

CARACTERIZACION MOLECULAR E IDENTIFICACIÓN FILOGENETICA DE MICROORGANISMOS MARINOS

Jorge Olmos Soto

Departamento de Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, B.C. Fax (646) 1 75 05 34, jolmos@cicese.mx

Palabras clave: Diversidad bacteriana, Metabolismo activo, FISH

INTRODUCCION. La diversidad de recursos marinos de nuestro planeta, así como su diversidad de climas, ha propiciado el desarrollo de la Acuicultura en la mayoría de los países que presentan costas, lo cual en la actualidad, ha generado una producción cada día mayor de diversas especies. Sin embargo, las especies sometidas a condiciones de acuicultura se caracterizan por presentar altos porcentajes de mortalidad, debido a la alta densidad de población, calidad de agua pobre y temperaturas extremas, lo que favorece el surgimiento de enfermedades bacterianas (1, 2). Las enfermedades bacterianas de los organismos en cultivo son el resultado de la interrelación de diversos factores, entre los que se encuentran; el medio ambiente, los patógenos y el organismo (3). Tomando en cuenta que la mayoría de los grupos bacterianos se encuentran representados en la flora natural de cualquier cultivo (4, 5), se puede considerar que sí las condiciones del hospedero y/o del medio ambiente son alteradas por alguna razón (cambios climáticos, densidad de población, nutrición, contaminación o algún otro tipo de estrés), las especies en cultivo se hacen susceptibles a la invasión masiva de bacterias oportunistas. Las cuales pueden proliferar y dominar el cultivo conforme se alteran y/o deterioran las condiciones del mismo, surgiendo entonces las enfermedades (6, 7).

Basándonos en lo anterior, surge la hipótesis que para poder prevenir o entender las enfermedades, es necesario conocer la diversidad bacteriana durante el desarrollo del cultivo y determinar como esta diversidad va cambiando con respecto a la evolución del cultivo y las condiciones del medio (pH, conductividad, turbidez, oxígeno disuelto, salinidad y temperatura). Con esta información se podría determinar cuales grupos bacterianos proliferan o disminuyen su población, cuando existe un cambio en alguna variable en particular, así como determinar que especies bacterianas fueron las responsables de las enfermedades de los organismos en cultivo (6, 7).

En la actualidad existen diferentes métodos de diagnóstico de enfermedades bacterianas en organismos marinos (8). Los métodos tradicionales se basan en pruebas bioquímicas y fenotípicas, sin embargo, estos métodos requieren el generar cultivos en el laboratorio, etapa en la cual se pierden aproximadamente el 98% de la especies. Además, requieren de un tiempo prolongado para su realización y no son muy confiables debido a que la morfología de las bacterias es demasiado simple y su bioquímica es muy conservada entre géneros, para ser empleadas como una base sólida de clasificación (9). Por otra parte, la utilización de anticuerpos está limitada a muy pocos organismos como es el caso de *Vibrio cholerae* 01 y 132 y la generación de éstos es costosa,

prolongada y pueden presentarse reacciones cruzadas (10). Por lo tanto, es notoria la necesidad de optimizar métodos precisos para el estudio de la diversidad bacteriana en granjas de acuicultura, así como para determinar el estado metabólico de las mismas (6, 7). Recientemente se han aplicado diversos métodos moleculares para identificar cualquier tipo de microorganismo en cualquier tipo de muestra, entre los que se encuentran; la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el PCR de Tiempo Real (RT-PCR), la Hibridación *In-Situ* Fluorescente (FISH) y la Secuenciación (6, 11, 12, 13, 14). Estos métodos están dirigidos a caracterizar e identificar regiones específicas de los ácidos nucleicos principalmente del *16S/18S rDNA/rRNA*. Este tipo de métodos alternativos se caracterizan por ser precisos y rápidos, además de permitir el análisis de un gran número de muestras ambientales sin necesidad de cultivar a los microorganismos presentes. En este sentido este trabajo presenta el estado del arte de la caracterización molecular e identificación filogenética de los grupos bacterianos presentes en granjas de cultivo utilizando sondas grupo-específicas para PCR y FISH.

IMPORTANCIA DEL DIAGNOSTICO EN LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES

El confinamiento de un gran número de organismos acuáticos en superficies de agua pequeñas como estanques, canales de corriente rápida, jaulas, etc., aumenta la probabilidad de que entren en contacto el organismo y los patógenos, generándose enfermedades de diversa índole. Los impactos ecológicos y económicos de estas enfermedades pueden ser costosos al afectar a las poblaciones de organismos comercialmente importantes, ocasionando mortalidades de magnitud variable que de acuerdo al agente causal involucrado llegan a ser hasta del 100% (1, 2, 15).

Existen otros agentes muy importantes involucrados en la promoción de enfermedades, entre los que destacan los contaminantes, la mala alimentación y la fluctuación de los parámetros físico-químicos del agua (pH, conductividad, turbidez, oxígeno disuelto, salinidad, y temperatura), los que a su vez generan la proliferación de bacterias y la mortalidad relacionada, cuya magnitud está determinada por la duración de estas alteraciones (3, 16).

El estudio y conocimiento de la diversidad y ecología bacteriana de los cultivos es de suma importancia para la Acuicultura en general, debido a que pueden ayudar a la prevención, diagnóstico y control de las enfermedades. El conocimiento de los agentes causales que provocan las enfermedades en los cultivos permite tomar las medidas adecuadas, presentándose así la posibilidad de disminuir o

evitar pérdidas por mortalidad (1, 15, 17). Sin embargo, la literatura existente donde se aborda esta problemática de una manera integral y confiable es escasa (6, 18, 19), debido principalmente a que el cultivo del supuesto patógeno es el paso más complicado. Ya que como se mencionó anteriormente, el 98% de las especies bacterianas no crecen en el laboratorio debido a los requerimientos variados y específicos de nutrientes y elementos que necesitan para su desarrollo. Lo que ocasiona el aislamiento e identificación de bacterias que en la mayoría de los casos no son las responsables de la enfermedad.

Con el advenimiento de las metodologías moleculares y la aplicación del PCR para el diagnóstico de bacterias patógenas, el tiempo y la exactitud para identificar bacterias se han visto favorecidos grandemente. Sin embargo, si consideramos que la identificación por PCR se sigue realizando en la mayoría de los casos utilizando cepas aisladas en medios de cultivo, el enfoque sigue estando equivocado. Es indudable que se va a identificar adecuadamente a la bacteria seleccionada en el medio, sin embargo, es poco probable de que se trate del agente causal. Recientemente, la amplificación de DNA de bacterias provenientes de cualquier tipo de muestra sin necesidad de cultivarlas, han abierto nuevos horizontes en el diagnóstico rápido y preciso de estos microorganismos (6, 11, 12, 20). En este sentido, es importante mencionar que el uso del PCR convencional es útil pero no conclusivo en la mayoría de los casos, por lo que se requieren metodologías más precisas (RT-PCR y FISH), que permitan cuantificar y determinar el estado metabólico de las bacterias patógenas en los organismos cultivados. En este sentido, la aplicación de ambas metodologías (12, 20, 21, 22), ha venido a darle un carácter conclusivo a la identificación de los agentes causales de enfermedades sin necesidad de cultivarlos. Estas metodologías utilizan principalmente oligonucleótidos dirigidos a los ácidos nucleicos *16S rDNA/rRNA* (23).

RELACION AMBIENTE-PATOGENO-ORGANISMO

Con el objeto de establecer las causas que originan enfermedades en los cultivos de organismos acuáticos, se deben considerar los factores que intervienen en el cultivo de los mismos, los cuales son: el medio ambiente, el agente patógeno y el organismo (3, 6, 7). Así, tenemos que los factores del hospedero son: inmunidad, edad (los ejemplares jóvenes son más susceptibles a las enfermedades), el estado de nutrición en que se encuentren y el estado de salud. Por último, el manejo a que son sometidos los ejemplares en las maniobras de cultivo, tales como el pesado, separación por tallas, determinación de la madurez sexual, transporte y la transferencia entre estanques, etc., además de producir lesiones también producen estrés o tensión que debilita a los ejemplares.

Los factores correspondientes al patógeno son: virulencia (grado de patogenicidad o fuerza relativa del patógeno) y la dosis infectiva (número de patógenos presentes). Los factores del medio ambiente son: calidad del agua, densidad de carga por unidad de área, presencia o ausencia de contaminantes y el manejo de las instalaciones (3). La figura

1 muestra un ejemplo que expone la participación de las causas en el total de las pérdidas de un cultivo de trucha. Las enfermedades y las variaciones del medio ambiente son responsables de hasta el 50% de las pérdidas totales, mientras que el resto se distribuye entre transporte, predadores, errores humanos, corte de agua y diseño defectuoso (2, 24, 25).

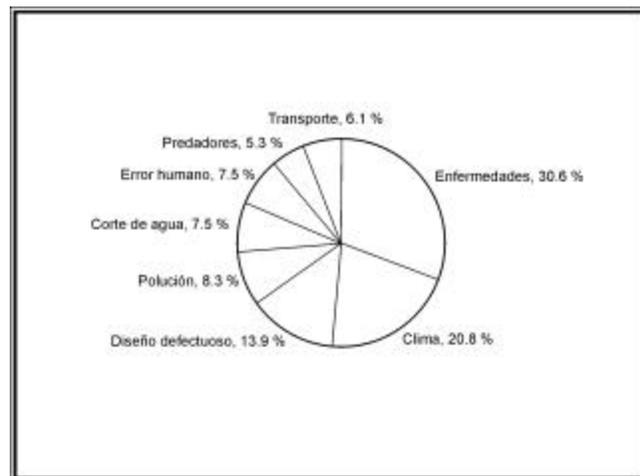


Figura 1. Representación esquemática de los porcentajes de pérdida en acuicultura (Coll, 1983).

De lo anterior, se puede concluir que cuando el balance entre uno o varios de los factores mencionados es alterado por alguna razón, la probabilidad de que aparezca una enfermedad es alta. Dicho de otra manera, cuando el hospedero y el patógeno están presentes al mismo tiempo (fenómeno denominado exposición) y en ese momento se presenta alguna alteración del medio (ej. aumento de la temperatura del agua) la cual favorezca al patógeno, entonces se produce una enfermedad (fig 2) (3).

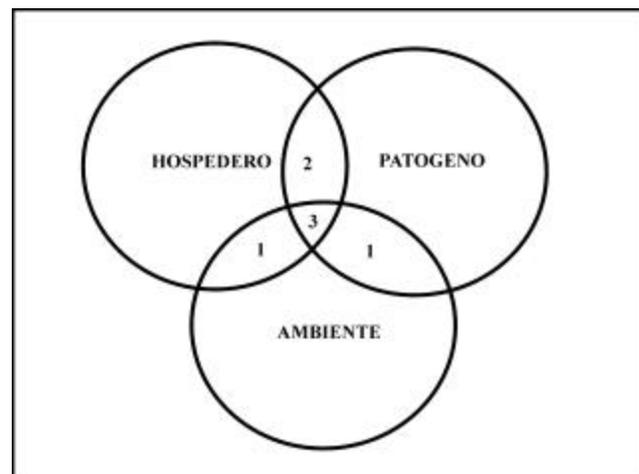


Figura 2. Ilustra el balance involucrado en el estado de salud o enfermedad de un organismo cultivado (Coll, 1983).

POBLACIONES, GRUPOS Y COMUNIDADES BACTERIANAS

La mayoría de los estudios que se han realizado con bacterias han sido enfocados a investigar a estas células como organismos independientes, sin tomar en cuenta el comportamiento de estas como partes integrales de los grupos o comunidades que forman en los microambientes que habitan (26, 27).

Las bacterias viven en la naturaleza en asociación con especies de su mismo género con las que comparten características genéticas, bioquímicas y fisiológicas, a estas asociaciones se les conoce como poblaciones. Las poblaciones metabólicamente relacionadas comprendidas por especies de diferentes géneros forman los grupos bacterianos, los cuales a su vez se asocian con otros grupos metabólicamente compatibles para formar las comunidades (9). Las poblaciones, grupos y/o comunidades microbianas interactúan de varias maneras provocando un efecto benéfico o perjudicial en los ecosistemas u hospederos que habitan. Es importante resaltar que la gran mayoría (95–98 %) de las especies bacterianas que habitan en todos los ecosistemas conocidos producen un efecto benéfico en los mismos. Provocando en la mayoría de los casos un efecto cooperativo en la degradación y por ende en la mejor asimilación de los nutrientes, así como en la reutilización de los productos de desecho del metabolismo de otras especies bacterianas. Además de producir metabolitos secundarios que restringen o inhiben el crecimiento de otras especies (9). Vale la pena recordar que las bacterias son células microscópicas que viven en microambientes, por lo que en un ecosistema de muy pocas dimensiones o en un tejido de un hospedero, pueden existir una o varias comunidades bacterianas metabólicamente activas bajo condiciones físicas, químicas y metabólicas diferentes. Los microambientes difieren marcadamente en sus características, por lo que el que es favorable para el crecimiento de un microorganismo puede ser perjudicial para el crecimiento de otro. Así, las comunidades bacterianas en los microambientes están condicionadas en gran medida por las características físicas y químicas del medio ambiente que las rodea. Por lo tanto, se puede concluir que el estado de salud o enfermedad de un ecosistema (hospedero) depende colectivamente del hospedero, las bacterias y el medio ambiente que prevalece en esos momentos. En este sentido, las características de un ecosistema son controladas de manera significativa por las actividades de los microorganismos que allí habitan.

MICROORGANISMOS COMO AGENTES PATÓGENOS

Una de las metas más importantes de los microbiólogos es entender como los microorganismos realizan sus funciones moleculares, bioquímicas y fisiológicas, para con este conocimiento generar sistemas que ayuden a incrementar el beneficio que los microorganismos pueden aportar y por otro lado disminuir los efectos nocivos que pudieran ocasionar. Durante el último siglo, los microbiólogos han sido muy exitosos en alcanzar estas metas, lo cual ha generado que los microorganismos jueguen un papel muy importante en el

gran avance que ha tenido la humanidad en muchos campos de la ciencia, principalmente en la salud humana (9). El control de las enfermedades infecciosas es el resultado del entendimiento de los procesos de la enfermedad, así como de las mejoras en las prácticas sanitarias, el uso de agentes antimicrobianos adecuados y el entendimiento de la interrelación del patógeno con el ambiente que lo rodea. En este sentido en la acuicultura, el entendimiento de estos parámetros se encuentra en las primeras etapas de su desarrollo aun y cuando la práctica en el cultivo de organismos acuáticos es una actividad muy antigua en todo el mundo.

BACTERIAS PATÓGENAS EN ORGANISMOS MARINOS CULTIVADOS

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias son muy frecuentes entre las poblaciones de animales cultivados (1, 15, 28, 29, 30). Sin embargo, muy pocas de las bacterias han sido aisladas y caracterizadas debido a que la mayoría de ellas no son cultivables en el laboratorio. Una de las consideraciones más importantes de la biotecnología marina actual, es precisamente el desarrollo de metodologías adecuadas para la detección, prevención y control de este tipo de enfermedades infecciosas (fig. 3) (6, 7, 21). Las bacterias que pertenecen a las familias *Citofagaceae*, *Pseudomonaceae* y *Vibrionaceae*, son principalmente bacterias del tipo quitinolítico que causan severas enfermedades en el caparazón de los crustáceos, además de septicemias, o bien pueden afectar los primeros estadios larvarios de camarón y moluscos bivalvos.

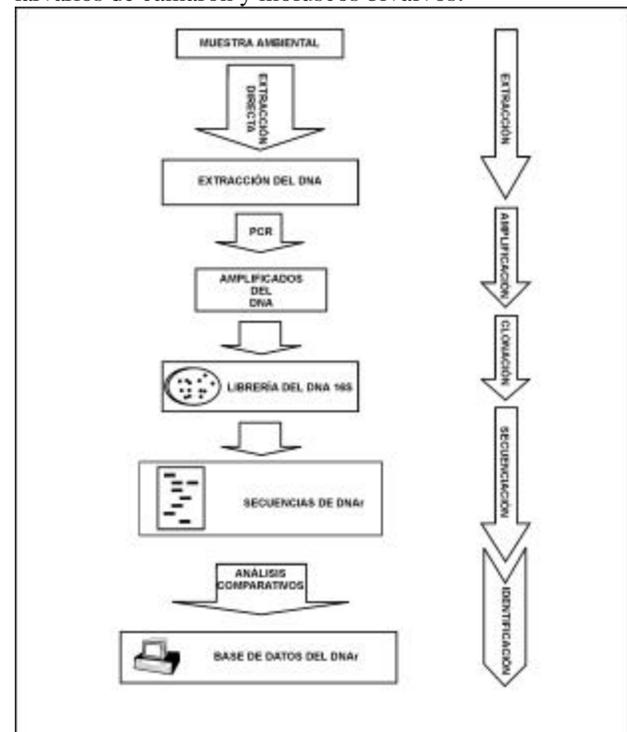


Figura 3. Diagrama de flujo que muestra la metodología para caracterizar filogenéticamente muestras ambientales por análisis comparativo de la secuencia del *16S rDNA* (Aman *et al.*, 1995).

IDENTIFICACIÓN CORRECTA DE ESPECIES BACTERIANAS

Un malentendido común y generalizado, es creer que los microorganismos provenientes de un ecosistema que han sido aislados en cultivos puros, representan las especies metabólica y numéricamente dominantes en ese medioambiente. De hecho, los microorganismos aislados usando métodos de cultivo tradicionales son raramente dominantes en las comunidades o ambientes en donde fueron aislados. En este sentido, estos microorganismos son aislados en virtud de su habilidad para crecer rápido en medios de cultivo artificiales altos en nutrientes, bajo condiciones aeróbicas y temperaturas moderadas. Los microorganismos que se aíslan fácilmente en medios de cultivo han sido la base de la microbiología, pero constituyen solo el 1% de todas las especies microbianas existentes. Es lógico pensar que si un microorganismo crece fácilmente en un medio de cultivo, el estudio genético, bioquímico y fisiológico se va a facilitar, por lo cual no es extraño que aproximadamente del 65-70 % del conocimiento que existe con respecto a especies bacterianas provenga de géneros fácilmente cultivables (31). Por lo tanto, es de vital importancia para la acuicultura, cambiar las estrategias de identificación de especies o grupos bacterianos presentes en los organismos cultivados. También es importante entender el papel que juegan los factores ambientales en la diversidad y metabolismo de estas especies. Consecuentemente, son necesarias nuevas metodologías que sean más sensitivas y confiables para la identificación de especies y grupos bacterianos sin necesidad de recurrir al cultivo, que permitan la identificación directa del 100% de las especies y que ayuden a conocer el estado metabólico de las mismas. En la actualidad estas metodologías (RT-PCR, FISH), están revolucionando las perspectivas de la microbiología (6, 12, 20, 22, 32).

EL 16S rRNA/rDNA COMO HERRAMIENTA CONFIABLE DE IDENTIFICACIÓN

La capacidad para establecer relaciones filogenéticas entre los microorganismos utilizando el DNA/RNA ribosomal (*rDNA/rRNA*), ha sido ampliamente estudiada en los últimos años (11, 13, 14, 23, 31). Basándose en las relaciones evolutivas entre los diferentes microorganismos, desde 1969 Whittaker ha publicado nuevas reclasificaciones a los dos reinos hasta entonces aceptados. Estos mismos criterios han permitido definir el origen de los procariotas, eucariotas, mitocondrias y cloroplastos, una perspectiva que ha sido derivada de los datos de secuencia de proteínas y principalmente de los ácidos nucleicos (31, 33). El gran éxito del 16S *rDNA* se basa en la existencia de secuencias altamente conservadas (universales) entre los diferentes organismos, así como en secuencias altamente variables (específicas), entre especies y grupos bacterianos (6, 11, 23, 34).

La utilidad molecular del rRNA ha sido ampliamente aceptada debido a que éstas moléculas se encuentran en todos los organismos formando parte de los ribosomas y posee una relación estructura-función bien definida en la

síntesis de proteínas (35). Finalmente, otra característica de esta molécula semantofórica es que no se ha observado transferencia horizontal de material genético entre los microorganismos (23, 36, 37).

IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA POR MEDIO DE FISH

Desde la primera publicación relacionada con la tinción de células microbianas individuales usando oligonucleótidos marcados fluorescentemente y dirigidos al rRNA (21), el uso de esta metodología en el estudio y comprensión de la diversidad y el estado metabólico de los microorganismos en ambientes naturales se ha incrementado rápidamente (5, 6, 17, 20). Braun en 1992 desarrolló oligonucleótidos fluorescentes para la identificación de células bacterianas utilizando específicamente el 16S rRNA. Debido a la abundancia de ésta molécula en las células en crecimiento, la unión de las sondas fluorescentes a células individuales es fácilmente visualizada en un microscopio de epifluorescencia. Por lo tanto, la intensidad de la señal es un parámetro de medición directa del estado metabólico de las bacterias. Dicho de otra manera, cuando una célula se encuentra en crecimiento activo (fase de crecimiento exponencial) la cantidad de ribosomas puede alcanzar hasta 2000 unidades, lo que significa que hay 2000 moléculas del 16S rRNA con las cuales la sonda marcada puede hibridizar, dando como resultado una intensidad muy alta. Por otro lado, cuando la célula está iniciando o terminando su crecimiento la cantidad de ribosomas en el citoplasma es casi nula, dando como resultado una señal baja o inexistente. El uso simultáneo de sondas marcadas con diferentes cromóforos, permite la identificación de especies o grupos celulares diferentes bajo el mismo campo microscópico, dando una idea de la diversidad bacteriana en la muestra. Además, los oligonucleótidos no radiactivos poseen varias ventajas como son: una vida media larga, rápida detección sin necesidad de autorradiografía, reactivos más económicos y sin el riesgo que presenta la radiactividad (20, 34). En sus trabajos, Braun también evaluó diferentes parámetros para determinar el efecto de estos sobre la intensidad del marcaje fluorescente. Dentro de estos parámetros analizó el tipo de fijador, el tiempo de fijación, los tratamientos con metanol/formaldehído y borohidrato. Sus resultados indicaron que la técnica de FISH era útil para diferentes tipos celulares, incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas y concluyó que esta metodología era especialmente aplicable a muestras ambientales, las cuales comprenden diversos tipos celulares en diferentes estadios y requieren ser almacenadas antes de su estudio. En 1996, trabajos publicados por Frischer, revelaron la importancia de la localización de la secuencia blanco dentro de la molécula del rRNA y definieron criterios que deben tomarse en cuenta para el diseño de la sonda. Este mismo grupo de trabajo diseñó diferentes sondas dirigidas a sitios específicos del 16S rRNA, lo que permitió identificar diferentes grupos de proteobacterias. Esta metodología también ha sido utilizada para monitorear grupos bacterianos en organismos marinos (6, 18, 19),

sedimentos activados (5, 39, 40, 41) y bio-películas (42). Igualmente se ha empleado en la enumeración de bacterias en el medio ambiente (43, 44), para la caracterización de poblaciones eubacterianas en rúmen (45), en la medición de las variaciones poblacionales bacterianas en heces humanas (46), así como para identificar endosimbiontes en protistas y nódulos de raíz (34). Sin embargo, muy pocos son los trabajos publicados que analizan la diversidad bacteriana total y diferencian entre los grupos bacterianos activos y no activos metabólicamente, usando como modelo de estudio un organismo marino. En el año 2000, Hernández trabajo con la estandarización de las técnicas de PCR y FISH, para estudiar la diversidad y el estado metabólico de las bacterias presentes en el ostión japonés *Cassostrea gigas* (fig. 4). Es importante mencionar que este trabajo sienta las bases para el estudio de la diversidad bacteriana en organismos marinos cultivados y demuestra que éstas metodologías son muy efectivas y confiables, permitiendo analizar un gran numero de muestras en un tiempo corto.

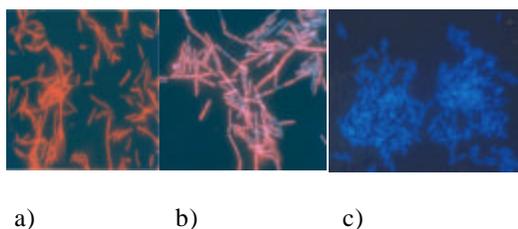


Figura 4. Diversidad bacteriana presente en *Crassostrea gigas* analizada por medio de FISH. A) Bacterias identificadas con la sonda para el grupo alfa, conteniendo el fluorocromo Cy5. B) Bacterias identificadas con la sonda para el grupo bajas en G+C, conteniendo el fluorocromo 5(6)-Rox y DAPI como control positivo. C) Eubacterias identificadas con la sonda universal conteniendo el fluorocromo Marina Blue (Hernández, 2000).

DISEÑO DE SONDAS

Las sondas género y grupo específicas que se han utilizado en los protocolos mencionados, en general han sido diseñadas de las mismas regiones del *16S rDNA* (6, 7, 12, 20). Las sondas varían en longitud desde 15 a 20 bases y son específicas para los siguientes grupos: Clase Proteobacterias, Bacterias Gram positivas altas y bajas en G+C, *Pseudomonas* que fluorescen y *Flavobacterias*. La tabla 1 menciona las sondas que se utilizaron en el trabajo publicado por Hernández en el 2000, algunas de ellas presentan ligeras modificaciones a las publicadas y otras fueron diseñadas *de novo* con el fin de detectar el mayor numero de grupos bacterianos presentes en los organismos cultivados. Es importante mencionar que las sondas utilizadas para PCR son las mismas que se utilizan para FISH y RT-PCR, solo con la adición del cromóforo seleccionado.

Tabla 1.

GRUPOS BACTERIANOS ANALIZADOS POR PCR Y FISH	SONDA COMPLEMENTARIA AL 16S RNAr	FLUOROCROMO UTILIZADO
Proteobacterias alfa	cgagagtgtagccggggc	Cianina Cy5
Proteobacterias beta	tcactgctacacgctg	Carboxi-rodamina 6G
Proteobacterias delta	gcttgcatagcaagagg	Carboxi-rodamina 6G
Proteobacterias gama	ctttgcaagccact	Carboxi-X-rodamina
Gram positivas altas en G+C	ccctgatctcggca	Fluoresceína-Iso
Gram positivas bajas en G+C	tgtagcccaaggtcata	Carboxi-X-rodamina
<i>Pseudomonas</i> sp. (fluorescentes)	ccctctcccactt	Cianina Cy5
Citofaga/ <i>Flavobacter</i>	tcagtagocaggtggggg	Fluoresceína-Iso

Tabla 1. Sondas género y grupo específicas utilizadas en el análisis de la diversidad bacteriana presente en *C. gigas* (Hernández, 2000; Olmos, 2003).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de CONACyT proyecto No. 34035-V. Quiero agradecer a la QFB. Rosalía Contreras Flores por su asistencia técnica y a la MC. Galdy Hernández Zarate por su valiosa aportación a esta línea de investigación.

LITERATURA CITADA

- Muroga, K. 2001. Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture*, 202:23-44.
- Cunningham, C.O. 2002. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture*, 206:19-55.
- Coll, J. 1983. *Acuicultura marina animal*. Mundi-Prensa. Primera edición. Madrid. 670 pp.
- Lim, E.L., Caron, D.A. & Delong, E.F. 1996. Development and Field Application of a Quantitative Method for Examining Natural Assemblages of Protists with Oligonucleotides Probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1416-1423.
- Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R. & Amann, R. 1998. Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:2691-2696.
- Hernández, Z.G. 2000. Estandarización de las metodologías de FISH y PCR y su utilización en la identificación filogenética de comunidades bacterianas en ostión (*Crassostrea gigas*). Tesis de Maestría, CICESE.
- Olmos, S.J. 2003. Caracterización molecular de bacterias patógenas de organismos marinos cultivados. En: *Bioteología Marina*. Paniagua, JJ. Trillas, México. En revisión.
- Austin, B. 1988. *Methods in aquatic bacteriology*. John Wiley and Sons, Inc. Primera Edición. New York. 425 pp.

9. Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2000. Brock; Biology of Microorganisms. Prentice Hall. Novena Edición. NJ. 991 pp.
10. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Segunda Edición. U.S.A. 1.47 pp.
11. Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R. & Stahl, D.A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annual Review of Microbiology, 40:337-365.
12. Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59:143-169.
13. Olmos, J., Paniagua, J. & Contreras, R. 2000. Molecular identification of *Dunaliella spp.* utilizing the *18S rDNA* gene. Letters in Applied Microbiology, 30:421-423.
14. Arellano, C.F. & Olmos, S.J. 2002. Thermostable α -1,4- and α -1,6-glucosidase enzymes from *Bacillus sp.* isolated from a marine environment. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18:791-795.
15. Mialhe, E., Bachere, E., Boulo, V., Cadoret, J.P., Rousseau, C., Cedeno, V., Saraiva, E., Carrera, L., Calderon, J. & Colwell, R.R. 1995. Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates. Molecular Marine Biotechnology, 4:275-283.
16. McVey, J. 1993. Handbook of mariculture. CRC Press. Segunda edición. Boca Raton.
17. Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T.R., Szewzyk, U. & Lawrence, J.R. 1999. Phylogenetic Composition, Spatial Structure, and Dynamics of Lotic Bacterial Biofilms Investigated by Fluorescent *in situ* hybridization and Confocal Laser Scanning Microscopy. Microbial Ecology, 37:225-237.
18. Sipe, A.R., Wilbur, A.E., & Cary, S.C. 2000. Bacterial symbiont transmission in the wood-boring shipworm *Bankia setacea (Bivalvia: Teredinidae)*. Applied and Environmental Microbiology, 66:1685-1691.
19. Webster, N.S., Wilson, K.J., Blackall, L.L. & Hill, R.T. 2001. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. Applied and Environmental Microbiology, 67:434-444.
20. Frischer, M., Floriani, P. & Nierzwicki, A. 1996. Differential sensitivity of *16S rRNA* targeted oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization is a result of ribosomal higher order structure. Canadian Journal of Microbiology, 42: 1061-1071.
21. DeLong, E., Wickham, G. & Pace, N. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science, 243:1360-1363.
22. Bellin, T., Pulz, M., Matussek, A., Hempen, H.G. & Gunzer, F. 2001. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. Journal of Clinical Microbiology, 39:370-374.
23. Olsen, G.J. & Woese, C.R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB Journal, 7:113-123.
24. Inglis, V. 1993. Bacterial diseases of fish. John Wiley and Sons, Inc. Primera Edición. Great Britain. 312 pp.
25. Jeney, Z. 1995. Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 129:397-420.
26. Shapiro, J.A. & Dworkin, M. 1997. Bacteria as multicellular organisms. Oxford University Press. Primera Edición. New York. 466 pp.
27. Dunny, G.M. & Winans, S.C. 1999. Cell-cell signaling in bacteria. ASM Press, Washington DC. 367 pp.
28. Kinne, O. 1980. Diseases of marine animals: General aspects. John Wiley and Sons, Inc. Primera Edición. Germany, 2618 pp.
29. Sindermann, C. 1980. Principal diseases of marine fish and shellfish. Academic Press, Inc. U.S.A. 521 pp.
30. Wiik, R., Stackebrandt, E., Valle, O., Daae, F.L., Rodseth, O.M. & Andersen, K. 1995. Classification of fish-pathogenic vibrios based on comparative 16S rRNA analysis. International Journal of Systematic Bacteriology, 45:421-428.
31. Hugenholtz, P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. <http://genomebiology.com/2002/3/2/reviews/0003.1>.
32. Edwards, K.J., Kaufmann, M.E. & Saunders, N.A. 2001. Rapid and accurate identification of coagulase-negative *staphylococci* by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, 39:3047-3051.
33. Schwartz, R.M. & Dayhoff, M.O. 1978. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. Science, 199:395-403.
34. Assmus, B., Schloter, M., Kirchhof, G. Hutzler, P. & Hartmann, A. 1997. Improved *in situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides. Microbial Ecology, 33:32-40.
35. Lewin, B. 2000. Genes VII, Oxford University Press, New York. 1008 pp.
36. Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsens, K.R., Chen, K.N. & Woese C.R. 1980. The phylogeny of prokaryotes. Science, 209:457-463.
37. Gray, M.W., Sankoff, D. & Cedergren, R.J. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Research, 12:5837-5852.
38. Braun, E., Danielsen, S. & Nierzwicki, S. 1992. Development of a rapid method for detecting bacterial cells *in situ* using 16S rRNA-targeted probes. Biotechniques, 13:928-933.
39. Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. & Schleifer, K.H. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. Applied and Environmental Microbiology, 60:792-800.

40. Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:2884-2896.
41. Bruns, A. & Berthe, L. 1998. *In situ* detection of bacteria in continuous-flow cultures of seawater sediment suspensions with fluorescently labelled rRNA-directed oligonucleotide probes. *Microbiology*, 144: 2783-2790.
42. Poulsen, L.K., Ballard, G. & Stahl, D.A. 1993. Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:1354-1360.
43. Heidelberg, J.F., O'Neill, K.R., Jacobs, D. & Colwell, R.R. 1993. Enumeration of *Vibrio vulnificus* on membrane filters with a fluorescently labeled oligonucleotide probe specific for Kingdom-level 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:3474-3476.
44. González, J. & Moran, M. 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alfa-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:4237-4242.
45. Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R. & Montgomery, L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 54:1079-1084.
46. Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F. & Welling G.W. 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:336-3345.