los productos de PCR en el vector TOPO TA cloning y transformación

Para insertar los productos de PCR en el plásmido se utilizó TOPO TA cloning kit (que incluye solución de sales, vector TOPO, (Anexo4)). Se tomó 4µl del producto fresco de PCR de DNA de bacterias fotosintéticas, a éste se añadió 1µl de solución de sales, el vector TOPO se mantuvo en hielo y se tomó 1 µl éste, obteniendo un volumen final fue de 6 µl, se mezcló suavemente la reacción y se lo dejó por 30 minutos a

temperatura ambiente (22 – 23°C), para posteriormente utilizar ésta reacción en la transformación.

Para realizar la transformación se utilizó el Transforming One Shot TOP 10 Competent Cells kit de Invitrogen (que incluye, tubos con células *E. coli* competentes, medio S.O.C.), a los tubos de este kit se adicionó 2µl de la reacción del plásmido, se incubó por 30 minutos en hielo, luego se hizo un shock térmico de las células por 30 segundos a 42 °C en el baño de arena, sin agitación.

Posteriormente se transfirió los tubos inmediatamente al hielo, se adicionó 250 µl de medio SOC (medio rico en nutrientes para que las bacterias crezcan) a temperatura ambiente, se tapó fuertemente los tubos y se incubó a 37 °C por 1 hora.

Durante esta hora a los medio LB+Kanamicina se les añadió 40 µl de una solución de 40mg/ml x Gal (cromóforo que indica que colonias son lac- incoloras y lac + azules) se incubó los cajas a 37°C hasta que sean usados (1 hora hasta que se absorba). Finalmente se sembró 50 µl de la reacción en los medios LB + (50µg/ml) Kanamicina y se incubó toda la noche a 37°C.

Es importante recordar que no se debe mezclar pipetando porque las células competentes de *E.coli* son muy delicadas y al pipetear se produciría lisis, obteniendo finalmente resultados negativos.

Una clonación eficiente produce cientos de colonias, las colonias que se escogieron fueron las blancas, no las azules, porque las azules son lactosa positivas y esto indica que no se transformaron ya que al tener el inserto se interrumpe el ciclo de la lactosa debido a que el fragmento de DNA debe insertarse en la región lacz. Una vez que se observó las colonias transformadas se procedió a tomar cada colonia lactosa negativa (incolora).

5.2.7.1.Extracción de plásmido sin kit

De las bacterias fotosintéticas antagónicas se tomaron 200 colonias lactosa negativas se las pasó a medio MKL, se escogieron 40 colonias y luego se sembró masivamente cada colonia en cajas de Agar Nutritivo para proceder a la extracción del plásmido, de las bacterias fotosintéticas favorables se tomaron 90 colonias lactosa negativas, de todas se extrajo los plásmidos, se dejó un cepario de cada colonia en una caja de Agar Nutritivo dividida en cuadrantes.

Una vez sembradas las colonias lactosa negativas masivamente en AN se las resuspendió en 3ml de TE estéril y se transfirió 1.5 ml de la suspensión bacteriana a un tubo eppendorf estéril y se centrifugó por 3 minutos a 12 000rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 µl de solución de TE estéril, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió 200µl de solución 0.2M NaOH -1% SDS, para mezclar bien se invirtió los tubos varias veces. Después se añadió 300 µl de acetato de potasio 5M a temperatura de 4°C. Se centrifugó a 12000 rpm y se transfirió 500 µl del sobrenadante a un tubo nuevo, sin tomar el precipitado de color blanco.

En el tubo con los 500 ul de sobrenadante, se precipitó el plásmido, añadiendo 1ml de etanol 100% a temperatura de 4 °C, se incubó por 10 minutos en hielo y se dejó en el refrigerador. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm, finalmente se realizó 3 veces el lavado del pellet con etanol 75%, se dejó secar por 15 minutos y al pellet se lo resuspendió en 50 ul de TE estéril, para proceder a cortar el plásmido.

Se comprobó la presencia del plásmido por medio de electroforesis y para esto se utilizó un gel de agarosa al 0.8% se corrió por 60 min. a 85 voltios. Posteriormente se fotografió con una cámara Kodak con su ensamblaje en la oscuridad, las imágenes fueron procesadas con el programa Kodak 1D. De esta manera se seleccionó las colonias que efectivamente contenían el inserto para proceder a cortar el plásmido.

5.2.7.2.Corte de plásmido

Una vez extraído el plásmido se procedió a cortar el inserto, para esto se colocó 7 µl de agua, 10 µl de DNA, 2µl de buffer de reacción, y 1µl de la enzima *EcoR1* (debe mantenerse en hielo para evitar desnaturalización). Se incubó toda la noche a 37°C.

Para comprobar que el plásmido se cortó, se corrió un gel de agarosa al 0.8% durante 90 minutos, a 85 voltios. Una vez revelado el gel se procedió a seleccionar las cepas que contenían el plásmido cortado, debido a que estas cepas serían purificadas mediante la extracción del plásmido con kit para su secuenciamiento.

5.2.7.3.Extracción de plásmido con kit

Luego de comprobar y seleccionar las colonias que efectivamente contenían el plásmido, se procedió a utilizar el SNAP miniprep Kit (invitrogen), para obtener plásmidos puros para el posterior secuenciamiento. Se resuspendió el cultivo de bacterias en TE, se centrifugó a 8000 rpm por 1 min, después se resuspendió el pellet 150 µl de Buffer de resuspensión, se añadió 150 µl Buffer de Lisis y se mezcló invirtiendo 6 veces suavemente por 3 minutos a temperatura ambiente.

Luego se añadió 150 µl de la sal de precipitación del kit, la que debe conservarse a 4 °C de temperatura, se mezcló invirtiendo de 6 a 8 veces y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min.

En otro tubo eppendorf de 2ml se colocó una columna de SNAP, y en ésta se vertió el sobrenadante de los tubos que fueron centrifugados, se descartó el pellet.

Se adicionó 600 µl de Binding buffer el cual permite que el DNA se pegue a la columna, se centrifugó por 1 min a 12000 rpm y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se adicionó 500 µl del Buffer de lavado, se centrifugó a 3000 rpm por 30 segundos, se descartó el sobrenadante y finalmente se añadió 900 µl de 1X final wash, se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 30 segundos. Se realizó una última

centrifugación a 13000 rpm durante 1 minuto para que no quede ningún residuo de los compuestos de lavado.

Finalmente se tomó la columna y se la colocó en un tubo nuevo para eluir el plásmido, para esto se adicionó 60 µl de buffer TE, se incubó por 3 minutos, se centrifugó a 13500 rpm por 30 segundos, el sobrenadante contenía el plásmido puro. A estos plásmidos se los cortó y se tomó 5 muestras al azar para comprobar el corte del plásmido mediante un gel de agarosa.

5.2.7.4. Conservación de colonias con inserto

Se preparó BHI + Glicerol y en 41 tubos estériles de 1000 µl se repartió el medio. Con un hisopo estéril se tomó cada colonia con inserto, las cuales fueron tomadas del cepario realizado inicialmente de las colonias lactosa negativas, luego de seleccionarlas mediante la extracción y corte del plásmido. Se inoculó en el medio, se taparon bien los tubos y se guardó en una caja bien rotulada en el congelador a – 20°C.

5.2.8. Envío de muestras para secuenciar

Para enviar las muestras fue necesario liofilizarlas, es decir secarlas para un mejor manejo de la muestra. Los productos liofilizados pueden volver a su estructura original mediante la adición de agua (Rodríguez, 2003).

Las muestras fueron liofilizadas en tubos eppendorf estériles, cada tubo contenía un volumen de 25 µl de DNA de plásmido puro de bacterias fotosintéticas, las tapas de estos tubos fueron agujereadas para que el DNA pueda secarse, luego de agujerear los tubos se los colocó en el liofilizador.

Después de observar que no existía agua en la muestra y que se encontraba completamente seca se procedió a cambiar las tapas agujereadas, se selló cada tubo con parafilm, se rotuló, se empaquetó y se envió a secuenciar a MACROGEN, USA

Las secuencias enviadas por MACROGEN se compararon con las secuencias de nucleótidos obtenidos del GenBank, alineando la secuencia 16S rDNA de las bacterias fotosintéticas y la secuencia de la *Leptospira* con otras similares, para esto se uso BLASTN, que se encuentra en el programa Mega 3.1., el cual es un programa de computación que ayuda con el análisis filogenético, confirmando el género de las bacterias fotosintéticas y el género de *Leptospira*.

6. RESULTADOS

6.1. Cultivo bacterias fotosintéticas

Inicialmente se cultivaron 32 cajas de BG-11, 6 cajas por muestra de agua y 3 tubos por muestra recolectada. Finalmente se conservaron 3 cajas con cultivos de bacterias fotosintéticas de río Misahualli, 2 cajas del río Jondachi, 6 cajas del río Santiago. Todos los tubos cultivados fueron conservados. Las cajas eliminadas estaban contaminadas por hongos, las cuales fueron descartadas rápidamente debido a que al tomar colonias de estas cajas propagarían la contaminación a los nuevos cultivos. En la Tabla 1 se observa claramente cuales cultivos se conservaron y cuales se descartaron por contaminación.

6.2. Co-cultivo de *Leptospira* con bacterias fotosintéticas

Durante el período de investigación se realizaron 7 co-cultivos, y por cada co-cultivo un control en el cual solo estaban leptospiras viviendo en agua, en total se co-cultivaron 50 tubos, el número específico de tubos sembrados por muestra de agua y la fecha en la que se que realizaron los co-cultivos se indica en la Tabla 2. Para determinar la supervivencia las leptospiras se monitoreó cada co-cultivo por un período aproximado de 4 meses.

6.3. Aislamiento y cultivo de bacterias fotosintéticas favorables y antagónicas

La selección de las bacterias fotosintéticas que permitían la permanencia de las leptospiras, se basó en observar la motilidad, interacción y tamaño de población de las leptospiras en cada co-cultivo

De los 50 tubos co-cultivados en 20 tubos se observó permanencia de leptospiras viables. En los controles las leptospiras desaparecieron a la semana de realizado el co-cultivo.

Las leptospiras fueron desapareciendo paulatinamente a partir de los 15 días de realizado el co-cultivo, en los monitoreos iniciales se realizaron 8 conteos bacterianos por 3 meses, se observó que durante los 8 primeros días la población se mantenía estable, pero a partir de los 40 días la población disminuyó notablemente.

A partir de los 131 días solo se encontraban las leptospiras viables y que presentaban buena motilidad e interacción bacteriana. En los tubos en donde las leptospiras desaparecieron paulatinamente se encontró gran contaminación por otro tipo de bacterias

En la Tabla 3 se observa el número de co-cultivos en los cuales se registró permanencia de leptospiras viables, la fecha en que fueron co-cultivados y de que muestras de agua fueron aisladas las colonias fotosintéticas que se co-cultivaron junto con las leptospiras.

Además de encontrar tubos con leptospiras viables se encontró 6 tubos en los cuales las leptospiras desaparecieron a los 3 días de realizado el co-cultivo, sin que exista contaminación alguna, estas bacterias resultaron ser antagónicas para la permanencia de las leptospiras, eliminándolas al poco tiempo de ser co-cultivadas. Se comprobó que estas bacterias eran antagónicas para la permanencia de leptospiras,

inoculando nuevamente leptospiras en estos tubos, y nuevamente éstas desaparecieron a los 3 días del co-cultivo (Tabla 4).

6.4. Extracción DNA de bacterias fotosintéticas

Se extrajo DNA de 2 cajas de bacterias fotosintéticas antagónicas, denominadas así porque en 6 co-cultivos se observó que las leptospiras desaparecían a los tres días de realizado el ensayo, sin que en estos tubos exista ningún tipo de contaminación, en comparación con otros co-cultivos en los cuales las leptospiras desaparecieron por presencia de contaminación bacteriana. Estas bacterias fotosintéticas antagónicas fueron recolectadas de la laguna artificial de la USFQ. Se tomó agua de la laguna debido a que existe una gran cantidad de bacterias fotosintéticas que viven en ella, y se las tomó como control, en caso de que no se logró aislar bacterias fotosintéticas del agua de los ríos estudiados de la provincia del Napo y del río de la provincia de Esmeraldas

También se extrajo DNA de 3 cajas de bacterias fotosintéticas favorables, las cuales pertenecían al río Santiago.

6.5. Amplificación DNA de bacterias fotosintéticas favorables, antagónicas y de *Leptospira* por PCR

Mediante electroforesis se comprobó la amplificación el DNA de bacterias fotosintéticas favorables, antagónicas y de *Leptospira*. La banda esperada tenía un tamaño aproximado de 200bp, y para comprobar la efectividad de los primers se amplificó el segmento 16s rDNA de *E. coli* como muestra de control.

En la Figura 4, en la columna A se observa la amplificación del control *E. coli* con un tamaño de 200 bp y en la columna E se observa la amplificación de DNA de las bacterias fotosintéticas con el tamaño deseado de 200 bp.

6.6. Inserción de los productos de PCR en el plásmido, transformación y extracción del plásmido

En el caso de las bacterias fotosintéticas antagónicas en el proceso de transformación se obtuvieron 200 colonias lactosa negativas las cuales aparentemente contenían el inserto. De éstas se tomó 40 colonias al azar para extraer el plásmido, pero solo en 27 colonias se obtuvo el plásmido, en el resto de muestras no se encontró presencia de plásmido o éste no se cortó. En la Figura 5 se observa aproximadamente 9 muestras que presentan plásmidos cortados con un tamaño aproximado de 200 bp, que era el tamaño esperado.

En cambio de las bacterias fotosintéticas favorables se obtuvieron 80 colonias lactosa negativas aparentemente transformadas. De todas estas colonias se procedió a extraer el plásmido, pero solo 14 muestras contenían el plásmido. Las otras muestras no contenían el inserto.

En la Figura 6 se observa las bandas de los plásmidos cortados de bacterias fotosintéticas favorables, aproximadamente se observan 11 bandas con el tamaño esperado de 200 bp.

6.7. Secuenciamiento

Se enviaron a secuenciar 27 muestras de DNA de bacterias fotosintéticas antagónicas; 14 muestras de DNA de bacterias fotosintéticas favorables, y 1 muestra de DNA de *Leptospira* (Anexo5).

De las 27 muestras de DNA de plásmido de bacterias fotosintéticas antagónicas todas las secuencias estuvieron completas y se las pudo comparar con las secuencias del GenBank.

De estas muestras 24 resultaron pertenecer al grupo de las *Flavobacterium*, de las 3 secuencias restantes: 1 cepa resultó estar relacionada con *Pseudomonas putida*, otra está relacionada con bacterias ambientales no cultivables y por último la tercera se relaciona con *Proteobacterias*.

La homología varió de una secuencia a otra, en la Tabla 5 se puede observar el nombre de las secuencias, el porcentaje de homología y con que tipo de bacteria tiene una relación más cercana.

En la Figura 7 se puede observar el árbol filogenético de las bacterias fotosintéticas antagónicas, en el cual se observa claramente la división de las bacterias relacionándose cada grupo con un género bacteriano específico.

De las 14 muestras de DNA de plásmidos de bacterias fotosintéticas favorables enviadas, solo de 10 muestras llegaron las secuencias completas, y de las 4 restantes las secuencias fueron pequeñas con un número de pares de bases insuficientes para ser comparados (Anexo 6).

Se encontró 2 géneros bacterianos, el primero está relacionado con el género bacteriano de *Sphingomonas* que pertenece al grupo de las Alpha proteobacterias y el segundo pertenece al género de *Flavobacterium*. De 10 cepas bacterianas, 9 están relacionadas con el género de *Sphingomonas* y 1 cepa pertenece al género *Flavobacterium*.

En la Tabla 6 se observa el nombre que se dio a las secuencias de las bacterias fotosintéticas favorables, el porcentaje de homología y con que tipo de bacteria tiene una relación más cercana.

En la Figura 8 se observa el árbol filogenético de las bacterias fotosintéticas favorables agrupadas de acuerdo a su homología más cercana con los diferentes tipos de *Sphingomonas*, a diferencia de la cepa bacteriana que se relaciona con *Flavobacterium*, la cual está totalmente distante del grupo de *Sphingomonas*, pero íntimamente relacionadas con la permanencia de leptospiras en el co-cultivo.

La agrupación de las *Sphingomonas* se observa de una mejor manera en la Figura 9 en la cual se ve que las *Sphingomonas* 6, 3, 9, 7 y 2 están íntimamente

relacionadas, en comparación con las *Sphingomonas* 4, 5, 8, 1 que están relacionadas pero no de una manera tan cercana. Se observa que efectivamente todas pertenecen a un mismo género bacteriano pero con ciertas características que las hacen diferentes una de las otras.

La *Leptospira* tuvo un 99% de homología con *Leptospira biflexa*, en la Tabla 7 se observa el porcentaje de homología y con tipo de *Leptospira* tiene una relación más cercana.

En la Figura 10 se observa el árbol filogenético de la *Leptospira* que se secuenció que es la LT 16SV3F, la cual está íntimamente relacionada con la *L. biflexa serovar Ancona ANCONA*, y con *L. biflexa serovar Andamana CH 11 16S*.

7. DISCUSION

La *Leptospira* al lograr mantenerse viable en agua puede ingresar a un huésped e infectarlo, y esta permanencia en el agua juega un papel muy importante en la epidemiología de la leptospirosis. Por lo tanto, este estudio pretendió recrear “*in vitro*” el posible nicho de *Leptospira* saprófita como un posible modelo para explicar posteriormente el comportamiento de *Leptospira* patógena en agua.

En este estudio se logró identificar y caracterizar bacterias fotosintéticas pertenecientes al género *Sphingomonas* que en co-cultivo con *Leptospira biflexa* cooperaron en la permanencia de esta bacteria por un periodo superior a cuatro meses.

En el medio ambiente, los microorganismos para su supervivencia necesitan desarrollar mecanismos que les permitan mantenerse viables.

Por ejemplo disminuir la tasa de crecimiento cuando hay carencia de nutrientes. Entre otros mecanismos comunes que los microorganismos han desarrollado, se encuentran ciertas interacciones microbianas como relaciones simbióticas, sinérgicas, y antagónicas; las cuales pueden afectar positiva o negativamente las interacciones entre dos o más poblaciones bacterianas (Margulis, 1992).

Aparentemente las leptospiras poseen una capacidad de resistencia a la carencia de nutrientes, por lo cual permanecen en grandes masas de agua durante tiempos prolongados. Al ser bacterias aerobias necesitan una producción constante de oxígeno y

uno de los tipos de bacterias que les podrían proveer de este elemento son las bacterias fotosintéticas (Levet, 2001).

En estudios anteriores se han reportado casos de leptospirosis consecuencia de actividades acuáticas desarrolladas en ríos del Oriente ecuatoriano y de zonas tropicales como la provincia de Esmeraldas.

Por esta razón se decidió utilizar para este estudio una cepa de *Leptospira* saprofítica aislada del río Santiago ubicado en la provincia de Esmeraldas, que posteriormente fue caracterizada por técnicas moleculares como *Leptospira biflexa*.

De igual manera se aisló bacterias fotosintéticas de los ríos Misahualli, Jondachi y Napo de la provincia del Napo y del río Santiago de la provincia de Esmeraldas. El motivo por el cual se aisló bacterias fotosintéticas de estos ríos, se debió a que en estos se ha encontrado presencia de leptospiros y era necesario que las bacterias aisladas sean de ríos en los cuales las leptospiros se mantienen permanentemente, así se podría obtener una recreación in vitro más cercana al nicho natural de estas bacterias.

La importancia de los resultados radica en la posible simbiosis de *Leptospira* y bacterias fotosintéticas pertenecientes al género *Sphingomonas*, que generalmente producen solo pigmentos amarillos, blancos y dependiendo de las condiciones ambientales cambian de morfología y pueden generar pigmentos verdes, lo cual indica que están produciendo fotosíntesis (Ohta et al., 2003). Estas bacterias además son formadoras de polisacáridos y generalmente forman biofilms, creando así el soporte para mantenerse en superficies bióticas y abióticas gracias a los productos extracelulares que producen, y de esta manera generar un ambiente ideal para las interacciones simbióticas. (Yabuuchi et al., 1999)

Ciertas especies de *Sphingomonas* presentan clorofila a, produciendo fotosíntesis, utilizando la luz como fuente de energía, además presentan sphingoglicolípidos, que

contienen diversos ácidos grasos de cadena larga (Yabuuchi et al., 1999; Otha et al. 2003). De esta manera las leptospiras podrían estar utilizando estos sustratos como fuentes de energía, manteniéndose en el agua gracias al ambiente favorable que las *Sphingomonas* les estarían proporcionando.

En el análisis filogenético se observó que en el grupo de las bacterias fotosintéticas favorables existían dos géneros bacterianos (*Sphingomonas* y *Flavobacterium*) filogenéticamente diferentes, pero íntimamente relacionadas en el proceso simbiótico.

Al momento de cultivar las colonias fotosintéticas en BG-11 se pudo observar que efectivamente existía una relación estrecha entre estos dos géneros bacterianos, debido a que en el cultivo no se podía obtener colonias totalmente puras.

En el caso de las bacterias antagónicas se identificó que las bacterias pertenecían al género *Flavobacterium*, relacionadas con las *Bacteroidetes*, bacterias que secretan inhibidores de crecimiento de bacterias provenientes de otras especies, de esta manera controlan sus fuentes de energía y por ende su alimento, de esta aseguran la permanencia en su hábitat acuático, (Riquelme, 2003).

La caracterización de la *Leptospira* comprobó que esta bacteria posee una homología del 99% con la *Leptospira biflexa* perteneciendo efectivamente a las leptospiras saprofitas.

Los resultados obtenidos comprueban que las leptospiras saprofitas pueden interactuar en superficies acuáticas con bacterias fotosintéticas del género *Sphingomonas*. Esto abre la posibilidad de continuar el estudio, pero con leptospiras patógenas y la comprobación de que éstas pueden mantener un comportamiento similar a las saprofitas e interactuar con otras bacterias en el agua sería un hito importante en la bacteriología. De esta manera las investigaciones no se centrarían en controlar solamente a los reservorios animales.

Ahora la principal fuente de transmisión sería el agua, porque posiblemente las leptospiras estarían adaptándose a ciertos consorcios bacterianos los cuales puedan proveerles de un ambiente adecuado para subsistir en el agua.

8. CONCLUSIONES

Se logró recrear exitosamente, *in vitro*, el proceso de simbiosis de *Leptospira saprofitica* junto a bacterias fotosintéticas que fueron identificadas como bacterias del género *Sphingomona* perteneciente al grupo de las Alpha proteobacterias las cuales son bacterias facultativas, fotoorganotrófas, logrando establecer que las leptospiras pueden permanecer en el agua por tiempo prolongado si encuentran las condiciones necesarias que les permitan sobrevivir, en este caso estas bacterias fotosintéticas les están proveyendo fundamentalmente de oxígeno y de algunos nutrientes.

Una vez obtenidas las cepas caracterizadas se puede continuar el estudio, pero esta vez con cepas patógenas de leptospiras, para determinar si éstas se comportan de manera similar a las saprofiticas y si las mismas bacterias fotosintéticas podrían ayudarles a mantenerse en grandes masas de agua.

Las *Sphingomonas* son bacterias heterótrofas que pueden realizar fotosíntesis, estas bacterias son formadoras de polisacáridos generando consorcios bacterianos, por esta razón es difícil obtener colonias separadas.

Las bacterias antagónicas pertenecientes al género *Flavobacterium* son bacterias que generalmente secretan ciertos inhibidores de crecimiento bacteriano, las cuales podrían constituirse en una estrategia para mantener un bajo crecimiento de las leptospiras en agua.

Esta investigación es de suma importancia debido a que es el primer estudio realizado sobre este tema, al comprobarse que si se establecen relaciones simbióticas se

abren las puertas para iniciar un nuevo estudio pero con leptospiras patógenas y de esta manera reconstruir el nicho natural de éstas.

9. RECOMENDACIONES

Realizar estudios posteriores para comprobar si las leptospiras patógenas tienen un comportamiento similar al de las leptospiras saprófitas en la relación simbiótica con las *Sphingomonas* o con otras bacterias,

Determinar si las *Sphingomonas* podrían actuar como indicadores de presencia de leptospiras en agua.

En el caso de las bacterias fotosintéticas antagónicas del género *Flavobacterium* se podría investigar si éstas lograrían controlar la permanencia de leptospiras en el agua, gracias a que secretan inhibidores de crecimiento bacteriano. Además es necesario investigar si podrían ser utilizadas como patrón de determinación de agua libre de leptospiras.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Davies, Parsek, Pearson, Iglewski, Costerton, Greenberg, Science 1998. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm, vol. 280.
- Davey, and G. O'Toole., 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics, microbiol Vol. 64: 847–867.
- Faine S., B. Adler, C. Colin, and P. Perolat, (1999) Leptospira and Lepstospirosis. MediSci, Melbourne.
- Handelsman, J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiol Mol Biol Rev 68: 669-685
- Jacob, Aharonov and Shapir, “Bacteria Harnessing Complexity”, School of Physics and Astronomy Raymond & Beverly Sackler Faculty of Exact Sciences The Maguy-Glass Chair in Physics of Complex Systems Tel Aviv University, 69978 Tel Aviv Israel.
- Johnson, Livermore, Walby, and Jenkin., 1970. Lipids of Parasitic and Saprophytic Leptospire.
- Klepac-Ceraj, V., Bahr, M., Crump, B.C., Teske, A.P., Hobbie, J.E., and Polz, M.F. (2004) High overall diversity and dominance of microdiverse relationships in salt marsh sulphate-reducing bacteria. Environ Microbiol 6: 686-698.
- Levett P.N. Leptopirosis. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 296-326.
- Madigan M. T., J. M. Martinko & J. Parker. 2000. Brock, Biology of Microorganisms. 9th ed. Prentice Hall International, Inc. USA.
- Margulis, 1992. *Symbiosis in Cell Evolution: Microbial Communities in the Archean and Proterozoic Eons*, W.H. Freeman
- Muyzer, G., De Waal, E.C., And Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling Of Complex Microbial Populations By Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis Of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding For 16S Rrna. Appl Environ Microbiol 59.
- "Ministerio de Salud Pública; Cambio climático y enfermedades infecciosas: Consecuencias del fenómeno El Niño. Subcomité de planificación y programación del Comité Ejecutivo. SPP30/5 (Esp.) febrero de 1998"

- Noubade R, Krishnamurthy GV, Murag S, Venkatesha MD, Krishnappa G. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire by polymerase chain reaction. *Indian J Med Microbiol* 2002;20:33-36".
- Ohta, Yagi, Suzuki, Fujitake, Watanbe, 2003, Characterization of *Sphingomonas* Species found a predominant members in the Culturable Bacterial Community of a Green pigment containing sclerotium grain from Mt. Myoko, (Japan) Volcanic Ash soil. 2003.
- Rodicio y Mendoza. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica.
- Riquelme & Avendaño; Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Acuicultura, Universidad de Antofagasta, 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura.
- Sebat, F. Colwell, and R. Crawford, 2003. Metagenomic Profiling: Microarray Analysis of an Environmental Genomic Library. *Appl Environ Microbiol* 69(8): 4927–4934.
- Vinetz, Glass, Flexner, Mueller, Kaslow 1996. Sporadic urban leptospirosis. *Ann. Intern. Med.* 125:794-798.
- Yabuuchi, Kosako, Naka, Suzuki, Yano, 1999, Proposal of *Sphingomonas suberifaciens*, (van Bruggen, Jochimsen and Brown 1990) *Comb. Nov.*, *Sphingomonas natatoria* (Sly 1985) *Comb. Nov.*, *Sphingomonas ursincola* (Yurkov et al. 1997) *Com. Nov.*, and Emendation of the Genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.*, 43(4), 339-349.

11. TABLAS

Tabla 1: Nombre de los ríos de los cuales se cultivó las muestras de agua para obtener bacterias fotosintéticas. Número de cajas y tubos cultivados. Número de cultivos que se mantuvieron y número de cultivos eliminados.

Misahualli	Jondachi	Santiago	Agua laguna USFQ
6 cajas	6 cajas	6 cajas	6 cajas
3 tubos	3 tubos	3 tubos	3 tubos
Número de cajas conservadas			
3	2	6	2
Las otras cajas se eliminaron por contaminación por hongos			

Tabla 2: Cronograma de co-cultivos y número de tubos co-cultivados.

Muestra	Número de cultivo	Fecha co cultivo	Número de tubos co cultivados
Santiago	1	1/11/05	4
Misahualli			4
Agua Laguna			4
Jondachi			4
Santiago	2	15/11/05	4
Misahualli			4
Agua Laguna			4
Jondachi			4
Santiago	3	18/11/05	4
Misahualli			3
Agua Laguna			3
Jondachi			3
Santiago	5	04/01/06	6
Agua Laguna			2
Santiago	6	01/02/06	5
Santiago	7	01/03/06	4
Santiago	8	09/03/06	5

Tabla 3: Número de tubos que presentaron leptospiras viables después de 4 meses de monitoreo.

Número de co cultivo	Fecha	Nombre del río de donde se aisló fot.	Tubos
2	15/11/05	Santiago	3

3	18/11/05	Misahualli	2
3	18/11/05	Santiago	3
5	04/01/06	Santiago	6
5	04/01/06	Agua Laguna	1
6	01/02/06	Santiago	4
7	09/03/06	Santiago	1

Tabla 4: Número de tubos de co-cultivos que a partir de los 3 días las leptospiras desaparecieron sin presentar ningún tipo de contaminación, estas bacterias resultaron ser antagonicas.

Fecha co-cultivo	Número de tubos	Nombre
22/12/05	4	Santiago
22/12/05	2	Agua Laguna

Tabla 5: Bacterias antagonicas, género bacteriano con el cual tienen una mayor homología y tipo de bacteria con la que tienen una relación más cercana.

Nombre de secuencia	Tipo	Porcentaje homología	Tipo de bacteria mayor homología
A1	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A2	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A3	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A4	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A5	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A6	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A7	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A8	<i>Pseudomonas</i>	96%	<i>Pseudomonas putida</i>
A9	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>

A10	<i>Flavobacterium</i>	89%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A11	<i>Uncultured bacterium</i>	99%	<i>Uncultured bacterium</i>
A12	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A13	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A14	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A15	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A16	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A17	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A18	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A19	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A20	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A21	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A22	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A24	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A25	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A26	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
A27	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>

Tabla 6: Bacterias fotosintéticas favorables, género bacteriano con el cual tienen una mayor homología y tipo de bacteria con la que tienen una relación más cercana

Nombre de secuencia	Tipo	Porcentaje homología	Tipo de bacteria mayor homología
F2	<i>Sphingomonas</i>	98%	<i>Sphingomonas sp. 47</i>
F4	<i>Sphingomonas</i>	99%	<i>Sphingomonas sp. Pd-S-(1)-m-D-3(6)</i>
F5	<i>Sphingomonas</i>	99%	<i>Sphingomonas sp. Pd-S-(1)-m-D-3(6)</i>
F6	<i>Flavobacterium</i>	99%	<i>Flavobacterium sp. EMB 152</i>
F8	uncultured <i>alpha proteobacterium</i>	98%	uncultured <i>alpha proteobacterium</i>
F9	<i>Sphingomonas</i>	98%	<i>Sphingomonas sp. Pd-S-(1)-m-D-3(6)</i>

F10	<i>Sphingomonas</i>	99%	<i>Sphingomonas</i> sp. Pd-S-(1)-m-D-3(6)
F 11	<i>Sphingomonas</i>	98%	<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>
F12	<i>Sphingomonas</i>	99%	<i>Sphingomonas</i> sp. Pd-S-(1)-m-D-3(6)
F13	<i>Sphingomonas</i>	99%	<i>Sphingomonas</i> sp. Pd-S-(1)-m-D-3(6)

Tabla N° 7: *Leptospira* secuenciada y su homología más cercana

Tipo	Porcentaje homología	Tipo de bacteria mayor homología
Leptospira saprofítica (LT 16SrDNAF)	99%	<i>Leptospira biflexa</i>

12. FIGURAS

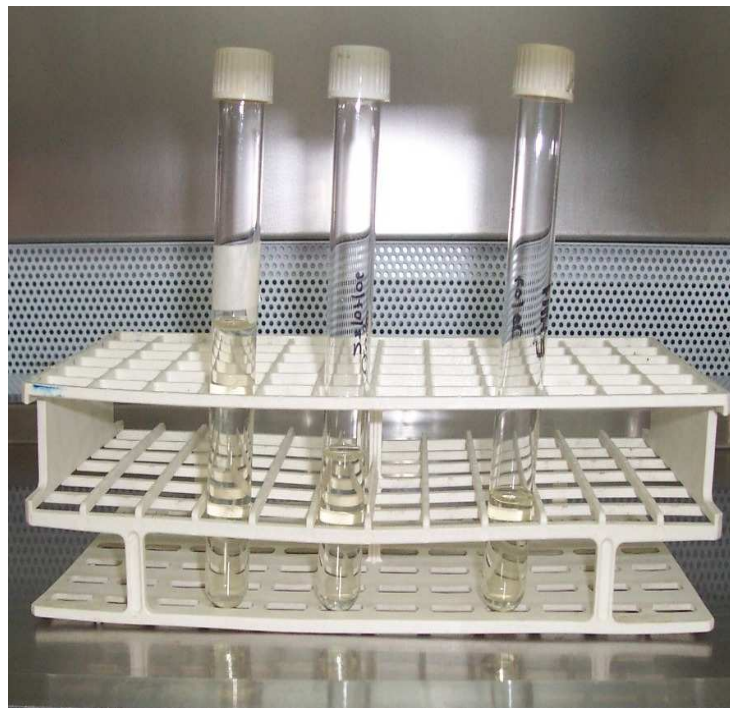


Figura 1: Cultivo primario de *Leptospira* en medio EMJH

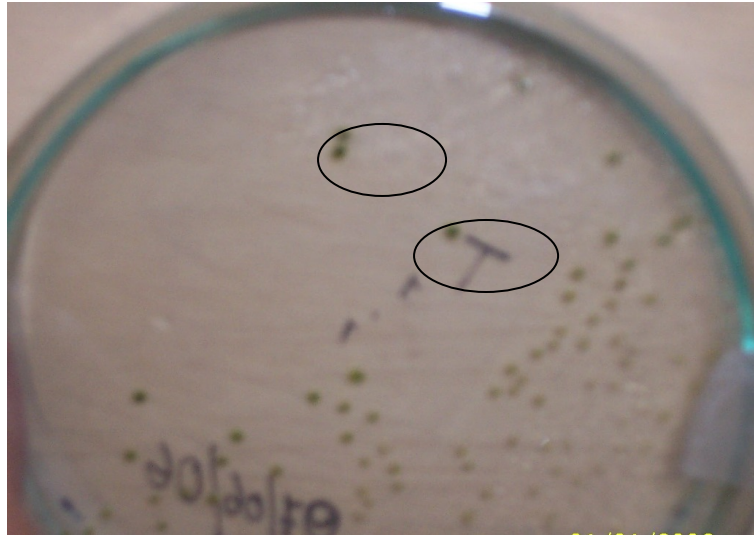


Figura 2: Colonias aisladas de bacterias fotosintéticas



Figura 3: Co-cultivo in vitro de bacterias fotosintéticas con leptospiras

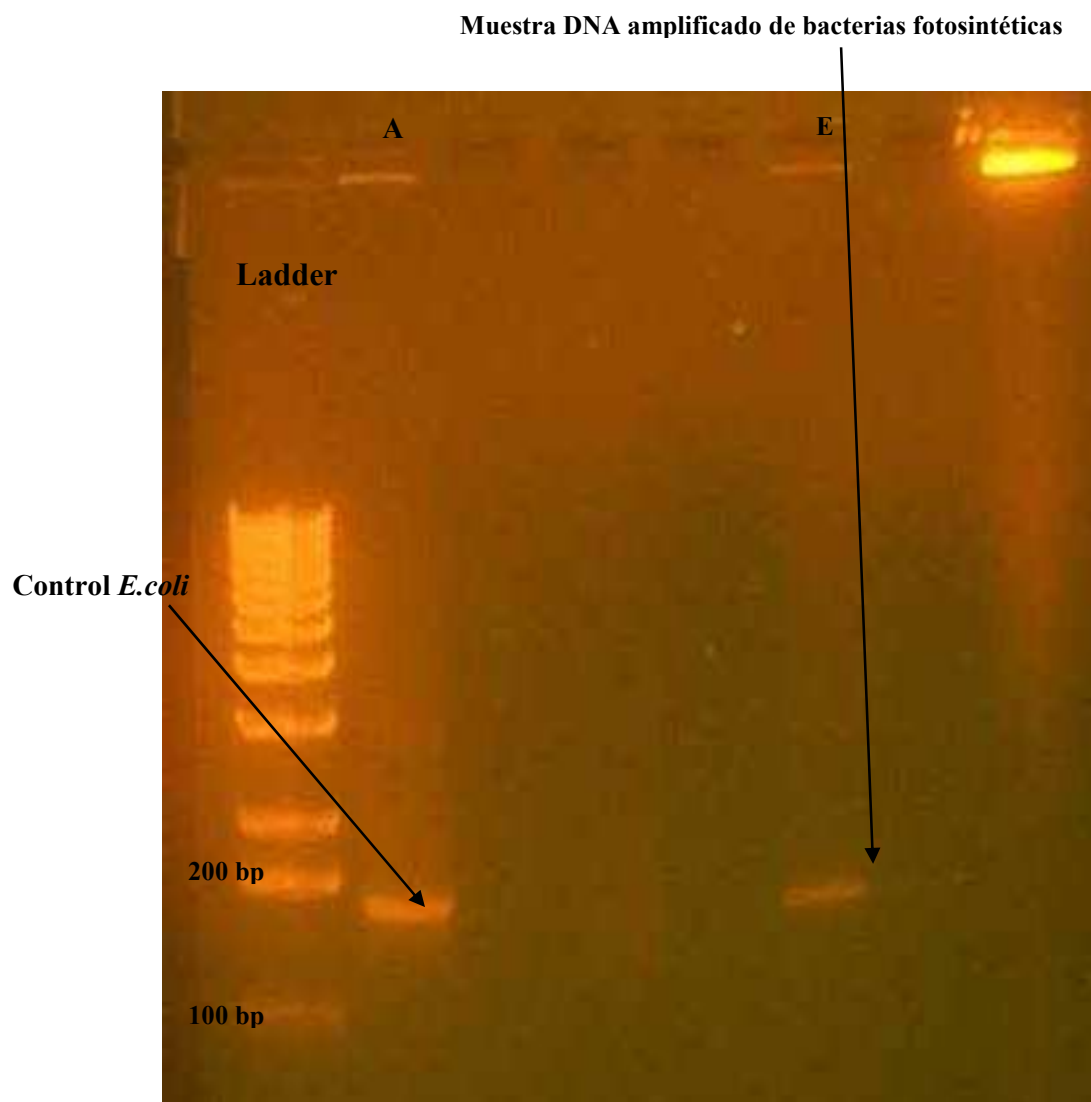


Figura 4: Amplificación de DNA de bacterias fotosintéticas favorables utilizando puRe Taq- To-Go PCR Beads® y primers 16SV3r y 16SV3f.

En la columna A se observa una banda con un tamaño aproximado de 200bp, que indica la amplificación de DNA del control *E. coli*, lo cual revela que los primers 16SV3f están funcionando correctamente amplificando la región V3 del segmento 16S rDNA. En la columna E se observa la amplificación de DNA de bacterias fotosintéticas favorables, con el tamaño esperado de 200bp.

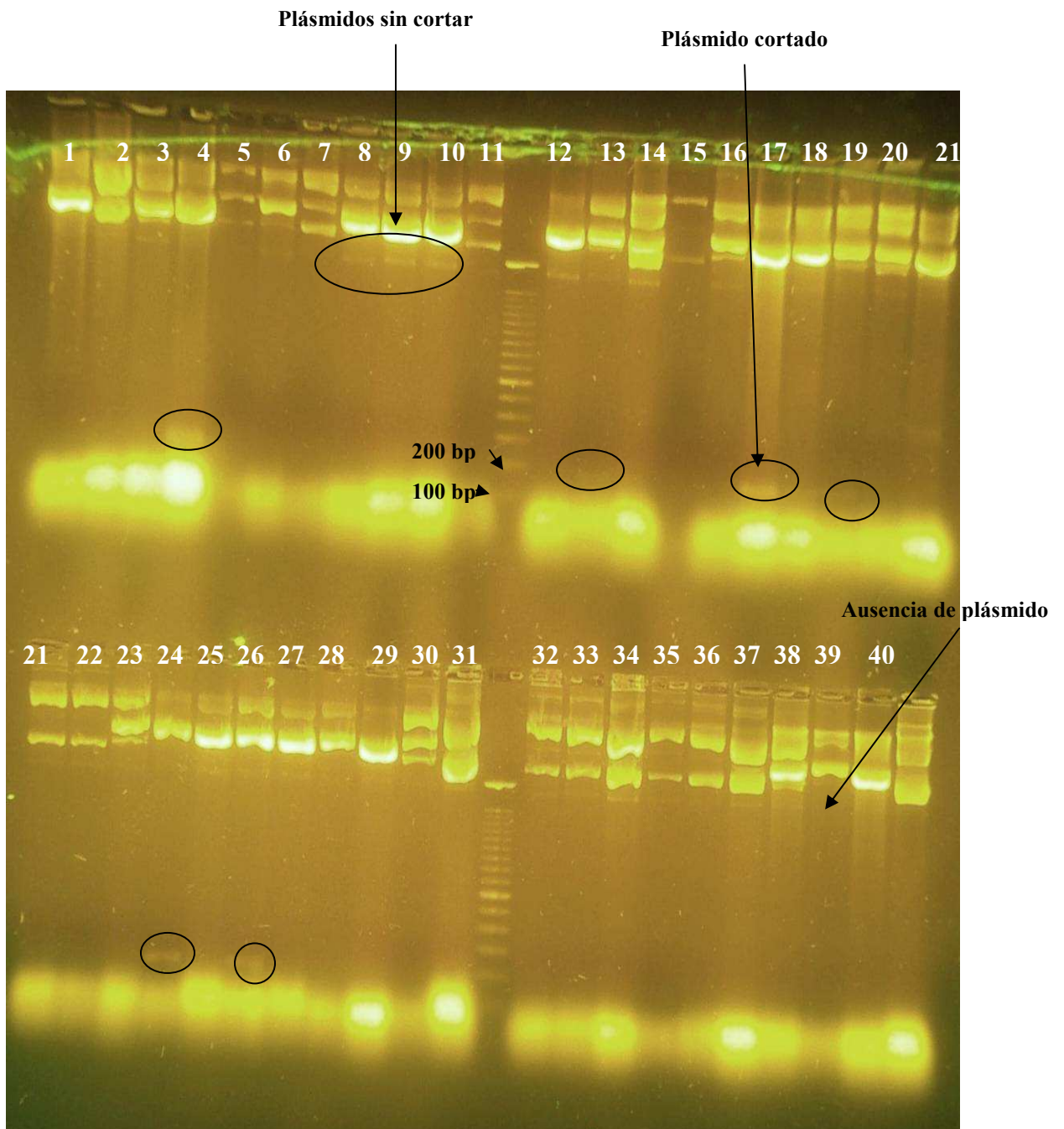


Figura 5: Muestras de plásmidos cortados y sin cortar de bacterias fotosintéticas antagónicas.

Las muestras 4, 13, 16, 19, 24, 26 presentan plásmidos cortados, con un tamaño de 200 bp, en el resto de muestras se puede observar la presencia de plásmido pero sin cortar como por ejemplo en las muestras 8, 9, y 10. En cambio en la muestra 39 no se observa presencia de plásmido.

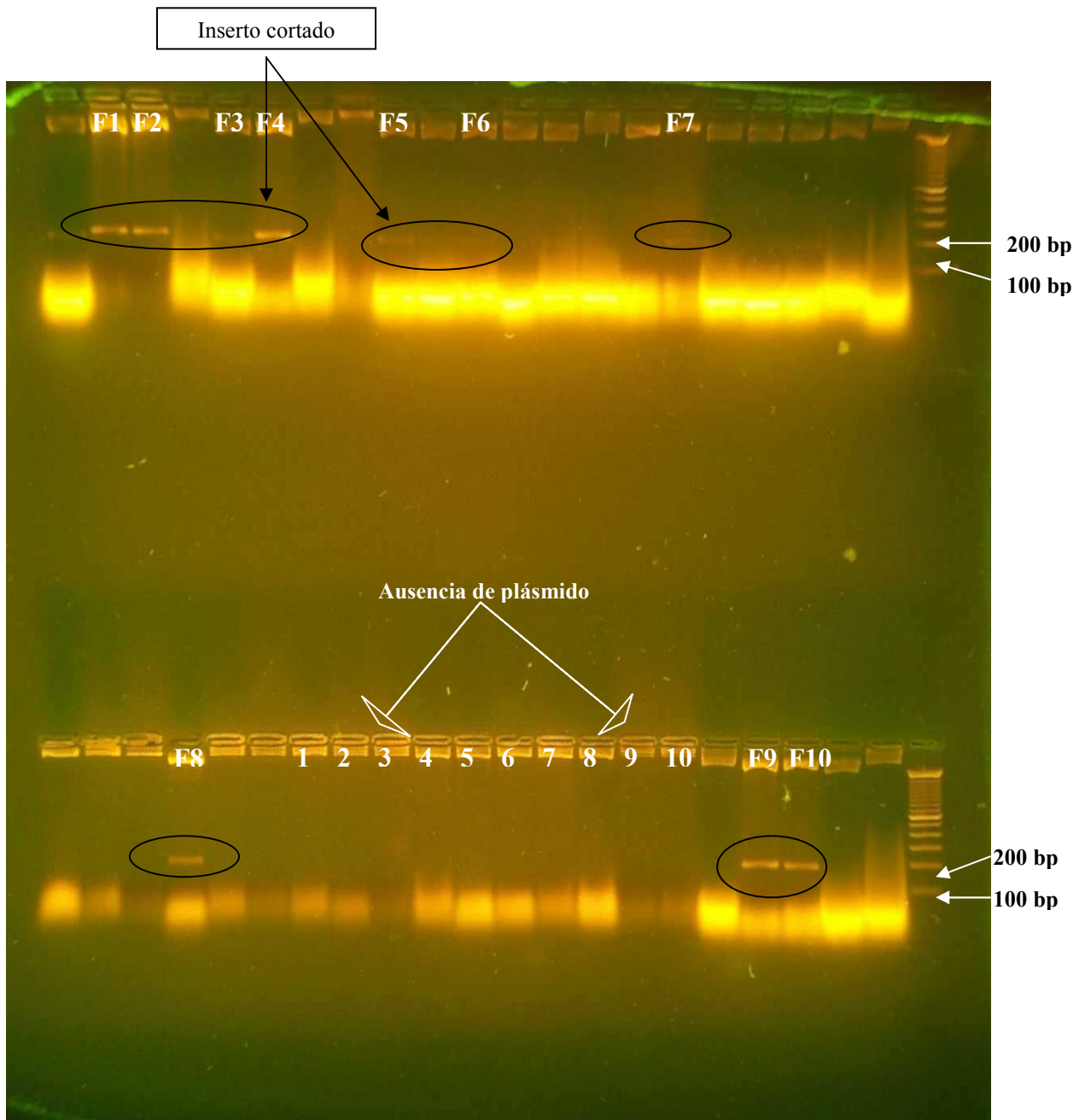


Figura 6: Muestras de plásmidos cortados de bacterias fotosintéticas favorables que presentan el inserto.

Las muestras F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10 presentan plásmidos cortados con un tamaño esperado de 200bp. En las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se observa claramente la ausencia de plásmido.

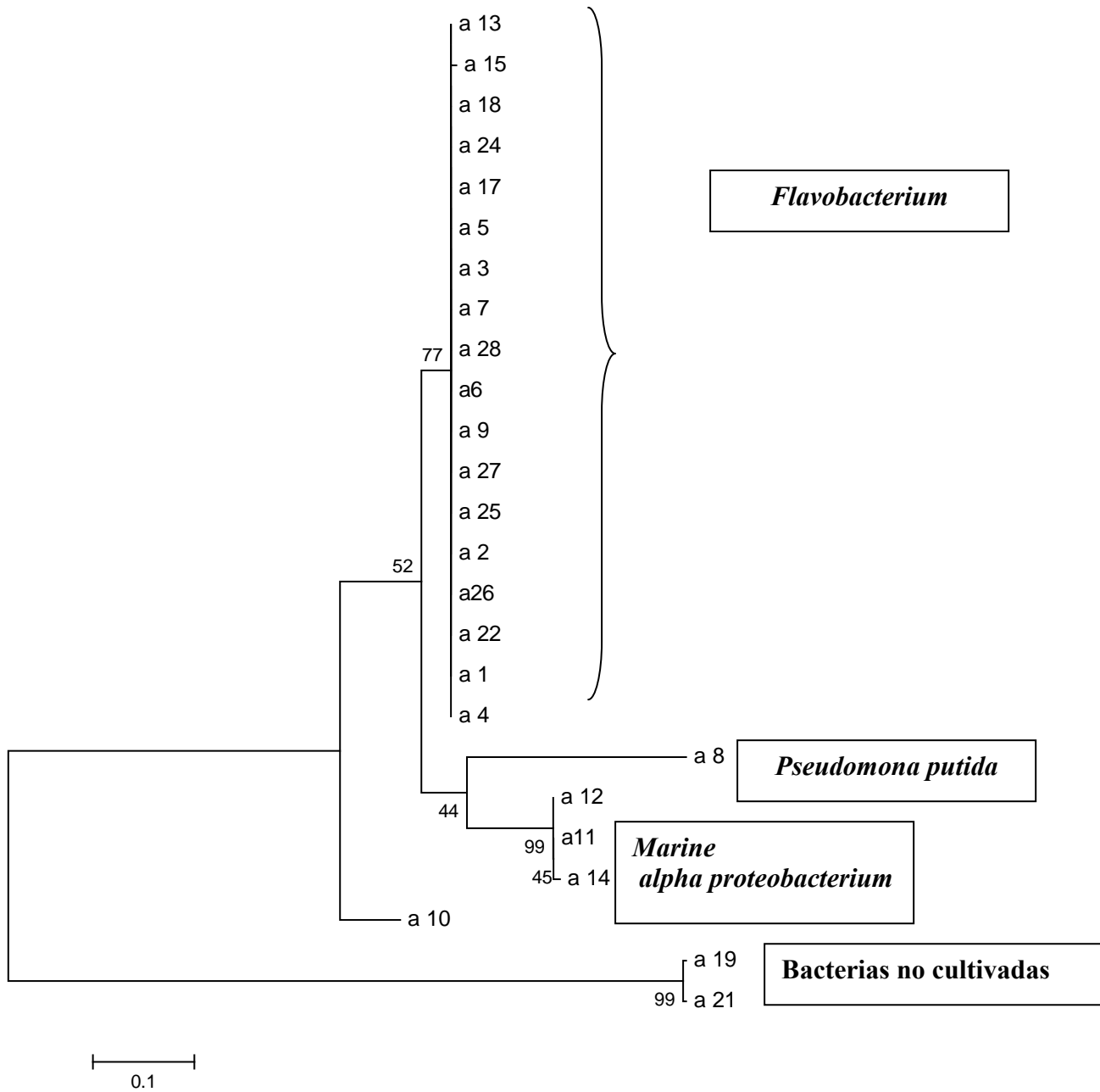


Figura 7: Árbol filogenético de bacterias fotosintéticas antagonicas.

El árbol filogenético fue realizado por el método de Neighbor Joining, utilizando el programa Mega 3.1, para poder realizar la comparación filogenético. Se observa 3 grupos establecidos, el mayor grupo de las bacterias fotosintéticas antagonicas pertenecen al género *Flavobacterium*, las cuales están relacionadas con *Pseudomona putida* y *Marine alpha proteobacterium* y el 3er grupo pertenece a bacterias no cultivadas que no se relacionan íntimamente con los grupos anteriores.

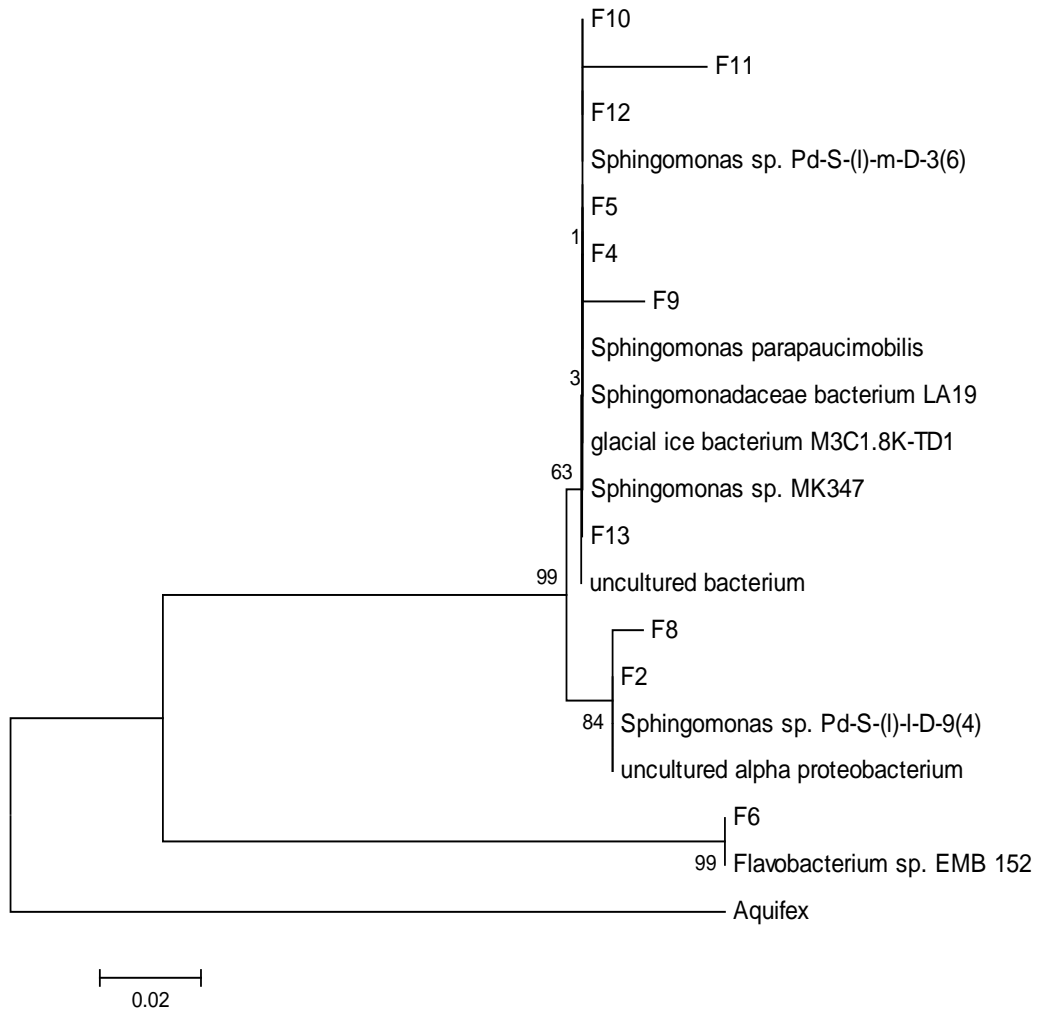


Figura 8: Árbol filogenético de las bacterias fotosintéticas favorables agrupadas de acuerdo a su homología más cercana con los diferentes tipos de *Sphingomonas*.

El árbol filogenético fue realizado por el método de Neighbor Joining, utilizando el programa Mega 3.1, para poder realizar la comparación filogenético. Se observa que las bacterias fotosintéticas favorables están muy relacionadas con *Sphingomonas*, varias de estas bacterias presentan una relación cercana con un tipo específico de *Sphingomonas*, las cuales se agruparon de acuerdo a su homología más cercana. En cambio una cepa de las bacterias fotosintéticas favorables se relacionó con *Flavobacterium* sp., el cual está totalmente alejado del género *Sphingomonas* pero estos dos género intervinieron en la relación simbiótica a pesar de no tener entre sí una homología cercana.

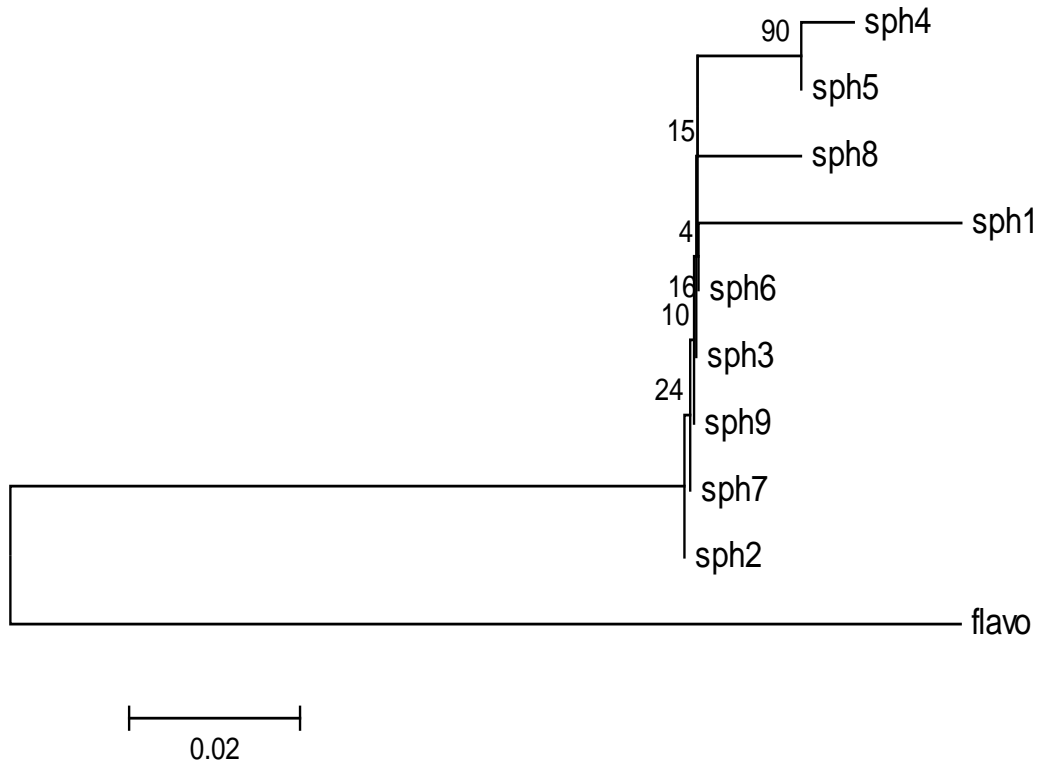


Figura 9: Árbol filogenético de las bacterias fotosintéticas favorables en el cual se observa los dos grupos, el primer gran grupo perteneciente al género *Sphingomona* y el otro que pertenece a las *Flavobacterium*

En este árbol se agrupó solamente a las secuencias de las bacterias fotosintéticas favorables. Se observa que todas las bacterias están filogenéticamente relacionadas, unas más cercanas que otras, pero efectivamente pertenecen al mismo género bacteriano, con excepción de la flavobacteria a la cual se le observa completamente alejada, distinguiéndose así los dos grupos bacterianos que intervienen en la simbiosis.

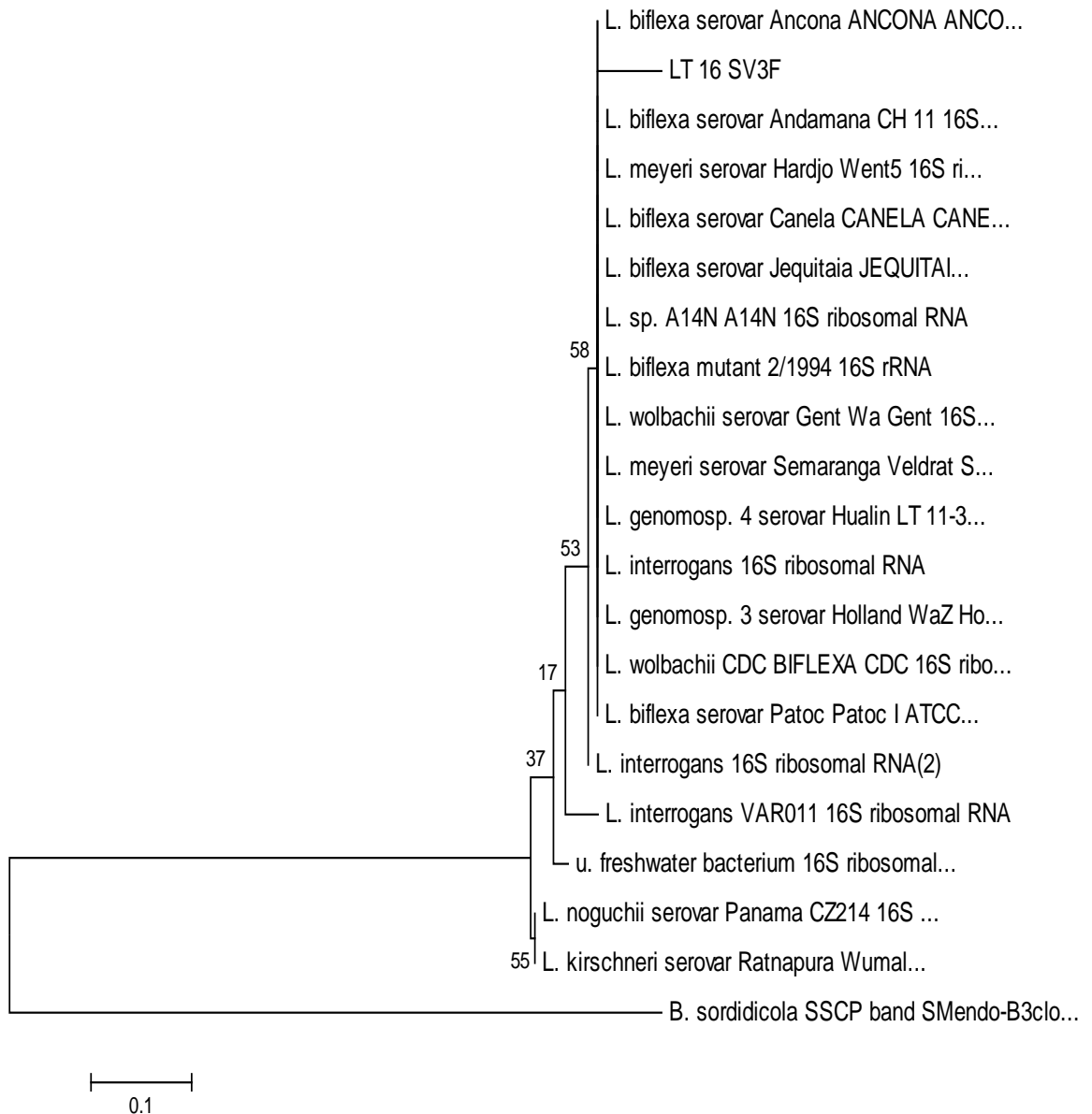
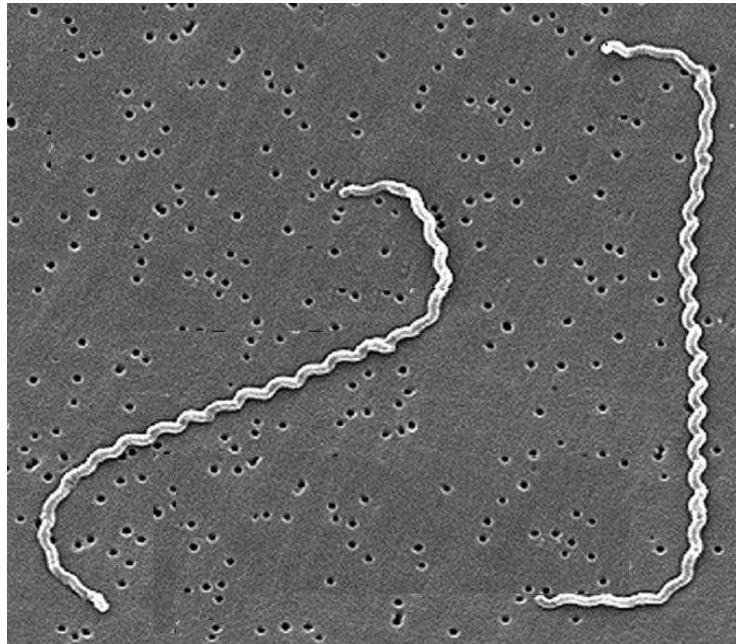


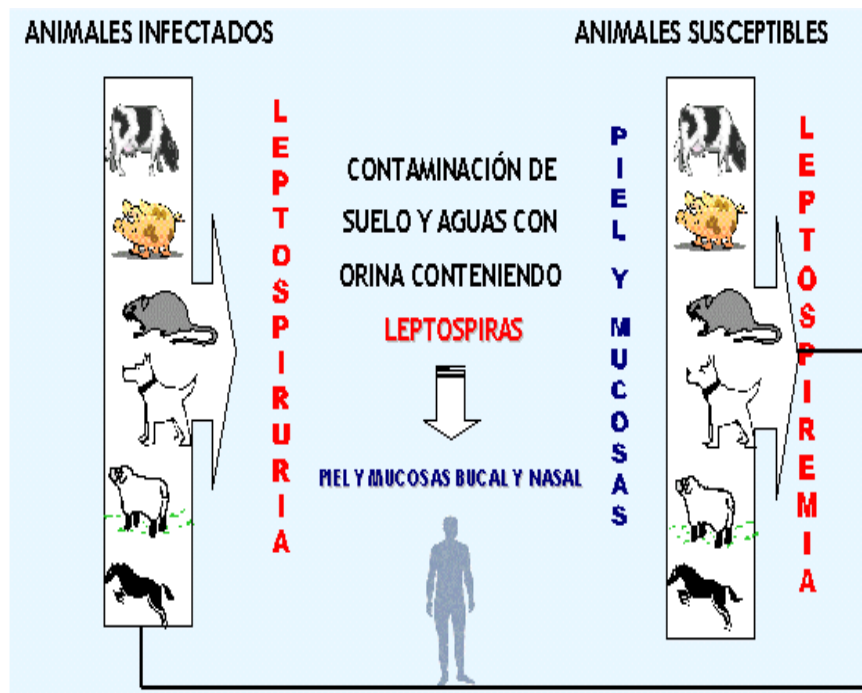
Figura 10: Árbol filogenético de *Leptospira* que se secuenció que es la LT 16SV3F y su relación más cercana con el género de *Leptospira biflexa*.

En el árbol se observa la relación filogenética de la *Leptospira*, la cual está íntimamente relacionada con la *Leptospira biflexa* Ancona Ancona, comprobándose que efectivamente pertenece al grupo de las leptospiras saprofíticas.

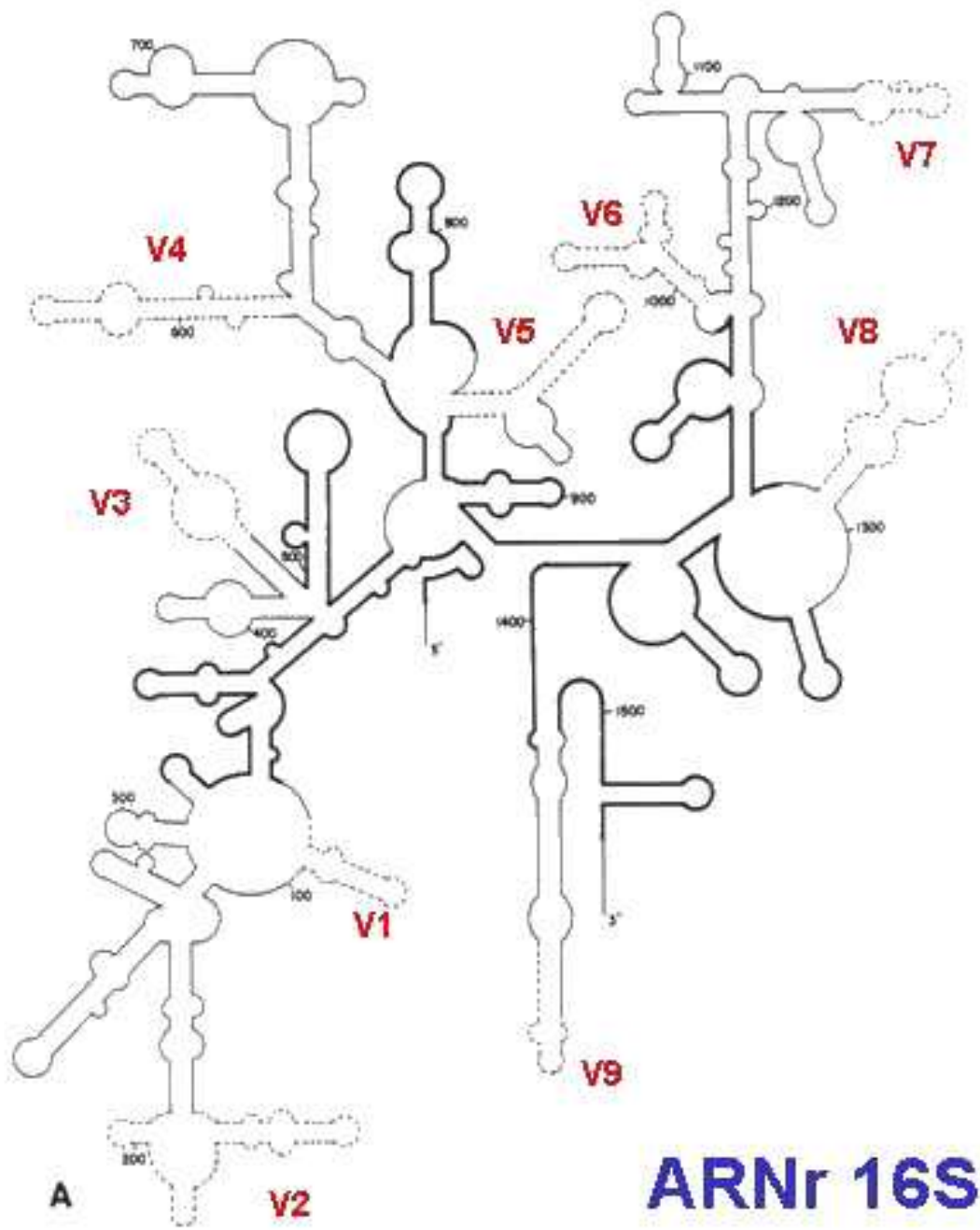
13. Anexos



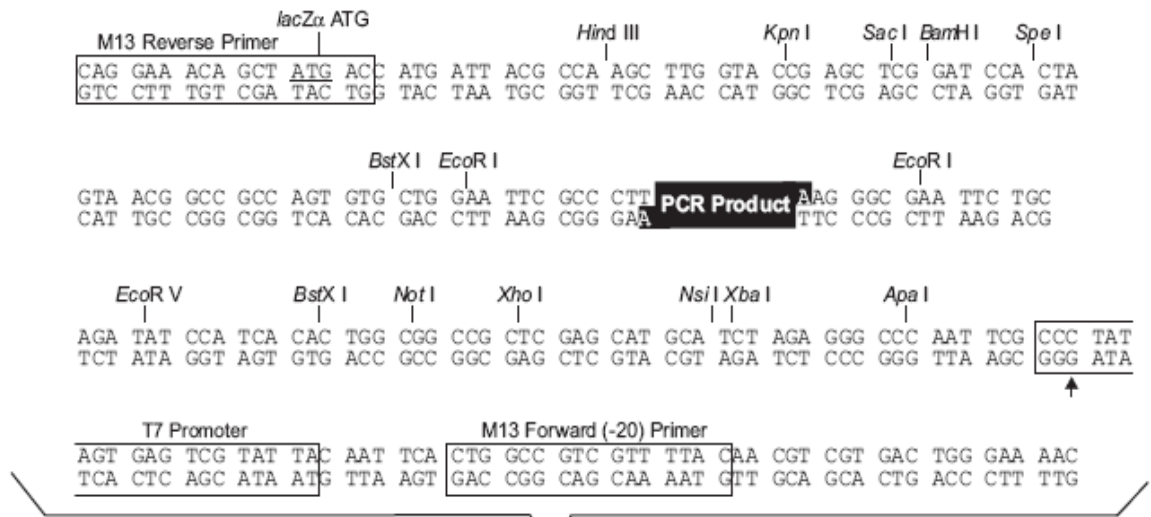
Anexo 1: Micrografía por barrido de electrones de *L. interrogans* (Levet, 2001)



Anexo 2: Ciclo epidemiológico de la *Leptospira*.



Anexo 3: Segmento 16S rRNA de *E. coli*



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

Anexo 4: Mapa del vector TOPO. Detalle del sitio de clonación.

Anexo 5: Secuencias limpias de bacterias fotosintéticas antagónicas

Secuencia a 1

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTCCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCCTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 2

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 3

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCC
GCGTGCAGGATGACGGTCTTATGGATTGTAACTGCTTTTGTACGAGAAGAAACACTCCTTC
GTGAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCGCGG
TAATAAG

Secuencia a 4

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCC
GCGTGCAGGATGACGGTCTTATGGATTGTAACTGCTTTTGTACGAGAAGAAACACTCCTTC
GTGAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCGCGG
TAATAAG

Secuencia a 5

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 6

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 7

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCC
GCGTGCAGGATGACGGTCTTATGGATTGTAACTGCTTTTGTACGAGAAGAAACACTCCTTC
GTGAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCGCGG
TAATAAG

Secuencia a 8

CTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCCG
CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGT
TAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCACC
GCGGTAATAAG

Secuencia a 9

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencias a 1

CTTATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGGGCC
CCCTGTATTAGAAGGAGCTTTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCA
TCCTGCACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCT
CCGTAGGAAG

Secuencia a 12

ATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGGGCCCC
CTGTATTAGAAGGAGCTTTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATC
CTGCACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCC
CGTAGGAAG

Secuencia a 13

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCC
GCGTGCAGGATGACGGTCCATGGATTGTAACTGCTTTTGTACGAGAAGAAACACTCCTTC
GTGAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCGCGG
TAATAAG

Secuencia a 14

ATTACCGCGGTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGGGCCCC
CTGTATTAGAAGGAGCTTTTTTCGTTCCGTACAGAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATC
CTGCACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCC
CGTAGGAAG

Secuencia a 15

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTTACAATACCGTCAAGCTCCTT
CACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCA
CGCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCTCACTGCTGCCTCCCGTAG
GAAG

Secuencia a 16

ATTACCGCGGTGCTGGCCCTGCTGCCTCCCATACGAAGGGTTAATTCCACCACACTGGCGGT
CGTTACTAGTGGATCCTAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG
TGTGAAATTGTTATCCACACTTGCGTCCATTGACCAATATTCTCACTGCTGCCTCCCGAAGG
AAG

Secuencia a 17

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 18

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 19

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTAAACCAGCCATGCC
GCGTGCAGGATGACGGTCCATGGATTGTAACTGCTTTTGTACGAGAAGAAACACTCCTTC

GTGAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCCGCGG
TAATAAG

Secuencia a 21

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCC
GCGTGCAGGATGACGGTCTATGGATTGTAAGTCTTTGTACGAGAAGAACTCCTTC
GTGAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCCGCGG
TAATAAG

Secuencia a 22

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 24

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 25

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 26

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 27

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTTACGATACCGTCAAGCTCCTTC
ACGAAGGAGTGTTTCTTCTCGTACAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCAC
GCGGCATGGCTGGTTCAGACTTGCGTCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGG
AAG

Secuencia a 28

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCC
GCGTGCAGGATGACGGTCTATGGATTGTAAGTCTTTGTACGAGAAGAACTCCTTC
GTGAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCCGCGG
TAATAAG

Anexo 6: Secuencias limpias de bacterias fotosintéticas favorables

Secuencia F 1

CCTACGGGAGGCAGCAGGGCCAGCACCCGCGTAATAAG

Secuencia F 2

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGGGCTTATTCTCCCGGTACAGTCATTATCTTCC
CGGGTAAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCATTGCTGGATCAGGC
TTTCGCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAAG

Secuencia F 3

GATTACCGCGGTGCTGGCCCTGCTGCCTCCCTAAGAAG

Secuencia F 4

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGGGCTTATTCTCCCGGTACAGTCATTATCTTCC
CGGGTAAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATTGCTGGATCAGGC
TTTCGCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAAG

Secuencia F 5

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
GCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGAAGATAATGACTGTAC
CGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCCGCGTAATAAG

Secuencia F 6

CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCC
GCGTGAGGATGACGGTCCTATGGATTGTAAGTCTTTTGTACGAGAAGAAACACTCCTTC
GTGAAGGAGCTTGACGGTATCGTAAGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCCGCGG
TAATAAG

Secuencia F 8

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGGGCTTATTCTCCCGGTACAGTCATTATCTTCC
CGGGTAAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCATTGCTGGATCAGGC
TTTCGCCATTGTCCAAAATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAAG

Secuencia F 9

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
GCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGAAAGATAATGACTGTTC
CGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCCGCGTAATAAG

Secuencia F 10

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
GCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGAAGATAATGACTGTAC
CGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCCGCGTAATAAG

Secuencia F 11

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGGGCTTATTCTCCCGGTACAGTCATTATCTTCC
CGGGTAAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCAGGCGGCATTGCTGGATCATGC
TTTCGCCATTGTCCAATATCCCCACTGCGTGGCTCCCGAATGAAG

Secuencia F 12

ATTACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGGGCTTATTCTCCCGGTACAGTCATTATCTCC
CGGGTAAAAGAGCTTTACAACCCTAGGGCCTTCATCACTCACGCGGCATTGCTGGATCAGGC
TTGCGCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAAG

Secuencia F 13

CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCC
GCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTACCCGGGAAGATAATGACTGTAC
CGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCACCGCGGTAATAAG

Secuencia F 14

CCTACGGGAGGCAGCAGGGCCAGCACCGCGGTAATAAG