



Producción de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizados con cultivos rizobianos nativos y cepas patrón

Production of antibodies in *Oryctolagus cuniculus* immunized with native rhizobial strains crops and pattern

Bertha Soriano Bernilla, Adalberto Gonzales Varas, Manuela Luján Velásquez, Jaime Agreda Gaitán y Eduardo Muñoz Ganoza

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Especímenes de *Oryctolagus cuniculus* fueron inmunizados con cultivos rizobianos nativos *Bradyrhizobium* sp, RC-455-02 y *Rhizobium* sp. Rf 167-01 Rf 167-02, así como con Cepas rizobianas patrón: *Bradyrhizobium* sp CIAT 71, *Rhizobium tropici* CIAT 899 y CIAT 632, con la finalidad de producir anticuerpos específicos y comparar los títulos. Las cepas fueron sembradas en medio Agar Levadura Manitol (LMA); los antígenos rizobianos fueron preparados a la concentración de $1,2 \times 10^9$ bact/mL, La inmunización de los conejo se hizo con una mezcla de una emulsión de dos mL de antígeno con dos mL de adyuvante completo de Freund, por vía intramuscular y a las dos y cuatro semanas se inoculó el antígeno con adyuvante incompleto de Freund. Se encontró que la mayoría de sueros inmune presentaba un título de anticuerpo de 1280 contra las diferentes cepas rizobianas empleadas.

Palabras clave: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Oryctolagus cuniculus*, anticuerpos.

ABSTRACT

Oryctolagus cuniculus specimens were immunized with native rhizobial cultures *Bradyrhizobium* sp, RC-455-02 and *Rhizobium* sp. Rf Rf 167-01 167-02 and rhizobial strains with pattern: *Bradyrhizobium* sp CIAT 71, *Rhizobium tropici* CIAT 899 and CIAT 632, in order to produce specific antibodies and compare titles. Strains were plated on Yeast Mannitol Agar (AML); the rhizobial antigens were prepared at a concentration of 1.2×10^9 bact/mL of the rabbit immunization was with a mixture of an emulsion of two mL of antigen plus two mL of complete Freund's adjuvant, intramuscularly and at two to four weeks another inoculation with incomplete adjuvant. It was found that most of the immune sera showed a titer of antibody 1280 against various rhizobial strains employed.

Keywords: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Oryctolagus cuniculus*, antibodies.

INTRODUCCIÓN

Entre los diferentes sistemas biológicos capaces de fijar N₂ atmosférico, la simbiosis que ocurre entre *Rhizobium* y leguminosa constituye el más importante; aportando de esta manera el nitrógeno necesario al ecosistema y a la producción de alimentos¹. En la mayoría de lugares agrícolas la fuente primaria (80%) del nitrógeno ocurre a través de dicha simbiosis; por ello la FBN es de considerable importancia, pues se ha reportado que en leguminosas noduladas, bajo determinadas condiciones ambientales (suelos pobres en este elemento) pueden fijar hasta 325 kg N₂ /Ha /año².

La producción agrícola basada en leguminosas es fundamental para la alimentación humana, especialmente si se encuentra en equilibrio con el ambiente. Es por esta razón que una interacción natural de estas plantas con una bacteria del suelo a nivel de la raíz, es ecológicamente importante, como medida para evitar el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados que deterioran el suelo y contaminan el ambiente³.

La identificación de cepas de *Rhizobium*, sobre todo el aislamiento de cepas nativas, sigue siendo uno de los principales problemas relacionados con estudios de competencia. Dado que no existe ningún método universalmente aceptado, el método de elección depende de las preferencias, experiencia y equipo; es decir, para emprender cualquier tipo de evaluación de cepas de *Rhizobium* en condiciones naturales, competitividad, persistencia en suelo, uso apropiado de inoculantes y en estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos; es indispensable su identificación².

En tal contexto, estudios de la serología de rizobios muestran que existe una especificidad en la simbiosis entre el rizobio y la leguminosa; es decir, siempre y cuando la raíz de la planta hospedera, encuentre durante su desarrollo, rizobios compatibles y eficientes podrán inducir la formación de nódulos completamente efectivos²; esto se verificó utilizando diversas cepas de *Rhizobium* capaces de formar nódulos en habas, *Vicia faba*, mostrando todas ellas una serología diferente⁴. Asimismo, se emplearon cepas de arverjas las cuales fueron enfrentadas con anticuerpos contra las cepas de frijoles y luego del análisis de longitud de los fragmentos de restricción polimórficos, dirigidos a las regiones de ADN que codifica el rRNA y la nodulación, se indicaron que los nódulos de las cepas de *Rhizobium* de *V. faba* se distinguen de los de *Pisum sativum*, *V. villosa*, y *Trifolium spp.*⁴.

La información existente acerca de la especificidad y la variación de efectividad en la fijación de nitrógeno por parte de *Rhizobium*, al igual que la producción de anticuerpos específicos de los rizobios nativos nos ayudaría de manera rápida y segura a identificar a los rizobios específicos infectivos y efectivos y puedan ser empleados con provecho en la agricultura, eliminando en cierta medida los químicos contaminantes.

En este informe se presentan los resultados de una investigación dirigida a determinar el nivel de anticuerpos producidos por *Oryctolagus cuniculus* “conejo” inmunizado experimentalmente con cultivos rizobianos nativos: *Bradyrhizobium* sp. RC-455-02 simbióticamente eficiente en Frejol, *Rhizobium* sp. Rf167-01 simbióticamente eficiente en Frejol, Rf167-02, Rc458-01 y Cepas rizobianos patrón: *Bradyrhizobium* sp CIAT71 y *Rhizobium tropici* CIAT899 y CIAT632.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo Rizobianos:

De la Colección de cultivos rizobianos del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo se obtuvieron:

- *Bradyrhizobium* sp. nativo RC-455-02 simbióticamente eficiente en Frejol
- *Rhizobium* sp. nativo Rf 167-01 simbióticamente eficiente en Frejol Rf 167 - 02, Rc 458-01

Del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) se obtuvieron las Cepas rizobianos patrón:

- *Bradyrhizobium* sp CIAT 71, aislada de *Stylosanthes guianensis*.
- *Rhizobium tropici* CIAT 899 y CIAT 632

Reactivación de cepas

La reactivación de cada cepa consistió en romper cuidadosamente la ampolla en la mitad de la zona ocupada por el tampón, mediante la ayuda de una lima. Seguidamente se agregó a la ampolla 3 gotas de peptona al 0.1%, tratando de bañar las paredes, con la finalidad de recuperar todas las células de *Rhizobium* que se encontraran presentes.

Luego, se extrajo la suspensión de la ampolla con una pipeta Pasteur, y se colocó una gota de esta suspensión en cuatro placas Petri, conteniendo el medio Agar Levadura Manitol (LMA); se realizó mediante estrías de las gotas de la suspensión con un asa bacteriológica estéril y luego se incubó a 28°C por 7 a 10 días. Posteriormente se evaluó el crecimiento de las cepas y la pureza de las mismas, con lo cual se realizó un cultivo puro en Agar Levadura Manitol (LMA). Este procedimiento de reactivación se realizó para cada una de las cepas liofilizadas⁵. Los cultivos rizobianos nativos fueron reactivados en Agar Levadura Manitol (LMA), de acuerdo al paso anterior.

Obtención de antígenos a partir de cultivos rizobianos nativos y cepas patrón ya reactivadas

A partir de los cultivos rizobianos nativos y cepas patrón, se realizó la siembra en frascos Roux conteniendo Agar Levadura Manitol (LMA), y se incubaron entre 28 – 30 °C por 3 a 7 días, hasta observar el crecimiento de las colonias⁶. Luego se procedió a determinar la pureza del cultivo mediante la técnica de coloración Gram².

Preparación de antígenos somáticos

Una vez determinada la pureza de los cultivos se realizó la cosecha o recolección de las colonias completamente desarrolladas en LMA, que consistió en agregar asepticamente 10 mL aproximadamente de solución salina fisiológica estéril (SSFE), irrigando completamente la superficie del medio. Esta suspensión se vertió en tubos de ensayo completamente estériles; luego, se centrifugó los tubos con suspensión de células rizobiales para eliminar cualquier antígeno soluble y flagelar, se desechó el sobrenadante y se re - suspendió nuevamente el sedimento con SSFE. Este paso se repitió tres veces, teniendo en cuenta que la última suspensión celular se ajustara aproximadamente a una concentración de 1×10^9 células/mL. Luego se procedió a transferir las suspensiones a botellas estériles, las cuales se taparon con un tapón de caucho estéril con insertada una aguja (N° 23); finalmente, se calentó la solución del antígeno, sumergiendo parte de la botella en agua hirviendo durante aproximadamente 1 hora, para eliminar cualquier antígeno flagelar restante^{2,5}.

Inmunización de los conejos.

Para el siguiente procedimiento se emplearon 14 conejos de la raza Nueva Zelanda, de los cuales 2 se emplearán como controles, los restantes para la inmunización con los cultivos rizobianos y las cepas patrones; los conejos fueron de aproximadamente 3 meses de nacido, procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS).

Antes de la inmunización de los conejos problemas, se obtuvo sangre de uno de los conejos controles, para obtener el suero pre-inmune. Se extrajo 3-4 mL de sangre mediante punción cardiaca y se colocó en tubo de ensayo sin anticoagulante, el cual se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos. Mediante una pipeta Pasteur se removió el suero y colocó en un tubo estéril, el cual se incubó en baño María por 30 minutos a 56°C para inactivar el complemento. El suero pre-inmune se almacenó en frascos adecuados a -20°C, para ser usado como control negativo⁷.

Para la inmunización del conejo se preparó una emulsión de 2 mL de antígeno con 2 mL de adyuvante completo de Freund, que se mezclaron homogéneamente hasta llegar una consistencia adecuada, la cual se inoculó vía intramuscular en la pata posterior del conejo². Después de 2 y 4 semanas se inoculó nuevamente el antígeno con adyuvante incompleto de Freund, para reforzar la respuesta inmunológica⁷.

Determinación de títulos de anticuerpos anti-rizobios.

Aproximadamente a una semana después de la última inoculación, se realizaron diversas pruebas para determinar la formación de anticuerpos, las cuales consistieron:

En primer lugar, se extrajo sangre a los conejos a través de la vena marginal de la oreja aproximadamente de 1-2 mL., las cuales se centrifugaron a 2000rpm por 15 minutos (bajo refrigeración si fuera posible). Se colectó el suero inmune en tubos estériles para la posterior determinación cualitativa de anticuerpos anti-rizobianos². Una vez determinada cualitativamente la presencia de anticuerpos anti-rizobios, se procedió a extraer 30 a 50 mL de sangre de cada conejo mediante punción cardiaca, la cual se

colectó en recipientes adecuados y se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos. Luego, se transfirió el sobrenadante a recipientes adecuados, una parte se empleó en la determinación del título de anticuerpos y el resto se procedió a refrigerarlo hasta su posterior empleo en pruebas de competitividad; para la determinación del título de anticuerpos anti rizobianos producidos en cada uno de los conejos, se utilizó la técnica de aglutinación en tubo².

Conservación de los anticuerpos.

Los anticuerpos purificados fueron almacenados en pequeñas alícuotas de 100 – 500 µl, previamente se agregó azida sódica a una concentración 0.02 % (W/V), para evitar la contaminación microbiana. A continuación las alícuotas se almacenaron en un congelador a -20°C, se evitaron los cambios bruscos de temperatura.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se presentan en tablas y/o gráficos determinando el título más alto de anticuerpos producido en el conejo inmunizado con el cultivo rizobiano y/o cepa patrón.

RESULTADOS

En la evaluación de los títulos de anticuerpos anti-rizobios obtenidos al inmunizar conejos con antígenos de cepas patrón y cultivos nativos de rizobios se encontró que el menor título se obtuvo al inmunizar con el cultivo nativo Rf 167 - 02 (640) y el mayor título se obtuvo al inmunizar con *Bradyrhizobium* sp (1890), se observa también que los sueros inmunes de cuatro de las siete cepas rizobianas empleadas presentaron un título de anticuerpo contra rizobios de 1280 (Tablas 1 y 2)

Tabla 1. Titulo promedio de anticuerpos obtenidos en *O. cuniculus* inmunizados con cepas patrón de Rizobios *Bradyrhizobium* sp CIAT 71, *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *Rhizobium etli* CIAT 632.

CEPAS RIZOBIANOS PATRON	<i>Bradyrhizobium</i> sp CIAT 71	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 632
TITULO DE ANTICUERPOS	1280	960	1280

Tabla 2. Titulo promedio de anticuerpos obtenidos en *O. cuniculus* inmunizados con cultivos nativos de *Bradyrhizobium* sp. RC-455-02, *Rhizobium* sp. Rf 167-01, Rf 167 - 02 y Rc 458-01.

CULTIVO RIZOBIANOS NATIVOS	<i>Bradyrhizobium</i> sp. RC-455-02	<i>Rhizobium</i> sp. Rf 167-01	Rf 167 - 02	Rc 458-01
TITULO DE ANTICUERPOS	1890	1280	640	1280

DISCUSIÓN

Uno de los aspectos más importantes en el empleo de un método de inmunización para la obtención de anticuerpos específicos es la calidad inmunogénica del antígeno, es decir que estimule la producción de una mayor cantidad de anticuerpos durante un periodo más prolongado (Blanco et al; 2008), producir el reclutamiento y activación de células accesorias y la inducción de coestimuladores que permitan una respuesta inmune rápida y fuerte⁸, asimismo, lograr

disminuir la manipulación innecesaria de los animales de experimentación, porque de esta manera se evita algún tipo de traumatismo en estos.

Las cepas en estudio han sido seleccionadas en base a que poseen una caracterización morfológica, genética, etc., ya determinada; además de conocerse internacionalmente por su elevada capacidad de competencia y eficiencia en la fijación del nitrógeno; lo que permite realizar estudios en ecosistemas sometidos a diversas condiciones ambientales. Una de estas cepas es *Rhizobium tropici* (CIAT 899), caracterizada por presentar una elevada tolerancia intrínseca a la acidez, además por ser capaz de nodular diversas leguminosas, tales como *Leucaena*, *Phaseolus*, y *Macroptilium*, presenta una amplia gama de huéspedes⁹.

Por lo mencionado anteriormente, se puede afirmar que el empleo del adyuvante de Freund completo e incompleto junto con el antígeno es un buen método de inmunización que permite obtener un buen título de anticuerpos, aun cuando tiene una acción irritante en el sitio de inoculación y que generalmente producen granulomas y abscesos, ha sido demostrado que mediante el empleo de adyuvante de Freund se logra mantener hasta 180 días, niveles de anticuerpos similares a los obtenidos a los 30 días post inoculación o inmunización¹⁰.

El adyuvante completo de Freund consiste en una solución de aceite mineral de baja especificidad y viscosidad con una suspensión de *Mycobacterium* muertos por, en cambio el adyuvante de incompleto de Freund contiene únicamente el aceite mineral^{11,12}. La acción conjunta de estos adyuvantes permite la liberación más lenta del antígeno al localizarlo en el sitio de inoculación (Blanco et al; 2008) pues al solubilizarlo el antígeno se van a liberar lentamente, permiten la reclusión de células inmunocompetentes en la zona de inoculación.

En relación a las cepas de rizobios estas han sido seleccionadas porque poseen una caracterización ya determinada en base a su elevada capacidad de competencia y eficacia en la fijación del nitrógeno, tanto las cepas patrón como las cepas nativas. Por lo tanto, el presente trabajo cobra importancia ya que los niveles de anticuerpos específicos obtenidos, van a permitir realizar estudios de las características moleculares y funcionales de estas bacterias, así como también permite desarrollar un método de inmunización en el que se emplee un adyuvante que tenga elevada eficacia, una fácil manipulación, disponibilidad comercial y costo no muy elevado. Por otro lado, es necesario la optimización de un método de inmunización que permita obtener el mayor título de anticuerpos contra cepas patrón de rizobios, y que permita utilizar estos anticuerpos frente a cultivos nativos de forma que se puede a realizar en futuros estudios de serogrupos o determinación de la competitividad entre rizobios presentes en el suelo.

CONCLUSIONES

- Las cepas rizobianas patrón *Brady-rhizobium* sp. CIAT71, *Rhizobium tropici* CIAT899 y CIAT 632, así como contra cultivos rizobianos nativos *Bradyrhizobium* sp. nativo RC-455-02, *Rhizobium* sp. Rf167-01, Rf167-02 y Rc 458-01, inducen la formación de anticuerpos.
- La mayoría de sueros hiperinmunes presentaba un título de anticuerpo de 1280 contra las diferentes cepas rizobianas empleadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burdman S, Vedder D, German M, Itzigsohn R, et al. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. In: C Elmerick, A Kondorski & WE Newton (eds.), Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. USA: Elsevier 1998; pp.609-612
2. Somesagaran P, Hoben HJ. Methods in legume Rhizobium technology. University of Hawaii, NifTAL Project and MIRSEN. 1994.
3. Sánchez-Yáñez J M. Producción de inoculantes para leguminosas y gramíneas. Coordinación de la Investigación Científica. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Proyecto 2.7. Reporte técnico. 1997.

4. Laguerre G, Mazurier S, Amarger S. Plasmid profiles and restrictionfragment polymorphism *Rhizobium leguminosarum* v. *viciae* in field populations. FEMS Microbiol Ecol 1992; 101: 17-26.
5. CIAT. Simbiosis leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de evaluación, Selección y manejo agronómico. Colombia. 1988.
6. Hungria M. Phenotypic grouping of Brazilian Bradyrhizobium strains which nodulate soybean. Biol Fertil Soils 1997; 25: 407-415
7. Arce M, Yolanda A, Rosas L. Prácticas de inmunología general aplicada y veterinaria. México: Manual Moderno S.A; 2007.
8. Martínez C. Modulación de la respuesta inmune. Tendencias actuales. Rev Cubana Invest Biomed 2006; 25(4): 18-23.
9. Manyani H, Sousa C, Díaz MES, Gil-Serrano A, Megías M. Leguminosae nodulation in some crops. Can J Microbiol 2001; 47(6): 574-579
10. Blanco A, Cambronero R. Adyuvantes vacunales. Bases a la respuesta inmunitaria a las vacunas. Madrid. 2008.
11. Pareja E. Antígenos e Inmunología. Universidad de Granada-España. 1999.
12. Morris H, Martínez C, Abdala D, Campos D. Adyuvantes inmunológicos. Rev Cubana Invest Biomed 1999; 18(2): 26-30.