

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS Y RECURSOS NATURALES

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROFLORA BACTERIANA  
DE LARVAS CON SACO VITELINO DE HALIBUT DEL ATLÁNTICO  
(*Hippoglossus hippoglossus*) CON MALFORMACIÓN BUCAL**

Rocío Paola Urtubia Oyarzún

Dr. Marcelo González  
**Director de Tesis**

Profesor Pablo Gallardo  
**Co-Director de Tesis**

2010



UNIVERSIDAD DE MAGALLANES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS Y RECURSOS NATURALES

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROFLORA BACTERIANA  
DE LARVAS CON SACO VITELINO DE HALIBUT DEL ATLÁNTICO  
(*Hippoglossus hippoglossus*) CON MALFORMACIÓN BUCAL**

Rocío Paola Urtubia Oyarzún

Dr. Marcelo González  
**Director de Tesis**

Profesor Pablo Gallardo  
**Co-Director de Tesis**

2010

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROFLORA BACTERIANA  
DE LARVAS CON SACO VITELINO DE HALIBUT DEL ATLÁNTICO  
(*Hippoglossus hippoglossus*) CON MALFORMACIÓN BUCAL**

Por

Departamento de Ciencias y Recursos Naturales

Fecha: noviembre, 2010

Aprobado Comisión de Calificación

Decano

Tesis entregada como un requerimiento para obtener el título  
de Biólogo Marino en la Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Ciencias y Recursos Naturales

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROFLORA BACTERIANA  
DE LARVAS CON SACO VITELINO DE HALIBUT DEL ATLÁNTICO  
(*Hippoglossus hippoglossus*) CON MALFORMACIÓN BUCAL**

Tesis presentada para optar al Título de Biólogo Marino

Rocío Paola Urtubia Oyarzún

Punta Arenas, noviembre, 2010

## RESUMEN

El halibut del Atlántico, *Hippoglossus hippoglossus*, se cultiva en el Centro de Cultivos de Bahía Laredo en la Región de Magallanes. Uno de los principales problemas del cultivo de esta especie es la alta mortalidad que existe en los estados tempranos de desarrollo, ya sea por contaminación, enfermedades o anomalías que aparecen en el estadio de "yolk sac", principalmente la malformación bucal o síndrome "gaping".

El objetivo de este estudio fue determinar diferencias en la microflora bacteriana asociada a larvas con y sin malformación bucal, estableciendo si existe alguna relación entre las cepas bacterianas y el síndrome "gaping". Durante el estudio se aislaron 74 cepas bacterianas utilizando tres medios nutritivos distintos: Agar Marino, R2A y TCBS. Estas fueron caracterizadas microbiológicamente y molecularmente empleando la técnica de Polimorfismo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms).

El análisis de los resultados indica que hubo diferencias significativas entre la condición normal y "gaping". Las cepas pertenecientes a la Familia Vibrionaceae, encontradas en el medio nutritivo Agar Marino, y al género *Vibrio* (aislado en medio TCBS) sólo estuvieron presentes en la condición "gaping". La Familia Vibrionaceae ha sido reportada como dañina en el cultivo de peces marinos, ya que la gran mayoría son causantes de enfermedades. Particularmente, el género *Vibrio* ha sido reconocido como patógeno en distintas especies de peces, y ha sido relacionado con la presencia de "gaping" en larvas de peces.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Marcelo González, por haberme guiado en todo este tiempo, desde el inicio de mi práctica, y luego con la realización de mi tesis, muchísimas gracias por su apoyo y darme la opción de trabajar con usted.

A todo el grupo de trabajo que integra el Laboratorio de Biorrecursos Antárticos (INACH) en especial a **Geraldine Asencio, Carla Gimpel, Carolina Pérez y Paris Lavin**, por enseñarme los conocimientos fundamentales para la realización de mi proyecto, su apoyo incondicional en todo momento y la alegría de cada día que pasamos juntos. A todo el personal del Instituto Antártico Chileno por la acogida en su lugar de trabajo. A Eva Ogue, por guiarme al comienzo de mi investigación; Javier Pérez, por todo el tiempo de trabajo juntos; Carlos Olavarría, por cada consejo y ayuda recibida; y a Cecilia Figueroa por ayudarme con las secuenciaciones de mis muestras.

Al profesor Pablo Gallardo, de la Universidad de Magallanes, por colaborar con el financiamiento de mi tesis. A todos los profesores de la universidad, que durante mis cinco años de estudio me ayudaron en el desarrollo de mi carrera. Mis compañeros durante todos estos años, en especial a Cristian Garrido, Juan Francisco Pizarro y Carolina Toro.

Y finalmente quiero agradecer a mi familia, que me ha apoyado y aconsejado en toda oportunidad, como también lo han hecho mis amigos, en especial Nicole Bermúdez, Sebastián Ruiz, Osvaldo Vázquez, Natalia Osorio y Carlos Cárdenas. Mi movio, Bastián Lecaros, que me ha tenido que soportar y aguantar de todo, te quiero muchísimo e infinitas GRACIAS.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, mi más sincero agradecimiento.

Rocío Urtubia

## **ÍNDICE GENERAL**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 PLANTEAMIENTO	1
1.2 CULTIVO DEL HALIBUT DEL ATLÁNTICO	3
1.3 CULTIVO DEL HALIBUT DEL ATLÁNTICO EN CHILE	5
1.4 PUNTOS CRÍTICOS DEL CULTIVO DE HALIBUT	6
1.5 RELACIÓN ENTRE CRECIMIENTO Y TEMPERATURA EN LARVAS DE HALIBUT	7
1.6 ENFERMEDADES	7
1.7 SISTEMA INMUNE	10
1.8 CARGA BACTERIANA ASOCIADA A PECES	11
1.9 TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ASOCIADAS A PECES	12
1.10 ANOMALÍAS EN LARVAS DE HALIBUT	13
<b>2. HIPÓTESIS</b>	15
<b>3. OBJETIVOS</b>	15
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	16
4.2 CRECIMIENTO DE LA MICROFLORA BACTERIANA	16



4.3 PROTOCOLO DE CONTEO BACTERIANO	16
4.4 AISLAMIENTO DE CEPAS Y EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO	17
4.5 PROTOCOLO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (RFLP) Y ANÁLISIS	18
4.6 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS	19
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1 CONTEO BACTERIANO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	21
5.1.1 Comparación del número de unidades formadoras de colonias totales en los medios de cultivo	21
5.1.2 Número de unidades formadoras de colonias según morfología en el medio de cultivo	23
5.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS BACTERIANAS	27
5.3 ANÁLISIS DE SIMILITUD DE CEPAS BACTERIANAS EN FUNCIÓN DE LOS DIFERENTES PARÁMETROS ESTUDIADOS	29
5.3.1 Análisis de similitud de cepas bacterianas según RFLP en los tres medios de cultivo (AM, R2A y TCBS)	29
5.3.2 Análisis de similitud según RFLP y las características presentes en las cepas bacterianas de AM y R2A	32

5.3.3 Análisis de similitud según RFLP y las características presentes en las cepas bacterianas de AM, R2A y TCBS	36
<b>6. DISCUSIÓN</b>	38
<b>7. CONCLUSION</b>	45
<b>8. FINANCIAMIENTO</b>	46
<b>9. LITERATURA CITADA</b>	47
<b>10. ANEXOS</b>	56
10.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS	56
10.2 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN	57
10.3 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Caracterización de distintas morfologías de colonias bacterianas en los medios de cultivo R2A y AM, según Freeman (1986).	23
<b>Tabla 2:</b> Cepas seleccionadas para la extracción de ADN en el medio R2A. N/G: corresponde a si la colonia pertenece a la condición "normal" o "gaping".	59
<b>Tabla 3:</b> Cepas seleccionadas para la extracción de ADN en el medio AM. N/G: corresponde a si la colonia pertenece a la condición "normal" o "gaping".	60
<b>Tabla 4:</b> Descripción de 10 cepas bacterianas en los distintos medios de cultivos utilizados, cada una con su identificación más cercana según la secuenciación parcial del gen 16S ADNr.	28
<b>Tabla 5:</b> Análisis post test Tukey (Comparación Múltiple), ANOVA de 1 vía, del conteo total de cepas bacterianas en el medio AM y R2A, según condición "gaping" o normal.	61
<b>Tabla 6:</b> Análisis post test Tukey (Comparación Múltiple), ANOVA de 1 vía, del conteo según morfología de las cepas bacterianas en el medio AM, según la condición "gaping" o normal.	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Número de juveniles de halibut del Atlántico en Noruega, Islandia y Escocia, desde los años 1985-1997, junto con el número de criaderos hasta el año 1997.	4
<b>Figura 2:</b> Esquema de los distintos estadios de la larva de halibut del Atlántico y la etapa de su cultivo en que se encuentran.	6
<b>Figura 3:</b> Esquema de la metodología de RFLP utilizando 3 enzimas de restricción: Rsa I, Alu I y Bsur I.	19
<b>Figura 4:</b> Número de unidades formadoras de colonias totales en los dos medios de cultivo, AM y R2A.	22
<b>Figura 5:</b> Morfologías de las colonias aisladas en el medio R2A.	24
<b>Figura 6:</b> Morfologías de las colonias aisladas en el medio Agar Marino.	24
<b>Figura 7:</b> Número de unidades formadoras de colonias por morfología en el medio R2A.	25
<b>Figura 8:</b> Número de unidades formadoras de colonias por morfología en el medio AM.	26
<b>Figura 9:</b> Patrones de cortes enzimáticos de 3 cepas bacterianas distintas, las cuales fueron sometidas a RFLP utilizando 3 enzimas de restricción: Alu I, Bsur I y Rsa I.	30
<b>Figura 10:</b> Similitud de cepas bacterianas según RFLP, en los tres medios de cultivo: AM., R2A y TCBS.	31

<b>Figura 11:</b> Similitud de cepas bacterianas en el medio de cultivo Agar Marino.	34
<b>Figura 12:</b> Similitud de cepas bacterianas en el medio de cultivo R2A.	35
<b>Figura 13:</b> Similitud de cepas bacterianas presente en los tres medios de cultivo, AM, R2A, y TCBS, según su condición.	37