

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,  
Oceánicas y Recursos Naturales



CASO DE ESTUDIO:

**“Caracterización bacteriana en un sistema de re circulación en la  
producción de tilapia a través de PCR-DGGE”.**

**EXAMEN COMPLEXIVO**

**FASE ORAL**

Previa a la obtención del Título de:

**ACUICULTOR**

Presentado por:

FREDY PATRICIO MALACATOS GONZALEZ.

Guayaquil – Ecuador

2016

## **AGRADECIMIENTO**

A mis padres

A mis hermanos

A mis profesores

A mis amigos

## **DEDICATORIA**

Dedico el siguiente trabajo a todos mis amigos y profesores a mi hermana Narcisa Malacatos, que fueron mi incentivo para a seguir estudiando. Y un agradecimiento muy especial para el M.Sc. Ecuador Marcillo, M.Sc. Jerry Landívar Zambrano, Dr Marcelo Muñoz, Biólogo Alberto Lino, Biólogo Marco Álvarez, que me brindaron su apoyo incondicional durante mi paso como estudiante en tan prestigiosa institución llamada ESPOI.

Fredy Patricio Malacatos González.

## **TRIBUNAL DE GRADO**

---

Jerry Landívar Zambrano M.Sc.  
**EVALUADOR**

---

Fabricio Marcillo M.Sc.  
**EVALUADOR**

---

Marco Álvarez Gálvez, Ph.D.  
**PROFESOR GUÍA**

## Índice General

CARATULA .....	1
AGRADECIMIENTO .....	2
DEDICATORIA .....	3
TRIBUNAL DEL GRADO .....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT .....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
MUESTREO .....	8
TOMA DE MUESTRA.....	8
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA BACTERIANO .....	8
CUANTIFICACIÓN DEL ADN .....	8
AMPLIFICACIÓN DE ADN OBTENIDA SE ESTANDARIZO EN 60NG/ $\mu$ L .....	8
ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	8
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRIMIDA (DGGE) .....	8
TINCIÓN.....	8
FOTO DOCUMENTACIÓN .....	9
ÍNDICES DE DIVERSIDAD UTILIZADOS PARA ESTE ESTUDIO .....	9
PRINCIPALES IMPACTOS.....	9
SOCIALES .....	9
AMBIENTALES .....	9
CIENTÍFICOS .....	9
ECONÓMICOS.....	9
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	9
CONCLUSIONES .....	9
BIBLIOGRAFÍA .....	10

# “Caracterización bacteriana en un sistema de recirculación en la producción de tilapia a través de PCR-DGGE”

.....H'O cmevqu 'O O C mctgl  
Hcewncf 'f g'koi gplgt 'c' O ct 'fko c. 'Elgpeku' Dkqn i lecu. 'Qeg<sup>a</sup> plecu' { 'Tgewtuqu' P cwt crgu  
Guewgrc 'Uwr gtlqt 'Rqiks<sup>2</sup> eplec 'f grl' Nsdj' tcn  
Mo '5207' x' f' Rgtko gtcn' 2; /23/7: 85. 'I wc { cs wkn 'Gewcf qt'  
[Hko ci qpB j qvo ckfgo. 'o c mctgl B gur qrf wQe"](#)

## Resumen

El presente proyecto de graduación tuvo como objetivo caracterizar la diversidad bacteriana existente en un sistema de recirculación en un policultivo de tilapia. El estudio observacional se realizó en la finca Produmar. El muestreo fue realizado en tres piscinas de 18 hectáreas cada una en fase de engorde y comprendió 25 semanas que dura el ciclo de engorde. Las muestras de agua fueron recogidas a 0,5 m de profundidad y transportadas en frío hacia el laboratorio para su procesamiento. El DNA bacteriano aislado de las muestras de agua fueron analizados mediante DGGE y los patrones obtenidos con ayuda del gen 16S rDNA determinaron que en el sistema de recirculación existían cuatro tipos de bacterias, estas fueron Bacterias totales, Enterobacterias, Vibrios y Pseudomonas demostrándose la existencia de bacterias desde el inicio hasta el fin de ciclo de producción aunque estas pueden aumentar hasta estabilizarse o resultar estables en proporción durante todo el ciclo de cultivo

**Palabras Claves:** Recirculación, gen 16S rRNA, índice de diversidad, DGGE, bacteria, matriz binaria

## Abstract

This graduation project aimed to characterize the existing bacterial diversity in a recirculation system in a polyculture of tilapia. The observational study was conducted in the Produmar farm. Sampling was conducted in three pools of 18 hectares each phase of fattening and realized 25 weeks of the fattening cycle. Water samples were collected at 0.5 m deep cold and transported to the laboratory for processing. Bacterial DNA isolated from water samples were analyzed by DGGE and patterns obtained with the 16S rDNA determined that in the system of recirculation there were four types of bacteria, these were total bacteria, Enterobacter, Vibrio and Pseudomonas demonstrating the existence of bacteria from the beginning to the end of the production cycle although these may increase to stabilize or be stable in proportion throughout the growing season.

**Keywords:** Recycling, 16S rRNA, diversity index, DGGE, bacteria, binary matrix.

## 1. Introducción

Por la aparición de infecciones de tipo viral y bacteriano causantes de severas mortalidades en fincas de camarón y tilapia, las que han causado severas pérdidas económicas el sector privado se ha visto obligado en la aplicación de protocolos y técnicas que permitan identificar y clasificar dichos organismos para ello han aplicado técnicas de microbiología molecular como microbiología clásica las que han permitido identificar dichos agentes infecciosos causantes de las mortalidades reportadas

El cultivo de tilapia se ha expandido significativamente en Ecuador en años recientes, como una alternativa a los cultivos acuícolas más tradicionales, especialmente al camarón. Tal ha sido el desarrollo de la industria nacional, que el país es actualmente uno de los primeros exportadores de tilapia fresca en América Latina. En el año 2009 se exportó 22.438.586 millones de libras de tilapia generando un ingreso al país de 64.991.788 millones de dólares [1].

Para este cultivo las enfermedades infecciosas han representado una amenaza constante para su sustentabilidad. Es poco el conocimiento que se posee sobre los agentes etiológicos que afectan al cultivo de tilapia en nuestro país, pero episodios de mortalidad asociados con agentes infecciosos de índole bacteriano han sido reportados en diferentes países productores de tilapia, causando grandes mortalidades y cuantiosas pérdidas económicas.

Un ejemplo específico es el caso de Costa Rica, donde pérdidas causadas por el patógeno *Piscirickettsia salmonis* han sido estimadas en 2,5 millones de dólares [2]. En otros países, bacterias como *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae*, *S. parauberis*, *S. dysgalactiae*, *Enterococcus seriolicida*, *Lactococcus garviae*, *L. piscium*, y *Vagococcus salmoninarum* han afectado seriamente [2], [3], [14], [5].

Un primer paso en el desarrollo de estrategias coherentes para controlar las enfermedades en Acuicultura es la caracterización de los agentes causales. Considerando la poca información que se tiene en el sector sobre los agentes causantes de dichas mortalidades, buscamos como objetivo central de esta propuesta realizar la caracterización de cepas patógenas a nivel molecular.

Para dicho caso la técnica de microbiología clásica no es muy eficiente cuando evalúa la existencia de comunidades bacterianas en muestras clínicas, tan solo del 0,1% al 10% de la población total se logra aislar en medios convencionales.

DGGE basado en el análisis de información genética bacteriana sin el cultivo de microorganismos permite analizar y comparar la diversidad bacteriana genética simplificando el aislamiento bacteriano pudiendo ser utilizada como un poderoso dispositivo para monitorear la calidad de agua en los distintos sistemas de producción que se utilizan en Acuicultura.

Basándonos en trabajos de investigación en los cuales se aplica la técnica de DGGE se demostró que la diversidad bacteriana existente varía dependiendo de factores ambientales cuando la muestra a analizar está expuesta a factores físicos, siempre se presenta una dominancia marcada de cierto tipo de bacterias y esta puede variar por factores externos en el caso de animales la dieta puede o no variar la diversidad bacteriana existente y al comparar comunidades bacterianas de una misma especie pero de diferente ubicación geográfica se pudo demostrar la similitud existente entre las comunidades bacterianas siempre las comunidades bacterianas estas expuestas a cambios directa o indirectamente por factores externos o internos de alguna manera y estos factores pueden variar muy poco o significativamente las poblaciones bacterianas y estos cambios en las poblaciones pueden ser identificados por la técnica de DGGE

## 2. Materiales y Métodos

### Localización del área de estudio

Para el desarrollo del presente Proyecto de Graduación, se plantea monitorear el sistema de recirculación de la granja Produmar, ubicada en el km 8 de la vía Duran, Tambo en el Cantón Duran de la provincia del Guayas. [6]



**Figura 1.** Foto panorámica de Produmar Fuente: Google map

## 2.1. Muestreo

Las muestras de agua se tomaron de tres piscinas que tienen 18 hectáreas de superficie cada una, con un metro de profundidad. El muestreo abarcó 25 semanas que dura el ciclo de engorde puesto que las muestras se recolectaron en horarios diferentes (mañana y tarde) y abarcaron una profundidad de 0,50 m en la columna de agua, las muestras se recolectaron en botellas plásticas e estériles de 1 litro y así se determinó la distribución total de bacterias presentes en toda la columna de agua.

## 2.2. Toma de muestra

Las muestras de agua fueron tomadas en botellas de 1 litro estériles a una profundidad de 0,50 m para cada punto hasta que se llenó completamente la botella, una vez que se recolectó la muestra de agua en los tres puntos equidistantes, estos se depositaron en un recipiente para homogenizarlos, finalmente se obtuvo una muestra única de 1 litro. Las dos muestras finales se llevaron en un enfriador hacia el laboratorio en donde se analizaron.

## 2.3. Extracción y purificación de DNA bacteriano

Se obtuvo el DNA bacteriano utilizando el protocolo detallado por Soluciones (QPCR Protocolo y Técnicas C ultek 02. 2006); El mismo que utiliza CTAB-Fenol-Cloroformo para la extracción y purificación consecuente, e Isopropanol para lograr un buen precipitado. Una vez que se obtuvo el ADN por CTAB, se lo purifico con la ayuda de técnica puntualizada por (Smith: 1997) durante el cual se utilizó un Sistema de Purificación fundamentado en filtros ( Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System). Con la ayuda del kit comercial (**Wizard genomic DNA purification kit**) que sirvió para purificar el material genético de las células de cultivo bacteriano. El material obtenido fue almacenado a -20 °C hasta que fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR.

### 2.3.1. Cuantificación del ADN

Una vez que se realizó la extracción del ADN se determinó su concentración por espectrofotometría utilizando las propiedades de las bases púricas y pirimidínicas que absorben los rayos ultravioletas a 260 nm, se utilizó un equipo Bio Photometer Eppendorf.

La concentración de ADN obtenida se estandarizó en 60 ng/μl.

### 2.3.2. Amplificación de ADN obtenida se estandarizó en 60ng/μl

El protocolo de amplificación de PCR-16SRNA fue basado en la técnica descrita por (Schaefer, H & Muyzer G, 2001) [7].

Para la cual se utilizó dos primers: el PRBA338F-GC (5'GCCCCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') complementarios de la región conservada 16S rRNA, con 30 ciclos térmicos [8].

### 2.3.3. Electroforesis en geles de agarosa

Una vez realizada la extracción y posterior amplificación de los fragmentos del gen 16S rDNA por PCR, el tamaño de estos productos amplificados fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa. Resulto importante mencionar que fue necesario determinar los pares de bases del tamaño de las bandas.

### 2.3.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (DGGE)

Una vez que se confirmó los productos amplificados del gen 16S rDNA en geles de agarosa, estos fueron sometidos a una electroforesis en Geles con Gradiente Denaturante (DGGE) utilizando un gel de poliacrilamida al 6% con un gradiente químico lineal del 40-60 desnaturante (urea-formamida) la cual me permitió analizar la diversidad bacteriana y la abundancia relativa en hábitats porque identifiqué pequeñas diferencias del gen 16S rDNA bacteriano al analizar pequeñas subunidades del gen ribosomal 16S rRNA.

### 2.3.5. Tinción

Finalizada la electroforesis, los geles se separaron y se colocaron dentro de las cubetas con las respectivas soluciones de tinción, se utilizó 1,5 litros, solo las soluciones de enjuague y fijación fueron nuevas para cada tinción, las otras soluciones se reutilizaron hasta cuando se agotaron. Los geles fueron teñidos utilizando el protocolo adaptado de tinción a la plata (AgNO<sub>3</sub>) elaborado por Lab One, Franklin Pérez Com. Pero, este permite obtener una mayor sensibilidad y fluorescencia de las bandas obtenidas a



partir de dichos geles y para leerlas se utilizó un trasluminador, solo fueron leídas las bandas con mejor resolución y fueron enumeradas consecutivamente empezando desde el primer carril.

### 2.3.6. Foto documentación

Los geles fueron documentados con la ayuda de una cámara digital Nikon (12 megapíxeles: Zoom óptico 3.6 x) cada gel fue escaneado [9].

Las imágenes fotográficas de los geles se guardaron en un formato "TIFF" y se procesaron con el programa Adobe Photo Shop (versión 7.0 Mac.) y el programa Gene Profiler (versión 4.05), el cual me permitió detectar bandas del mismo tamaño bajo un rango de tolerancia mínimo del 5 % de la intensidad en la línea analizada, bajo estas condiciones la presencia o ausencia de las bandas de igual tamaño reflejadas en el gel, serán identificadas por el Gene Profiler 4.05 generando una matriz en base a un código binario, el "1" significa presencia de una banda y el "0" es la ausencia de esa banda en un determinado carril. Las tablas de presencia o ausencia de bandas se utilizarán para su respectivo análisis

### 2.3.7. Índices de diversidad utilizados para este estudio

Los índices que se utilizaron para el proyecto de graduación fueron: Riqueza específica, diversidad y equitabilidad.

## 3. Principales impactos

### 3.1. Sociales

El personal que trabaja en el sector acuícola será altamente beneficiado porque al conocer los organismos patógenos que causan mortalidad se puede tomar medidas preventivas para mitigar los daños causados por estos organismos, permitiendo mantener plazas de trabajo constante.

### 3.2. Ambientales

El beneficio ambiental será muy importante porque me permitió encontrar las cepas bacterianas presentes en el sistema de recirculación del policultivo.

### 3.3. Científicos

Por la caracterización bacteriana podremos determinar riqueza bacteriana presente en el

policultivo y con ayuda de microbiología clásica y bioquímica podremos determinar la patogenicidad de las bacterias encontradas.

## 3.4. Económicos

Los productores del sector acuícola serán altamente beneficiados por el ahorro económico que implicara el saber las bacterias al tamente patógenas presentes en el cultivo y a que permitiría en contrar maneras para mitigar la mortalidad en el cultivo.

## 4. Interpretación de resultados

Datos cuantitativos obtenidos por microbiología clásica en agua durante el inicio del ciclo de engorde de recirculación demostró la existencia de cuatro tipos de bacterias, estos fueron de 3000 UFC/ml de Bacterias Totales, al ir avanzando el tiempo de cultivo estas generalmente no superaba los 6000 UFC/ml, las Enterobacterias que eran las más predominantes en el agua y estaban sobre las 5000 UFC/ml, pero los Vibrios y Pseudomonas eran mucho más bajos y estables y no sobrepasaban de 800 UFC/ml aunque ocasiones eran cero. Por medio de la técnica de DGGE se demostró la existencia de bacterias desde el inicio hasta el final del ciclo de producción, aunque estas pueden aumentar hasta estabilizarse o resultar estables en proporción durante todo el ciclo de cultivo

## 5. Conclusiones

- La técnica de DGGE ha sido exitosamente utilizado para estudiar y comparar comunidades microbianas en diferentes ecosistemas acuáticos, terrestres. Sin embargo no había sido empleado como herramienta de estudio de diversidad microbiana en sistemas de cultivo de tilapia. Siendo su aplicación una herramienta innovadora y pionera en nuestro proyecto de graduación para estimar la diversidad, composición y dinámica bacteriana presente en la fase de engorde de cultivo de tilapia en un sistema de recirculación.
- En el estudio, los perfiles derivados de la aplicación de DGGE obtenidos a partir de secuencias del gen 16S rDNA a partir de las muestras de agua, permitirá estimar la diversidad bacteriana y la intensidad de las bandas representara la dominancia de especies particulares dentro del sistema de recirculación. Siendo la obtención de los índices de diversidad de nuestro proyecto un punto de partida importante en el estudio de diversidad microbiana, estableciendo el

escenario para futuros estudios, fundamentalmente con respecto a cómo funcionan la población y comunidad bacteriana en un sistema de recirculación.

- Los índices de diversidad calculados a partir del número de bandas e intensidad de las mismas presentes en el gel de poliacrilamida generados por los perfiles de DGGE permitirán determinar la riqueza bacteriana de las especies de las comunidades presentes en el sistema de recirculación.
- Si las comunidades bacterianas presentes en el sistema de recirculación mantendrían una similar estructura numérica y una misma homogeneidad, los diferentes índices de diversidad utilizados en el presente Proyecto de Graduación no podrían detectar modificaciones en la composición de especies presentes dentro del sistema de recirculación.

## 6. Bibliografía

- 1 Cámara nacional de Acuicultura, (2012). Datos estadísticos y económicos de las exportaciones de filete de tilapia.
- 2 Castillo L, (2006). Estado Actual de la producción de Tilapia de cultivo en Latinoamérica, Panorama Acuícola., 22--26 (2006).
- 3 Kusuda R., & Salati F, (1993). Major Bacterial diseases affecting mariculture in Japan. ANN Rev Fish Dis: 69-85 (1993).
- 4 Prieta J., Domenech A.M., Fernández-Garayzabal J.F., Collins M.D., Rodríguez A. & Domínguez L., (1993). Lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus Mykiss*). Med Vet; 10: 367-373 (1993).
- 5 Eldar A., Bejarano Y., Livoff A. & Bercovier H, (1995). Experimental Streptococcal meningoencephalitis en cultivos de pez. Vet Microbial, 43,33-40 (1995).
- 6 Martínez J, Pileggi M, (2008). Caracterización y Propuesta Técnica de la Acuicultura en el Cantón Eloy Alfaro (Duran), provincia del Guayas. Tesis.
- 7 Schaefer, H & Muzer G, (2001). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology. Methods in microbiology. 30: 425 – 466.
- 8 Borbor M, (2006). Caracterización de las Comunidades Bacterianas. Suarez Universidad Estatal Península de Santa Elena, Tesis.
- 9 Fory P, 2005. Caracterización y Análisis Molecular de la Diversidad Genética de la colección Colombiana de Lulo. Tesis pp: 37