



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE BIOLOGÍA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
AREA TEMÁTICA: PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**Identificación y caracterización de patógenos bacterianos
aislados de tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*)
cultivadas en la presa de El Gallo, Guerrero, México.**

TESIS

Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Biológicas
Área Temática: Salud y producción animal

PRESENTA:

Biól. ANGELA CASTRO ORTÍZ

TUTOR:

D.C. ANTONIO CAMPOS MENDOZA

CO-TUTOR

M.C. RUBÉN HERNÁNDEZ MORALES

Morelia, Michoacán.



Noviembre, 2020

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico principal y especialmente a mi mamá **Lilia Castro**, por su esfuerzo y dedicación que me ha dado cada día de mi vida, por su amor y apoyo incondicional, por los ánimos que me dio para poder concluir este trabajo y etapa de mi vida. Jamás podría terminar de agradecerle todo lo que ha hecho por mi. Es ella la persona más importante y más amada en mi vida, mi mayor ejemplo y admiración.

A mi abuela **Consuelo** † por todo el amor y confianza que me dio a lo largo de mi vida. *Te quise todos los años que estuviste, y te he querido todos los años que no has estado.*

Al **Biol. Miguel Soria Doval** por convertir la simpleza en algo extraordinario, por cambiar noches aburridas en noches llenas de risas, por ayudarme a sobrellevar los momentos más complicados. Gracias por motivarme a crecer y esforzarme día con día, así como tu lo has hecho, y sobre todo gracias por todo el amor, confianza y atención que me has dado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, **Diego, Marquito Erik, Alexis y Marisol** por todo el apoyo y la motivación que me brindaron en los momentos adecuados, y sobre todo, por hacerme vivir increíbles momentos de mi vida. Los quiero los extraño mucho.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** y a la **Maestría Institucional en Ciencias Biológicas**, así como al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por darme la oportunidad de realizarme profesionalmente y a cada uno de mis maestros que intervinieron en mi formación académica.

A mi asesor el **D. C. Antonio Campos Mendoza** por brindarme el apoyo y la confianza, agradezco su asesoría y todas sus enseñanzas durante la realización de este proyecto.

A los integrantes de mi mesa sinodal, al **D. C. Gustavo Ramírez Paredes**, al **M. C. Rubén Hernández Morales**, al **D. C. Juan José Valdez Alarcón** y al **D. C. Miguel Martínez Trujillo**, por sus observaciones, comentarios, sugerencias y sobre todo por la atención prestada, al igual que sus consejos para llevar a cabo la culminación de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio **José Uriel Lira Martínez** por su ayuda en el trabajo de campo, y al **Biol. Miguel Ángel Hernández Acuayte** por la compañía y apoyo brindado. También a la **M.C. Adriana Carolina Gil Correa** por su amable apoyo en el **Laboratorio de Epidemiología Molecular y Biotecnología de Enfermedades Infecciosas**, perteneciente al **Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología** de la **UMSNH**.

RESUMEN

La acuicultura contribuye con más de la mitad de la producción de peces y mariscos para el consumo humano y es la actividad de mayor crecimiento en el sector alimenticio a nivel global. En 2010, esta industria aportó 17 % del suministro mundial de proteínas de origen animal, siendo la tilapia el segundo pez más cultivado geográficamente. Sin embargo, esta actividad frecuentemente se ve afectada por la presencia de enfermedades infecciosas. Estas enfermedades se presentan debido a la interacción de factores como las condiciones ambientales, el manejo, la presencia de patógenos, genética y deficiencias nutricionales e inmunológicas de los organismos cultivados. Trabajos en México que han reportado especies de bacterias como *Aeromonas* spp., *Francisella* spp., *Plesiomonas* spp. y *Streptococcus* spp. indican una relación entre las actividades acuícolas intensificadas en México y la aparición de nuevas enfermedades. Debido a que el estado de Guerrero carece de estudios sobre la actividad acuícola, se planteó el objetivo de identificar los patógenos bacterianos presentes en el cultivo de tilapia en la presa de El Gallo en el estado de Guerrero, dónde se realizaron dos muestreos (octubre de 2017 y octubre de 2019) para aislar e identificar las bacterias patógenas presentes en el tejido de tilapia. En los muestreos se colectaron seis y cinco organismos respectivamente que presentaban signos de enfermedad. Se utilizaron Agar Sangre y TSA donde se sembraron muestras de distintos órganos. Los peces mostraban nado errático, letargia, exoftalmia, úlceras, descamación, erosión en aletas, ascitis y órganos friables. En el primer muestreo se identificó a *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae* y bacterias pertenecientes a los géneros *Vibrio* sp. y *Aeromonas* sp. Del segundo muestreo se obtuvieron 13 colonias Gram positivas, presuntivas de *Streptococcus* sp. Fueron preservadas en caldo BHI con glicerol al 20% y congeladas a -80 °C.

Palabras clave: Acuicultura, enfermedades infecciosas, sistemas de producción, patologías.

ABSTRACT

Aquaculture contributes with more than half of the production of fish and shellfish for human consumption and is the fastest growing activity in the food sector. In 2010, this industry contributed 17% of the world supply of proteins of animal origin, with tilapia being the second most cultivated fish geographically. However, this activity is frequently affected by the presence of infectious diseases. These diseases occur due to the interaction of factors such as environmental conditions, management, the presence of pathogens, genetics and nutritional and immunological deficiencies of the cultured organisms. Studies in Mexico have reported species of bacteria such as *Aeromonas* spp., *Francisella* spp., *Plesiomonas* spp. and *Streptococcus* spp. indicating a relationship between intensified aquaculture activities in Mexico and the appearance of new diseases. Because the state of Guerrero lacks of studies on aquaculture activity, the main objective of the present study was to identify the bacterial pathogens in the tilapia cultured in the El Gallo dam in the state of Guerrero, where two samplings were carried out (October, 2017 and October 2019) to isolate and identify pathogenic bacteria present in tilapia tissue. In the samplings, six and five organisms showing signs of disease were collected respectively. Blood Agar and TSA were used where samples of different organs were plated. The fish showed erratic swimming, lethargy, exophthalmia, ulcers, desquamation, fin erosion, ascites and friable organs. In the first sampling, *Streptococcus agalactiae*, *S. iniae* and bacteria belonging to the genera *Vibrio* sp. and *Aeromonas* sp. From the second sampling, 13 Gram positive colonies were obtained, presumptive of *Streptococcus* sp. They were preserved in BHI with 20% glycerol and frozen at -80 °C.

INDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. ANTECEDENTES.....	14
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	21
6.1. Objetivo general.....	21
6.2. Objetivos particulares.....	21
7. DESCRIPCION DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	22
7.1. Ubicación geográfica.....	22
7.2. Fisiografía.....	23
7.3. Geología.....	23
7.4. Suelos.....	23
7.5. Clima.....	23
7.6. Hidrología.....	24
7.7. Vegetación.....	24
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
8.1. Actividades de campo.....	25
8.1.1. Muestreo de octubre de 2017.....	25
8.1.2. Muestreo de octubre de 2019.....	25
8.2. Actividades de laboratorio.....	26
8.2.1. Caracterización fenotípica.....	27
8.2.2. Identificación microscópica.....	27
8.2.3. Preservación de las colonias bacterianas.....	27
8.2.4. Extracción de ADN de las colonias de bacterias.....	28
8.2.5. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	29
8.3. Listado taxonómico.....	30
9. RESULTADOS.....	31
9.1. Reporte de la necropsia.....	31

9.2. Identificación morfológica de las colonias bacterianas.....	35
9.3. Identificación microscópica de las colonias bacterianas.....	36
9.4. Extracción de ADN de las colonias bacterianas.....	37
9.5. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	38
9.6. Listado taxonómico.....	40
10. DISCUSIÓN.....	41
11. CONCLUSIONES.....	47
12. RECOMENDACIONES.....	48
13. LITERATURA CITADA.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Ubicación geográfica de la presa de El Gallo.	22
Figura 2.	Equipo de laboratorio montado en campo.	26
Figura 3.	Signos clínicos y lesiones externas en la tilapia uno.	32
Figura 4.	Signos clínicos y lesiones externas en la tilapia dos.	33
Figura 5.	Signos clínicos y lesiones externas en la tilapia tres.	33
Figura 6.	Signos clínicos y lesiones externas en la tilapia cuatro.	34
Figura 7.	Signos clínicos y lesiones externas en la tilapia cinco.	34
Figura 8.	Colonias procedentes del cerebro de tilapia enferma.	36
Figura 9.	Identificación microscópica de <i>Streptococcus</i> spp.	36
Figura 10.	Integridad del ADN verificado por electroforesis en gel de agarosa.	37
Figura 11.	Productos de amplificación por PCR	38

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Oligonucleótidos usados para el análisis bacteriológico basado en PCR-SSCP para el gen 16S ARNr.	29
Tabla 2.	Reporte de la necropsia. Octubre de 2017.	31
Tabla 3.	Reporte de la necropsia. Octubre de 2019.	32
Tabla 4.	Características de las colonias bacterianas.	35
Tabla 5.	Orden y procedencia de los aislados bacterianos.	37
Tabla 6.	Concentración y pureza de los productos de PCR.	39
Tabla 7.	Especies de bacterias encontradas en tejido. Octubre 2017.	39
Tabla 8.	Especies de bacterias encontradas en tejido. Octubre 2019.	39

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos provenientes de la acuicultura ha aumentado en las últimas décadas, esto debido a la necesidad de satisfacer la demanda de la creciente población humana y al incremento en la preferencia por fuentes saludables de proteína animal. Se estima que en 2018 la producción mundial de pescado alcanzó unas 179 millones de toneladas de las cuales 156, se destinaron al consumo humano, mientras que los 22 millones de toneladas restantes se destinaron a usos no alimentarios, principalmente para la producción de harina y aceite de pescado. En dicho año, la acuicultura representó el 46% de la producción total y el 52% del pescado para consumo humano (FAO 2020).

Dentro de los productos de la acuicultura que comúnmente se cultivan destaca la tilapia, el sector de especies de peces más cultivado geográficamente, que continúa creciendo en volumen, con una producción de 6.5 millones de toneladas métricas globales (Tveteras *et al.*, 2019). En México en 2019, este sector se posicionó en el primer lugar de producción acuícola (37 %), seguido del camarón (36 %), ostión (11.3 %), y carpa (7.6 %) (CONAPESCA, 2019).

Derivado de este crecimiento en la producción acuícola, el desarrollo de la acuicultura manifiesta problemas como enfermedades infecciosas que representan pérdidas cuantiosas en la producción (FAO, 2006; Noga, 2010). En el caso del sector de la tilapia alrededor de 300,000 toneladas métricas, sólo debido a infecciones por *Streptococcus* spp. (Tveteras *et al.*, 2019). En México, la producción

acuícola está sujeta a la incidencia de enfermedades masivas, así como a la competencia del mercado internacional (Campos *et al.*, 2016).

La enfermedad es el resultado de una interacción compleja entre el huésped, el patógeno y los factores estresantes externos, como cambios en el ambiente, mala higiene y estrés (Austin y Austin, 2016). Además, es relevante enfatizar que las enfermedades infecciosas no son necesariamente causadas por un sólo taxón bacteriano, ya que puede haber interacciones entre dos o más bacterias e incluso entre bacterias y virus en las llamadas coinfecciones (FAO, 2011).

Las enfermedades infecciosas en los sistemas de producción de tilapia generalmente se encuentran asociadas a una mala calidad del agua, debida a una sobre carga del sistema de producción y a la presencia de organismos microbianos patógenos (Leal *et al.* 2009). Uno de los vectores de microorganismos patógenos en cultivo de jaulas flotantes de tilapia es el aporte de aguas sin tratamiento, la re-suspensión de la comunidad bacteriana del sedimento y la falta de buenas prácticas de producción acuícola en el manejo del sistema de producción, particularmente por un deficiente protocolo de producción (Moscoso *et al.* 1992). Esto provoca el desarrollo de enfermedades fatales como: estreptococosis, predominantemente causada por la infección de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* y *Lactococcus garviae*, flavobacteriosis causada por *Flavobacterium columnare*, francisellosis causada por *Francisella orientalis* y otros agentes como *Aeromonas* spp., *Pleisomonas* spp. *Pseudomonas* spp. y *Edwardsiella* spp. que prevalece en las regiones templadas y tropicales (Woo *et al.*, 2002; Brudeseth *et al.*, 2013).

El indicador de contaminación fecal comúnmente utilizado es *Escherichia coli* (Prescot y Harley, 2002), si bien este es de relevancia para la salud pública, pero no está reconocida como agente etiológico de enfermedades en tilapia. Por esta razón, los estudios de sanidad animal en la acuicultura se han centrado en el monitoreo de agentes causales de enfermedades infecciosas en los peces, más que en los indicadores de contaminación fecal en agua. Dichos estudios se enfocan a la microbiota de peces silvestres y bajo algún sistema de cultivo, ya que la posibilidad de presentar una patología ocasionada por bacterias infecto-contagiosas aumenta considerablemente cuando estos animales pasan a un estado de estrés (Leal *et al.* 2009).

Derivado de dicha situación y centrándose en que la presa de El Gallo carece de estudios de proyección de la actividad acuícola, se considera que es necesario caracterizar a la comunidad microbiológica patógena (patobioma), para generar un programa de buenas prácticas de producción acuícola, que permita la prevención y el control de enfermedades relacionadas con la presencia de bacterias patógenas.

2. JUSTIFICACIÓN

En los sistemas de producción de peces, las bacterias son organismos patógenos causantes de enfermedades y pérdidas en la producción, por lo cual se necesita caracterizar a la comunidad microbiológica patogénica de la presa El Gallo, para generar un programa de prevención y control de enfermedades relacionadas con la presencia de éstas.

3. ANTECEDENTES

La acuicultura es la industria alimenticia que proporciona casi la mitad de la producción mundial acuícola para la alimentación humana (FAO, 2014). En 2016, la producción mundial de la acuicultura, incluidas las plantas acuáticas, aportó 110.2 millones de toneladas (FAO, 2018). Los productos de la acuicultura son una valiosa fuente de alimento en los países en desarrollo, los cuales producen más del 75 % del producto que se consume a nivel global. Los recursos del planeta son limitados y la acuicultura se perfila como una opción para expandir el suministro de proteína animal. Las especies cultivadas son similares en la eficiencia de conversión alimenticia a las aves y mucho más eficientes que la carne de res. Además, debido a que el sector de la acuicultura es relativamente joven en comparación con sectores como la ganadería, ofrece un gran margen para la innovación técnica y para aumentar aún más la eficiencia de los recursos (WRI, 2014).

El crecimiento acelerado y no planeado de la acuicultura puede derivar en situaciones que pueden impactar negativamente al ambiente, como la incorporación de fósforo y nitrógeno por medio del alimento no consumido y heces (FAO, 2014). Además, la presencia de enfermedades bacterianas puede también indirectamente aportar en este sentido si los productores afectados hacen un indiscriminado uso de antibióticos (Buschmann y Fortt, 2005).

En la industria acuícola, las enfermedades se presentan debido a la interacción de los factores ambientales, de manejo, presencia de patógenos y deficientes condiciones nutricionales e inmunológicas de los organismos cultivados.

Por lo tanto, es importante mantener el equilibrio de dichas variables para minimizar la probabilidad de aparición de padecimientos (FAO, 2011).

Diversos trabajos han reportado brotes de enfermedades en cultivos de tilapia alrededor del mundo.

En Arabia Saudita se evaluó la microbiota nativa en el agua de estanques salobres, en sedimento, así como en intestinos y branquias de tilapia sana cultivada y se encontraron 19 especies bacterianas como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. y varias especies del género *Vibrio*. Así mismo se determinó que las bacterias del agua y del sedimento influyeron en la composición bacteriana de las branquias y de los intestinos de las tilapias. Las especies bacterianas predominantes fueron del género *Vibrio* como *V. parahaemolyticus*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* y otros como *Chryseomonas* spp. y *Streptococcus* sp. en todas las poblaciones, con excepción de la población de sedimentos donde *Streptococcus* sp. fue reemplazado por *Shewanella putrefaciens* (Al-Harbi y Uddin, 2005).

En Malasia se reportó mayor número de especies de bacterias Gram-positivas, con predominio de aislamientos de *Streptococcus agalactiae*, seguido de *Lactococcus lactis* y *Micrococcus* sp. Dentro de la calidad del agua, la temperatura y el amoníaco se asociaron como los parámetros más significativos a la presencia de bacterias (Ismail *et al.* 2016).

La franciselosis es una enfermedad emergente en tilapia (*Oreochromis* spp.), la cual es causada por la bacteria *Francisella orientalis* que está presente en varios

países donde el cultivo de tilapia es comercialmente importante (Ramirez-Paredes et al. 2020). En Inglaterra, Reino Unido, se muestrearon granjas de tilapia nilotica en Lincolnshire dónde se detectó a *Francisella orientalis* como agente causal de enfermedades. La patología macroscópica mostrada por peces enfermos incluía erosión de las aletas, pérdida de escamas, piel pálida y branquias blancas. La mayoría de los órganos internos estaban agrandados y eran hemorrágicos o pálidos. La mayoría de los peces presentaban nódulos blancos en el bazo, riñón e hígado. La PCR específica del género *Francisella* confirmó la presencia de la bacteria en los tejidos de los peces (Ramirez-Paredes et al. 2017). Recientemente, se ha informado del aislamiento de nuevas cepas de *F. orientalis* en Asia (Pulpipat et al. 2019) y América Latina en coinfección con *Streptococcus agalactiae* (Assis et al. 2017)

En Ghana, la mayor parte de producción de tilapia se centra en el lago Volta, la cual es actualmente baja debido a tasas de mortalidad de más del 50%. De varias granjas se tomaron muestras del cerebro, hígado, riñón y bazo usando hisopos estériles y se incubaron en Agar TSA a temperatura ambiente (28 -30 °C). Los aislados obtenidos se identificaron con pruebas fenotípicas y con secuenciación parcial del gen 16S rRNA. Los signos clínicos predominantes fueron la pérdida de equilibrio, asociada a la natación en espiral, indicativo de una enfermedad que afecta al sistema nervioso. El principal patógeno bacteriano aislado en todas las granjas fue *S. agalactiae*, uno sólo aislamiento de *S. iniae*, así como *Flavobacterium columnare* y *Aeromonas* spp. Se destaca la importancia de implementar medidas de control de enfermedades en el país, lo que incluiría la detección de patógenos y

limitar el movimiento de peces y equipo entre granjas para reducir la propagación de patógenos (Verner-Jeffreys *et al.* 2018).

Perera *et al.* (1994) y Bowser *et al.* (1998) reportaron que en Estados Unidos se ha identificado a *Streptococcus iniae* como el patógeno más importante que afecta a los cultivos de tilapia.

En Colombia se obtuvieron distintos aislamientos obtenidos de varias regiones del país donde se demostró un 98% de afinidad con *S. agalactiae*. Se evaluaron aislamiento de tejido, de agua y fango de los sitios de cultivo utilizando técnicas microbiológicas, inmunoperoxidasa indirecta y PCR específicas la identificación de *S. agalactiae*. Los resultados del estudio demostraron que, hasta la fecha de dicho reporte, en Colombia únicamente se ha identificado la especie *S. agalactiae* causando infección en tilapia. No se ha reportado que otras especies de *Streptococcus* como *S. iniae* y otros Gram-positivos causen estreptococosis en Colombia (Jiménez *et al.* 2007).

Marcusso *et al* (2015) determinaron la frecuencia de aislamiento e identificación de *Streptococcus agalactiae* en órganos diferentes de *Oreochromis niloticus* infectados naturalmente, derivados de ocho granjas de peces en la región norte del estado de Paraná, Brasil, las cuales presentaban signos clínicos característicos de la enfermedad. Tomaron muestras de riñón, hígado, bazo, corazón y cerebro, las cuales se sembraron en medio sólido de infusión de cerebro y corazón (BHI) añadiendo 5% de sangre ovina y se incubaron a 29 grados °C durante 7 días. Se seleccionaron las colonias que fueran compatibles con

Streptococcus spp. a partir de características macroscópicas y microscópicas (cocos Gram positivos) y se confirmaron mediante PCR. La secuenciación de los aislados se llevó a cabo utilizando el gen 16S rRNA. A partir de esto, las muestras indicaron que todos los peces fueron positivos para la infección por *S. agalactiae*, donde el aislamiento es más común en el cerebro, los riñones y el hígado en orden descendente. Además, recomiendan la investigación bacteriológica en estos órganos.

Estudios en México han determinado enfermedades bacterianas en tilapia causadas principalmente por el género *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* presentes en jaulas flotantes en las presas Adolfo López Mateos, Sanalona y Dique IV, en el estado de Sinaloa (Soto-Rodríguez *et al.* 2013).

Ortega *et al.* (2016) confirmaron la presencia de franciselosis en cultivos de tilapia mexicana. Los peces productores presentaron una tasa de mortalidad de aproximadamente el 40%, y la enfermedad se caracterizó por granulomas o nódulos blanquecinos en diferentes órganos, principalmente el bazo y el riñón. El análisis filogenético demostró una estrecha similitud con *Francisella orientalis* obtenida de tilapia infectada de varios países.

Adicionalmente, Ortega *et al.* (2018) identificaron y caracterizaron a *Streptococcus iniae* como el agente causante de la enfermedad en dos poblaciones de tilapia (*Oreochromis aureus*) en México las poblaciones estaban geográficamente aisladas (San Luis Potosí y Querétaro), de orígenes distintos y no compartían las fuentes de agua. Se tomaron muestras de lesiones externas en la piel, riñón, bazo y cerebro. Las muestras produjeron cultivos puros, dos de los

cuales (uno de cada granja) fueron sometidos a análisis bioquímicos, PCR y secuenciación 16S rRNA, confirmando la identificación de *S. iniae*. La infectividad de los patógenos se evaluó mediante inyección intraperitoneal en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y pez cebra (*Danio rerio*). En ambos se presentaron tasas de mortalidad de hasta el 100%, indicando claramente una relación entre las actividades acuícolas intensificadas en México y la aparición de nuevas enfermedades.

En México, la mayoría de los estudios de enfermedades infecciosas en acuicultura se enfocan al cultivo del camarón, por lo que todavía se carece de información suficiente sobre este problema en tilapia en el país.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las bacterias patógenas presentes en tejido de tilapia (*O. niloticus*) que causan pérdidas en la producción en un sistema en jaulas flotantes en la presa de El Gallo, Guerrero?

5. HIPÓTESIS

Las principales bacterias patógenas serán *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus iniae*, ya que son las más descritas en los sistemas de producción de tilapia, seguidas de algunas especies del género *Aeromonas*, como *A. veronii* y *A. hydrophila*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Determinar las bacterias patógenas presentes en tilapia (*O. niloticus*) en un sistema de producción en jaulas flotantes en la presa de El Gallo en Guerrero.

6.2. Objetivos particulares

- Delimitar el diagnóstico clínico y signología de la infección bacteriana en ejemplares analizados.
- Perfilar el riesgo patológico de las especies de bacterias patógenas presentes en la presa El Gallo y las medidas de mitigación.
- Obtener un listado taxonómico de las bacterias patógenas presentes en los tejidos de tilapia.

7. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

7.1. Ubicación geográfica

La Presa El Gallo se encuentra en el municipio de Cutzamala de Pinzón, Guerrero. Se localiza en las coordenadas $18^{\circ}43'22.8''$ de latitud norte y $100^{\circ}40'30.3''$ de longitud oeste, con una altitud de 348 msnm. Limita al norte con el municipio de Tiquicheo de Nicolás Romero, Michoacán; al este con el estado de México y el municipio de Tlalchapa; al sur con los municipios de Tlalchapa y Pungarabato en Guerrero y el estado de Michoacán de Ocampo; al oeste con el estado de Michoacán de Ocampo (INEGI, 2009) (Fig. 1).

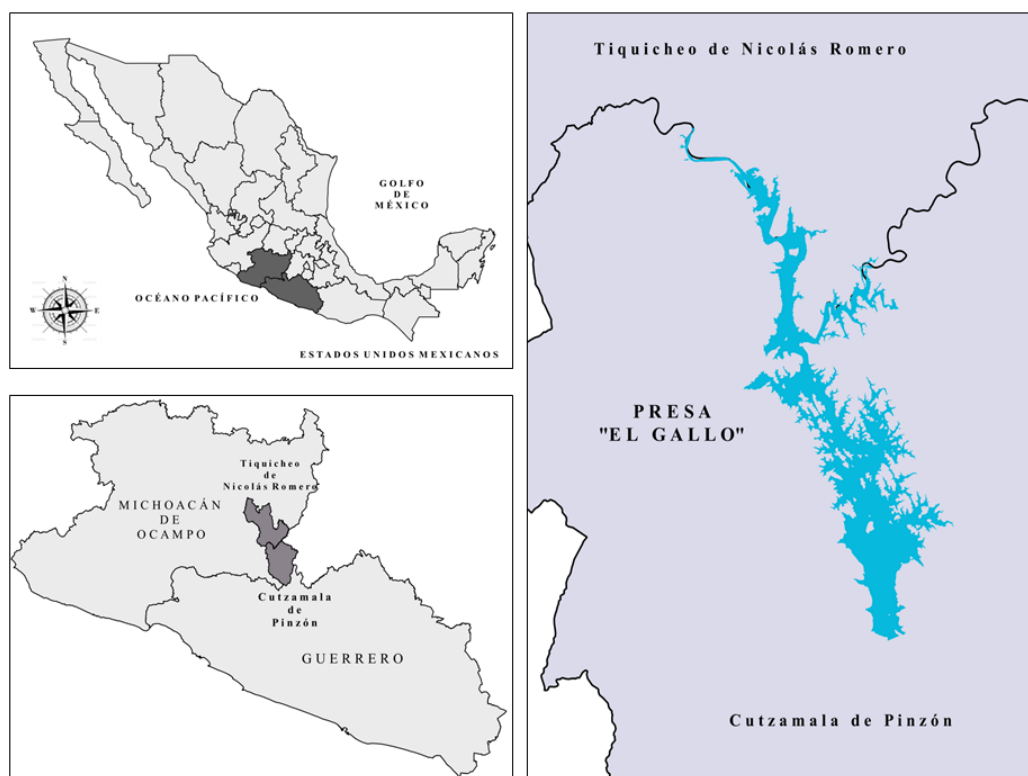


Figura 1. Ubicación geográfica de la presa El Gallo de Cutzamala de Pinzón, Guerrero, México

7.2. Fisiografía

El área de estudio pertenece a la provincia de la Sierra Madre del Sur, en la subprovincia Depresión del Balsas. Su sistema de topofomas es llanura aluvial con lomeríos en mayor porcentaje, pero también se presenta la sierra de cumbres tendidas, sierra alta compleja con cañadas, sierra alta compleja con mesetas, valle ramificado, lomerío y sierra alta compleja con lomerío (INEGI, 2009).

7.3. Geología

La geología de la región tiene su origen principalmente en el periodo Cretácico y Terciario y en menor proporción al periodo Paleoceno y Cuaternario. Se encuentran representadas por rocas de tipo ígnea extrusiva: riolita-toba ácida, toba ácida, andesita, basalto y brecha volcánica ácida, y sedimentaria: arenisca-conglomerado, caliza-lutita, caliza, lutita-arenisca y conglomerado (INEGI, 2009).

7.4. Suelos

El suelo de la zona data del periodo mesozoico y cretácico inferior (SEDATU, 2013). Los tipos de suelo dominantes son el Leptosol (25.69 %), Phaeozem (14.71 %), Regosol (14.37 %), Luvisol (12.99 %), Cambisol (12.88 %), Calcisol (10.9 %), y en menor proporción el Fluvisol (3.26 %) y Vertisol (2.91 %) (INEGI, 2009).

7.5. Clima

El clima predominante en la región es cálido subhúmedo con lluvias en verano. Con un rango de temperatura de 20 – 30 °C, registrándose las más altas en los meses de abril y mayo, con temperaturas de hasta 40° C en los últimos años. La

temporada de lluvias se presenta en los meses de junio, julio, agosto y septiembre, con una precipitación media anual que fluctúa entre los 800 -1 100 mm (INEGI, 2009).

7.6. Hidrología

La presa El Gallo pertenece a la región hidrográfica Balsas (64.2 %) y Costa Chica - Río Verde (35.8 %). Pertenece a la Cuenca del río Cutzamala (88.5 %) y a la del río Balsas – Zirándaro (11.5 %). A la subcuenca del río Cutzamala (52.26 %), y en menor porcentaje al río Ixtapan, río Balsas – Zirándaro, río Tilostoc, río Zitácuaro y río Purungueo. Las corrientes de agua son de tipo perenne: Aguiagua, Bejucos, Grande, Pungarancho y Tuzantla y de tipo intermitentes: Angao, El Estrecho, El Mamey, El Tizate, La Cañada, La Ceiba Amarilla, La Fundición, Las Latas, Las Salinas, Malpaso, Matus, Salado, Seco, y Tuzantla. Los cuerpos de agua del municipio son la presa El Gallo y la presa Hermenegildo Galeana (INEGI, 2009).

7.7. Vegetación

La zona de estudio presenta una vegetación natural dominada por el bosque tropical seco, (44.56%) combinado con vegetación secundaria como pastizal inducido (20.32%) y bosque espinoso (10%) (INEGI, 2009). Sin embargo, esta vegetación se ha visto afectada por actividades de origen antropogénico. El bosque tropical seco es el más abundante en México, y presenta las tasas más altas de deforestación y de cambio de uso de suelo (Suazo-Ortuño *et al*, 2013).

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Actividades de campo

8.1.1. Muestreo de octubre de 2017.

El primer muestreo se realizó en octubre de 2017, en el cual se colectaron seis tilapias clínicamente afectadas. Éstas presentaban signos como nado errático, letargia, exoftalmia y descamación (Zamrii-Saad *et al.*, 2010). Los peces fueron sacrificados y se llevó a cabo la necropsia y se tomó registro de la singnología externa y la patología interna de cada ejemplar (Tabla 2) (Ridgeway Biologicals Ltd.).

Se montó equipo de laboratorio de microbiología en campo manteniendo medidas de asepsia y en lo posible de esterilidad.

Con asas bacteriológicas desechables, se tomaron muestras del corazón, cerebro, bazo y del riñón de cada tilapia (Marcusso *et al.*, 2015) y se sembraron en cajas de Petri con agar sangre y agar TSA, procedentes de la empresa Ridgeway Biologicals Ltd. en el Reino Unido.

Las cajas de Petri se empacaron para su traslado al Reino Unido, donde se realizaron las pruebas de identificación molecular.

8.1.2. Muestreo de octubre de 2019.

El segundo muestreo se llevó a cabo en el mes de octubre de 2019, dónde se colectaron cinco tilapias clínicamente afectadas, las cuales presentaban letargia, exoftalmia y descamación y nado errático.

Se montó equipo de laboratorio de microbiología en campo manteniendo medidas de esterilidad de manera similar al muestreo de 2017 (Fig. 2)

Con asas bacteriológicas desechables, se tomaron muestras del corazón, cerebro, bazo y del riñón de cada tilapia y se sembraron en cajas de Petri con Agar Sangre y Agar TSA, procedentes de la empresa Ridgeway Biologicals Ltd.



Figura 2. Equipo de laboratorio montado en campo.

Las cajas de Petri se guardaron en una hielera con cuerpos fríos hasta su traslado al laboratorio de Biología Acuática “J. Javier Alvarado Díaz”.

8.2. Actividades de laboratorio

Al llegar al laboratorio, las cajas de Petri se incubaron a 23 °C durante 12 horas. Las colonias que crecieron se resembraron en agar sangre para asegurar que no estuvieran contaminadas y se incubaron durante otras 12 horas a 36 °C para verificar pureza.

8.2.1. Caracterización fenotípica

Como primer paso para la identificación a nivel especie de las colonias de bacterias, se realizaron técnicas de microbiología como determinación de la morfología de la colonia, tipo de hemólisis en agar sangre, tinción Gram y morfología celular.

8.2.2. Identificación microscópica

A las colonias bacterianas purificadas se les realizó tinción de Gram con metodología estándar (Manual de Microbiología Veterinaria, Universidad de Antioquia). Brevemente, se tomó una submuestra con asa bacteriológica de una sola colonia pura y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio. La muestra se homogeneizó con una gota de agua de agua destilada estéril y se expandió a manera de frotis sobre el cubreobjetos. Los frotis se secaron en flama de mechero de alcohol. Ya secos se tiñeron con el colorante cristal violeta, posteriormente, se tiñó con yodo para intensificar el color e impedir la salida de cristal violeta de la pared bacteriana. Luego se decoloró el frotis lavándolo con alcohol-acetona. Por último, el frotis se tiñó con safranina. Los frotis se observaron a microscopio óptico compuesto con el objetivo de 100X usando aceite de inmersión.

8.2.3. Preservación de las colonias bacterianas.

Una muestra de cada colonia tomada con asa bacteriológica se resuspendió en 10 ml de caldo BHI (Difco) y se incubó durante 24 horas sin agitación. Posteriormente se tomaron 800 μ l del cultivo y se mezclaron con 200 μ l de glicerol

en tubos Eppendorf para preservarse a -80 °C hasta su posterior análisis genético (Hubalek, 2003).

De esta mezcla se tomó una muestra con asa bacteriológica para volver a sembrar en agar sangre y así verificar la pureza del cultivo.

8.2.4. Extracción de ADN de las colonias bacterianas

Las colonias bacterianas preservadas en glicerol se resembraron en agar sangre y se incubaron durante 24 horas a 36 °C. La muestra proveniente del cerebro de la tilapia tres, no creció y por lo tanto se descartó. Las colonias crecidas se resuspendieron en caldo BHI y se incubaron durante otras 24 horas a 36 °C.

La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook y Maniatis (1989): Se tomó 1 mL de cultivo líquido de la bacteria crecida en el caldo BHI y se transfirió a tubos Eppendorf™ de 1.5 mL, los cuales se centrifugaron en microcentrifuga a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el precipitado se re suspendió en 150 µl de amortiguador de lisis (Tris-HCl, 100mM; EDTA 100 mM; NaCl 1.5M; CTAB 1%; pH 8.0) y se agitó en vortex. Posteriormente se agregaron 300 µl de solución Birnboim II, se mezcló suavemente con la mano y se dejó reposar en hielo durante cinco minutos. Después se adicionaron 225 µl de solución Birnboim III y se agitó en vortex para liberar el ADN a la solución y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos. Luego se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se recuperó

Enseguida el ADN se extrajo añadiendo un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Las fases se separaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, la fase acuosa se recuperó en un tubo Eppendorf™ de 1.5 mL nuevo y estéril y se precipitó añadiendo 0.6 vol. de isopropanol reposando durante toda la noche a 4°C en congelador.

Posteriormente el ADN se precipitó por centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó con 1 ml de solución de etanol al 70%. El ADN se recuperó por centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla que quedó del precipitado se dejó secar a 37°C. Finalmente se resuspendió en 40 µl de agua desionizada estéril. La concentración y pureza del ADN se verificó mediante medición de la As260/As280 en NanoDrop y posteriormente se verificó con electroforesis en gel de agarosa al 8%.

8.2.5. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las características de la región blanco del gen 16S ARNr se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para el análisis bacteriológico basado en PCR-SSCP para el gen 16S ARNr

Primers	Posiciones de alineamiento	Secuencia	Regiones variables amplificadas	Referencia
SRV31	330-348	5' CGG YCC AGA CTC CTA CGG G'3	V3	Lee <i>et al.</i> , 1996
SRV32	515-533	5' TTA CCG CGG CTG CTG GCA C 3'	V3	Lee <i>et al.</i> , 1996

La amplificación se realizó en un termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf) con las siguientes condiciones para los oligonucleótidos SRV31 y SRV32: 1 ciclo a 95°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 1.5 min, 53°C por 1.5 min y 72°C por 70 s; 1 ciclo de 72°C por 7 min; 1 ciclo sostenido de enfriamiento a 4°C. Las amplificaciones se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (Fig.7).

Los productos de PCR se enviaron a la empresa Macrogen (Estados Unidos) para su purificación y secuenciación por el método de Sanger.

8.3. Listado taxonómico.

Se realizó un estado taxonómico de las especies de bacterias encontradas en los tejidos de las tilapias, usando como referencia el portal virtual ITIS Report (https://www.itis.gov/advanced_search.html) y el manual de bacteriología sistemática de Bergey, 2004.

9. RESULTADOS

9.1. Reporte de la necropsia

Tabla 2. Reporte de la necropsia. Octubre 2017

TILAPIA	SIGNOLOGÍA
1	Exoftalmia bilateral, meningitis hemorrágica, hepatomegalia y miocarditis séptica (abscesos).
2	Cerebro hemorrágico, hígado pálido, corazón blanco (miocarditis séptica) y riñón friable.
3	Exoftalmia, riñón agrandado y friable, miocarditis con parches blancos e hígado agrandado.
4	Exoftalmia, lesiones cutáneas en boca, cerebro hemorrágico friable, hígado hemorrágico friable y corazón blanco (miocarditis séptica).
5	Exoftalmia bilateral, agrandamiento de la cavidad abdominal, agrandamiento de todos los tejidos, hígado con quistes, branquias pálidas, corazón blanco, ascitis con líquido transparente e intestinos llenos de líquido transparente.
6	Exoftalmia bilateral, agrandamiento de la cavidad abdominal, cerebro hemorrágico friable, intestinos llenos de líquido transparente, ascitis, corazón blanco, hígado agrandado y pálido y grasa mesentérica.

Tabla 3. Reporte de la necropsia. Octubre 2019

TILAPIA	SIGNOLOGÍA
1	Hemorragias petequiales, deshilachamiento y erosión en aletas, descamación, úlceras, abultamiento ventral (Fig. 3).
2	Exoftalmia unilateral con ojo opaco, aleta caudal erosionada y hemorrágica, ascitis, hígado agrandado, pálido y muy blando y bazo agrandado (Fig. 4).
3	Lesiones en piel y descamación, coloración anormal, deshilachamiento en aletas, lesiones en branquias, hígado agrandado y pálido (Fig. 5).
4	Aletas erosionadas, lesiones en la boca y branquias, ascitis ligera e hígado agrandado y muy pálido (Fig. 6).
5	Lesiones en boca, aletas erosionadas, ascitis, hígado agrandado, bazo agrandado y muy blando (Fig. 7).

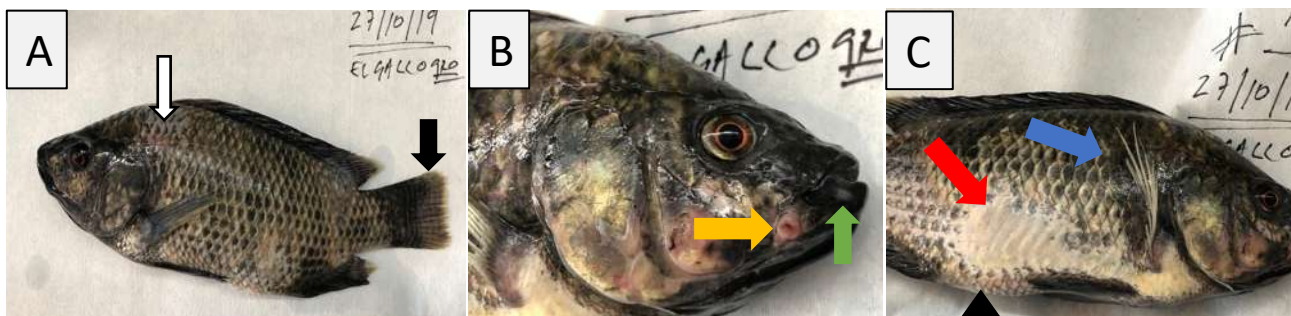


Figura 3. Signos clínicos y lesiones externas en la tilapia 1, causadas por bacteriosis cultivada en la presa El Gallo. **A)** Imagen de cuerpo completo del pez. Se observa descamación, hemorragias petequiales (flecha blanca), putrefacción en la aleta caudal (flecha negra). **B)** Acercamiento rostral, lesiones circundantes a la cavidad oral (flecha verde), úlceras y neoplasia hemorrágica (flecha amarilla). **C)** Pérdida de escamas y descoloración en el flanco derecho del pez (flecha roja), erosión de aleta pectoral (flecha azul). Abultamiento en la parte ventral de la cavidad celómica (triángulo negro).



Figura 4. Signos clínicos, lesiones externas e internas de la tilapia 2, causados por bacteriosis cultivada en la presa El Gallo. **A)** Imagen de cuerpo completo del pez. Se observa aleta caudal erosionada y hemorrágica (flecha negra) y abultamiento ventral (triángulo negro). **B)** Cavidad celómica llena de líquido (ascitis). **C)** Riñón agrandado (flecha amarilla).



Figura 5. Signos clínicos, lesiones externas e internas de la tilapia 3, causados por bacteriosis cultivada en la presa El Gallo. **A)** Imagen del cuerpo completo del pez. Se observa una coloración anormal, pérdida de escamas y descoloración en el flanco derecho (flecha roja). Putrefacción en las aletas dorsal y caudal (triángulos negros). **B)** Branquias lesionadas (flecha amarilla). **C)** Hígado agrandado y pálido (flecha azul).

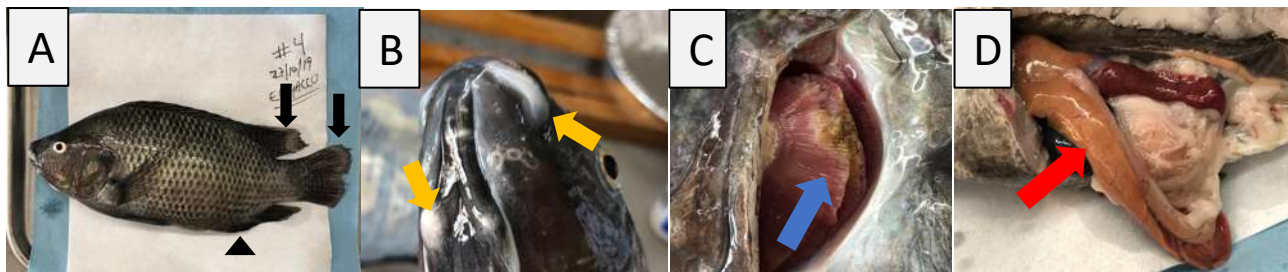


Figura 6. Signos clínicos, lesiones externas e internas de la tilapia 4, causados por bacteriosis cultivada en la presa El Gallo. **A)** Imagen del cuerpo completo del pez. Se observa abultamiento en la parte ventral (triángulo negro) y putrefacción en las aletas dorsal y caudal (flechas negras). **B)** Lesiones abultadas alrededor de la boca (flechas amarillas). **C)** Branquias pálidas con lesiones amarillentas (flecha azul). **D)** Hígado agrandado y amarillento (flecha roja).



Figura 7. Signos clínicos, lesiones externas e internas de la tilapia 5, causados por bacteriosis cultivada en la presa El Gallo. **A)** Imagen de cuerpo completo del pez. Se observa putrefacción en las aletas dorsal y caudal (flechas negras). **B)** Lesiones blancas en las branquias (flecha roja). **C)** Cavity celómica llena de líquido (ascitis), hígado agrandado y pálido (flecha azul), bazo agrandado y blando (flecha verde).

9.2. Identificación morfológica de las colonias bacterianas

Del muestreo de octubre de 2019 se obtuvieron 13 aislados procedentes del bazo, riñón y cerebro de las tilapias, las cuales se determinaron como colonias presuntas de *Streptococcus* sp. (Tabla 4) (Fig. 8).

Tabla 4. Características de las colonias de bacterias.

TILAPIA	ÓRGANO	AGAR	SUPERFICIE	FORMA	BORDE	HEMÓLISIS
1	BAZO	CBA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	GAMA
1	RIÑÓN	CBA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	ALFA
1	CEREBRO	TSA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	-
2	BAZO	CBA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	GAMA
2	RIÑÓN	CBA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	ALFA
2	CEREBRO	TSA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	-
3	BAZO	CBA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	ALFA
3	RIÑÓN	CBA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	ALFA
3	CEREBRO	TSA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	-
4	BAZO	CBA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	BETA
4	RIÑÓN	CBA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	BETA
4	CEREBRO	TSA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	-
5	CEREBRO	CBA	CONVEXA	PUNTIFORME	REDONDO	BETA



Figura 8. Colonias procedentes del cerebro de tilapias enfermas sembradas en Agar Sangre. La flecha negra indica el efecto hemolítico en el agar sangre.

9.3. Identificación microscópica de las colonias bacterianas

Se consideraron como células de *Streptococcus* spp. en base a su morfología celular. La tinción Gram evidenció muestras de cocos Gram-positivos, agrupados en pares o en cadenas (Fig. 9) de los 13 aislados.

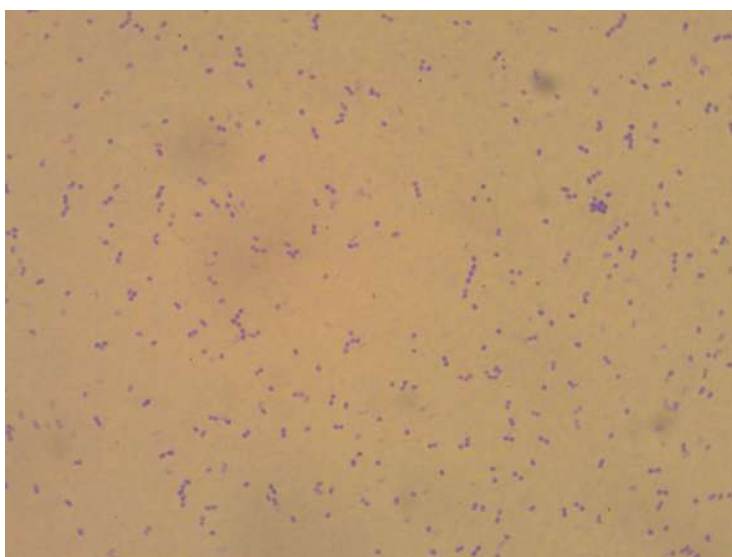


Figura 9. Identificación microscópica de *Streptococcus* spp. en base a su morfología, cocos positivos a la tinción Gram, provenientes del riñón.

9.4. Extracción de ADN de las colonias bacterianas

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 8% (Fig. 10). La procedencia de la extracción de ADN de los aislados bacterianos se organizaron por tilapia y órgano, como se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Orden y procedencia de los aislados bacterianos

CARRILES												
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Marcador molecular	Tilapia 1 Bazo	Tilapia 1 Riñón	Tilapia 1 Cerebro	Tilapia 2 Bazo	Tilapia 2 Riñón	Tilapia 2 Cerebro	Tilapia 3 Bazo	Tilapia 3 Riñón	Tilapia 4 Bazo	Tilapia 4 Riñón	Tilapia 4 Cerebro	Tilapia 5 Cerebro

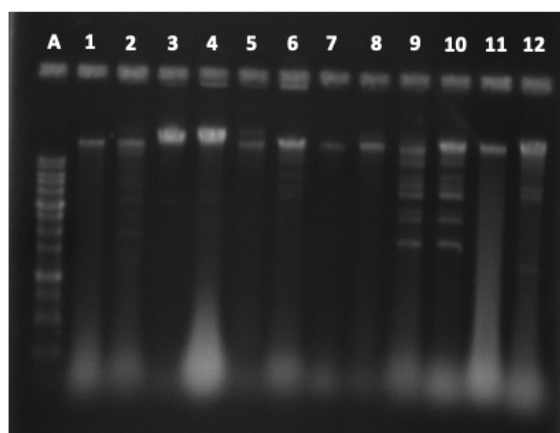


Figura 10. Integridad del ADN verificado por electroforesis en gel de agarosa. Carril A: marcador molecular. Carril 1-12: Extracción de ADN de los aislados bacterianos. Los carriles 9 y 10 presentan bandas adicionales de plásmidos y tienen el mismo perfil plasmídico, es probable que se trate de la misma cepa. El resto de los carriles solo presentan una banda molecular grande de ADN.

9.5. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para el gen 16S se amplificó un fragmento de alrededor 200 pb correspondiente a la región variable 3 del gen (Fig. 11).

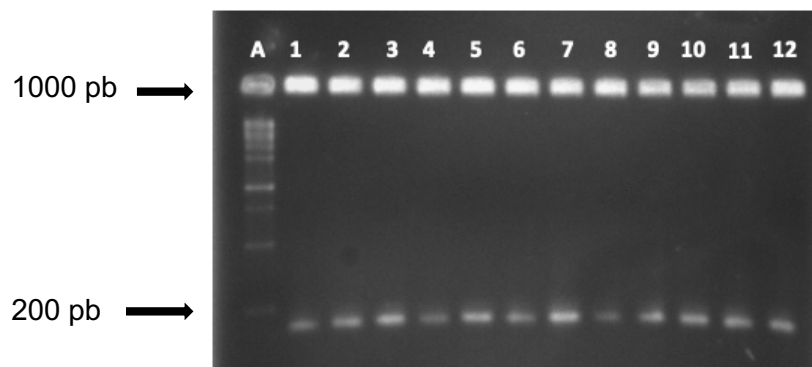


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por PCR. Fragmento de alrededor 200 pb del gen 16S ARNr. Carril A: marcador de peso molecular de 100 pb (Introvirgen™). Carril 1-12: amplificación de las bacterias aisladas.

De las placas de cultivo recibidas en el muestreo de octubre de 2017, se eligieron 10 aislamientos para la prueba mediante 16S rRNA PCR & Sequencing Analysis para identificar las especies bacterianas. Los aislamientos identificados como *Vibrio* sp. o *Aeromonas* sp. se probaron luego utilizando el análisis de secuenciación del gen *gyrB* para identificar a nivel de especie. Esto identificó dos aislamientos de *Aeromonas veronii* y un aislado de *Vibrio cholerae*. Los aislados identificados como *Streptococcus agalactiae* se probaron adicionalmente usando la PCR de tipificación capsular específica de *S. agalactiae* (Tabla 7), que identificó dos biotipos diferentes y dos aislados de tipo capsular diferentes.

Los productos obtenidos de las PCRs del muestreo de 2019, se determinaron como presuntivas de *Streptococcus* sp. (Tabla 8) y se determinó la concentración y pureza utilizando NanoDrop (Tabla 6) para ser enviadas a la empresa Macrogen.

Tabla 6. Concentración y pureza de los productos de PCR. Octubre 2019.

MUESTRAS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentración (ng)	20.1	14.7	15.1	13.7	17.9	8.9	9.2	13.1	17.1	14.5	17.1	4.7
Pureza (260/280)	1.97	1.89	1.86	1.94	1.87	1.96	1.83	2.01	2.00	1.93	1.81	2.40

Tabla 7. Especies de bacterias encontradas en tejido. Octubre 2017.

TILAPIA	CORAZÓN	CEREBRO	BAZO	RIÑÓN
1	<i>Aeromonas veronii</i>	<i>S. agalactiae</i>		
2		<i>S. agalactiae</i>		
3				
4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>		<i>A. veronii</i>
5			<i>S. agalactiae</i>	
6	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>S. iniae</i>		<i>S. iniae</i>

De los seis peces muestreados se obtuvieron una colonia de *Vibrio cholerae*, dos colonias de *Aeromonas veronii* y seis de *Streptococcus agalactiae*.

Tabla 8. Especies de bacterias encontradas en tejido. Octubre 2019.

TILAPIA	BAZO	CEREBRO	RIÑÓN
1	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
2	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
3	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
4	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
5		<i>Streptococcus</i> sp.	

De los cinco peces muestreados se obtuvieron 13 colonias presuntivas de *Streptococcus* sp.

9.6. Listado taxonómico

Reino: Bacteria

Subreino:

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Aeromonadales

Familia: *Aeromonadaceae*

Género: *Aeromonas* (Stanier, 1943)

Especie: *Aeromonas veronii*
(Hickman-Brenner et al., 1988)

Orden: Vibrionales

Familia: *Vibrionaceae*

Género: *Vibrio* (Pacini, 1854)

Especie: *Vibrio cholerae* (Pacini, 1854)

Subreino: Posibacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacili

Orden: Lactobaciliales

Familia: *Streptococcaceae*

Género: *Streptococcus* (Rosenbach, 1884)

Especie: *Streptococcus agalactiae*
(Lehmann y Neumann, 1896)

Especie: *Streptococcus iniae*
(Pier y Madin, 1976)

10. DISCUSIÓN

Las bacterias aisladas de la tilapia de la presa de El Gallo fueron del género *Streptococcus*, las cuales son unas de las bacterias Gram positivas más importantes en el cultivo de tilapia (Conroy, 2009).

Perera *et al.* (1994) Bowser *et al.* (1998) y Romano y Mejía (2003) mencionan que *S. iniae* ha sido identificado como uno de los patógeno más importante que afecta la industria del cultivo de tilapia, en especial en los Estados Unidos de América, y esta enfermedad produce una mortalidad que oscila entre el 30 y 50 % de la producción.

Mientras que en países como Brasil y Colombia se han reportado más casos de *S. agalactiae*, lo que la hace una de las especies más prevalentes en Latinoamérica, llegando a causar altas mortalidades en granjas de tilapia (Jímenez *et al.*, 2007; Marcusso *et al.*, 2015).

Las tilapias muestreadas en esta investigación mostraron una signología que concuerda con la enfermedad por estreptococosis. Ésta es una patología causada por diferentes especies de *Streptococcus* que inducen a cuadros clínicos similares y afecta a más de 20 especies piscícolas cultivadas en agua dulce, salobre y salda alrededor del mundo.

Varios trabajos son concordantes con los resultados obtenidos en nuestra investigación. i) Rey *et al.* (2002) describen que las tilapias infectadas por especies de *Streptococcus* presentan exoftalmia, hematomas, hemorragias, palidez, abdomen abultado, hígados pardos o rojizos, ascitis e intestinos dilatados. li) Romano y Mejía (2003) observaron que los animales infectados dejan de alimentarse, tienen un comportamiento letárgico, presentan endoftalmia, aunque en

ocasiones pueden observarse exoftalmos, además presentan frecuentemente hemorragias difusas o petequiales. En el abdomen observaron ascitis y el hígado se observa friable. iii) Zamrii-Saad *et al.* (2010) reportaron en tilapias infectadas por *S. agalactiae* que presentan bajo peso, patrones erráticos de natación, exoftalmia, opacidad corneal, los órganos se encontraban congestionados e hinchados, en especial las branquias, el hígado, el bazo y los riñones, mientras que el cerebro se observaba blando y ocasionalmente edematoso. iv) En China se aislaron cepas de *S. agalactiae* provenientes de tilapias enfermas, las cuales mostraban signos clínicos como natación errática, falta de apetito, exoftalmia, opacidad corneal, fluido abdominal y úlceras hemorrágicas dentro del opérculo y en la base del pectoral (Ye *et al.*, 2011).

La estreptococosis también ha sido descrita en otras especies como en el pez aleta amarilla *Seriola quinqueradiata* (pez marino cultivado en Japón) con un cuadro clínico similar. La infección se manifiesta en juveniles y en adultos, principalmente en temporadas calientes. Los signos típicos son hemorragias dentro del opérculo, úlceras en el pedúnculo caudal, exoftalmia y hemorragias en el hígado y en los intestinos (Kusuda y Kawaii, 1998).

S. agalactiae es conocido por causar una variedad de infecciones, no sólo en peces, sino también en ganado y en humanos. Boonayatra *et al.* (2020) evidenciaron una estrecha relación genética entre las cepas de *S. agalactiae* aisladas de humanos, leche bovina y pescado. En países como Tailandia donde se presentan varios tipos de ganadería, es posible que se produzca la transmisión entre especies, especialmente la infección zoonótica por el consumo de leche y pescado contaminados.

La temperatura alta del agua es uno de los factores que tiene una relación directa con la infección causando hasta un 70% de mortalidad entre las poblaciones de tilapia expuestas a *S. agalactiae* y *S. iniae*, mientras que el pH y la salinidad no se han vinculado con la mortalidad en términos de significancia estadística (Austin y Austin, 2016). Esto debido a que los peces son ectotermos y no tienen la capacidad para regular su temperatura interna, lo que influye en su respuesta inmune (Hurst, 2016).

En el caso de infección por *Aeromonas*, Noga (2010) menciona que la infección por aeromonas móviles es probablemente la enfermedad bacteriana más común en peces de agua dulce.

Se ha vinculado tradicionalmente a *A. hydrophila*, sin dejar de lado a otras especies, como *A. bestiarum*, *A. dhakensis* y *A. veronii* que pueden causar problemas para la salud de los peces, sin embargo *A. hydrophila* ha sido el foco de atención desde el comienzo del siglo XXI, particularmente como un objetivo para el desarrollo de estrategias de diagnóstico y control. Además, se ha incluido en un manuscrito que describe los patógenos de la tilapia del Nilo de Tanzania (Austin y Austin 2016).

La infección por *A. veronii* se caracteriza por la presencia de úlceras grandes en todo el pez, que conducen a la muerte generalmente en una semana (Rahman *et al.*, 2002).

Sugita *et al* (1995) menciona que *A. veronii* junto con *A. jandaei* están ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos y que poseen el potencial de ser predominantes en los intestinos de peces, agua y sedimentos.

Algunas investigaciones han reportado que tilapias (*Oreochromis niloticus*) infectadas con *A. veronii* junto con *A. jandaei* mostraron hemorragia severa en el hígado y una acumulación de líquido amarillo en el intestino inflamado (Dong *et al.*, 2017).

Las *Aeromonas* también representan un riesgo zoonótico, se han reconocido cada vez con mayor frecuencia como patógenos entéricos humanos. Varios informes han implicado a las especies de *Aeromonas* como causa de gastroenteritis en niños y adultos (Deodhar *et al.*, 1991)

Con respecto a las infecciones por especies de *Vibrio* spp, estos causan algunas de las enfermedades más importantes en peces marinos, sin embargo, también se han aislado en peces de agua dulce, aunque con poca frecuencia (Noga, 2010).

Los peces infectados por *V. cholerae* presentan hemorragias petequiales en la superficie del cuerpo y congestión de los órganos. Además, la evidencia sugiere que es un patógeno de peces altamente virulento (Austin y Austin, 2016). Por lo tanto, el monitoreo de estas especies patógenas del género *Vibrio* en el ambiente acuícola es importante tanto para la industria acuícola como para la salud humana (Tey *et al.*, 2015). Y debe ser aplicado en el cultivo de tialapia en México. Para los humanos, el cólera es una enfermedad transmitida por el agua, y la estrecha asociación de *V. cholerae* con el agua y la población que interactúa con ella sugiere la importancia de la ecología del agua. La enfermedad se caracteriza por una diarrea acuosa devastadora que conduce a una rápida deshidratación, y la muerte ocurre en 50 a 70% de los pacientes no tratados (Faruque *et al.*, 1998).

Yamanoi (1980) señaló que con ayu (*Plecoglossus altivelis*), la mortalidad comenzó a partir 2 a 7 días a temperaturas del agua de 21 y 26 °C, pero no se produjeron muertes si la temperatura del agua era de 16 °C. En comparación, una población de anguilas sufrió un 10% de mortalidad en 5 días a una temperatura del agua de 21 ° C y un 30% de muertes en 3 a 7 días a 26 °C. Esto sugiere que *V. cholerae* es probable que sea problemático para los organismos acuáticos sólo a temperaturas altas del agua.

Tey *et al* (2015) obtuvo aislados de *V. cholerae* provenientes de estanques de agua de mar como de agua dulce, todos relacionados significativamente con la temperatura del agua y la salinidad.

Este también es un factor de riesgo importante para la mayoría de los tipos de vibriosis, lo que la convierte en una enfermedad de verano, además del hacinamiento, la contaminación orgánica y otros factores estresantes también pueden precipitar brotes (Noga, 2010).

Hurst (2016) menciona que una temperatura más alta mejora la respuesta inmune en los peces tropicales, mientras que una temperatura más baja ejerce un efecto adverso, pero si la enfermedad aparece a temperaturas más altas se debe a un daño autoinmune que desencadena las infecciones, o a un efecto directo sobre el crecimiento del patógeno.

La alta densidad de población de peces y el trauma por el manejo de ellos, son otros factores que ocasionan problemas bacterianos, debido al estrés que desencadena por afectar en la respuesta inmune (Woo *et al.*, 2002).

Debido al papel principal de las malas condiciones del agua y las altas temperaturas en la patogénesis de la enfermedad y la anorexia manifestada por los

peces afectados, es muy difícil de tratar. La vacunación por inyección es prometedora, mientras que la terapia con antibióticos no se considera factible (Ronald, 2012).

En caso de aparecer la enfermedad, se recomienda la disminución del alimento debido a que los peces presentan anorexia y la acumulación de partículas no consumidas deteriora la calidad del agua. Además, se recomienda la disminución de la densidad de cultivo para disminuir los niveles de estrés, así como la carga del patógeno en la población, el mantenimiento de niveles de oxígeno óptimos y temperaturas bajas (FAO, 2011).

11. CONCLUSIONES

Las tilapias muestreadas presentaron una signología similar, que se caracteriza por patrones erráticos en la natación, letargia, descamación, palidez, hemorragias, lesiones en la piel, erosión de aletas y exoftalmia.

Presentaron daños internos, como agrandamiento y palidez de sus órganos, hemorragias y ascitis.

S. agalactiae y *S. iniae* son bacterias patogénicas primarias en los cultivos de tilapia, mientras que *Aeromonas veronii* se le considera como un patógeno secundario. Y *Vibrio cholerae* es una bacteria que está asociada principalmente a una contaminación de origen fecal en el agua pero su rol como patógeno primario aún necesita más investigación.

12. RECOMENDACIONES

Se recomienda que las organizaciones gubernamentales como los comités de sanidad intervengan en las investigaciones para llevar a cabo el financiamiento de los proyectos.

Es necesario establecer buenas prácticas de manejo, desde la siembra, la cosecha, eviscerado y la precomercialización para garantizar productos de calidad.

Contar con el servicio de médicos veterinarios y/o expertos en el tema para asegurar el bienestar de los peces y regular el uso descontrolado de medicamentos.

Adoptar medidas diversas para controlar las enfermedades bacterianas en los peces de cultivo, como el control de contaminantes, uso de cepas de peces genéticamente resistentes, dietas adecuadas, uso de vacunas multivalentes, uso de prebióticos y probióticos, tratamiento de agua y prevención del movimiento de animales infectados.

13. LITERATURA CITADA

- Al-Harbi, A. H., y Uddin, N. (2005). Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 250 (3-4), 566-572.
- Assis, G. B. N., Tavares, G. C., Pereira, F. L., Figueiredo, H. C. P., & Leal, C. A. G. (2017). Natural coinfection by *Streptococcus agalactiae* and *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of fish diseases*, 40(1), 51-63.
- Austin, B. & Austin, D. A. 2016. Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish (6th ed). Springer. Switzerland.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.
- Boonyayatra, S., Wongsathein, D., & Tharavichitkul, P. (2020). Genetic Relatedness Among *Streptococcus agalactiae* Isolated from Cattle, Fish, and Humans. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 137-143.
- Bowser, P. R., Wooster, G. A., Getchell, R. G., & Timmons, M. B. (1998). *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(3), 335-339.
- Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., ... y Gravningen, K. (2013). Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1759-1768.
- Buschmann, A., & Fortt, A. (2005). Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Revista Ambiente y Desarrollo*, 21(3), 58-64.
- Campos, M. N., Sevilla, P. M., Velasco, L. S., Filograsso, L. C., & Cárdenas, O. L. (2016). Acuicultura: estado actual y retos de la investigación en México. *Revista AquaTIC*, (37).
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. 2019. Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca
- Conroy, G. (2009). Estreptococosis en tilapia: Prevalencia de las especies de *Streptococcus* en América Latina y sus manifestaciones patológicas. Intervet Schering-Plough Animal Health (ed). Memorias Symposium

Manejo de Streptococcus en Peces de Aguas Cálidas. En *Congreso Mundial de Acuicultura* (pp. 45-87).

DE GRAM, C. O. L. O. R. A. C. I. O. N. (1993). Microbiología veterinaria.

Deodhar, L. P., Saraswathi, K., & Varudkar, A. (1991). *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. *Journal of clinical microbiology*, 29(5), 853-856.

Dong, H. T., Techatanakitarnan, C., Jindakittikul, P., Thaiprayoon, A., Taengphu, S., Charoensapsri, W., ... & Senapin, S. (2017). *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of fish diseases*, 40(10), 1395-1403.

FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma.

FAO. 2006. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Roma

FAO. 2011. Manual Básico de Sanidad Piscícola. Paraguay.

FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014: Opportunities and Challenges. Rome.

FAO. 2015. FishStat Plus – Universal Software for Fishery Statistical Time Series. Rome.

FAO. 2018. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Cumplir los Objetivos de Desarrollo Sostenible. Rome.

Faruque, S. M., Albert, M. J., & Mekalanos, J. J. (1998). Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(4), 1301-1314.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York.

Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229.

Hurst, R.J. (2016). *The Rasputin Effect: When Commensals and Symbionts Become Parasitic*. Switzerland: Springer.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2009). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*. Cutzamala de Pinzón, Guerrero. México. 9 pp.

- Ismail, N. I. A., Amal, M. N. A., Shohaimi, S., Saad, M. Z., y Abdullah, S. Z. (2016). Associations of water quality and bacteria presence in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*. *Aquaculture Reports*, 4, 57-65.
- Jiménez, A. P., Rey, A. L., Penagos, L. G., Ariza, M. F., Figueroa, J. y Iregui, C. A. (2007). *Streptococcus agalactiae*: Hasta ahora el único *Streptococcus* patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 54(II), 285-294.
- Kusuda, R., & Kawai, K. (1998). Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. *Fish pathology*, 33(4), 221-227.
- Leal, L. C. S., & Ramírez, L. C. C. (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Nova*, 3(3).
- Leal, Yubiry, Reyes, Mayra, Álvarez, Julia D, Obregón, José, y Viña, Xiomara. (2009). Enteropatogenicidad de bacterias aisladas de peces, del agua y plancton de su entorno en Venezuela. *Revista Científica*, 19(5), 446-454.
- Lee, D. H., Zo, Y. G., & Kim, S. J. (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), 3112-3120.
- Marcusso, P. F., Eto, S. F., Claudiano, G. D. S., Vieira, F. C. F., Salvador, R., Moraes, J. R. E. D., & Moraes, F. R. D. (2015). Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. *Bioscience Journal*, 549-554.
- Moscoso Cavallini, J., León Suematsu, G., y Gil Merino, E. (1992). Reuso en acuicultura de las aguas residuales tratadas en las lagunas de estabilización de San Juan. Sección II: Tratamiento de las aguas residuales y aspectos sanitarios. CEPIS. Lima, Perú.
- Noga E.J. (2010) Fish Disease: Diagnosis and Treatment. 2nd edn. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.
- Ortega, C., Mancera, G., Enríquez, R., Vargas, A., Martínez, S., Fajardo, R., y Romero, A. (2016). First identification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* causing mortality in Mexican tilapia *Oreochromis* spp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 120(3), 205-215.
- Ortega, C. García, I., Irgang, R., Fajardo, R., Tapia-Cammas, D., Acosta, J., & Avendaño-Herrera, R. (2018). First identification and characterization of

- Streptococcus iniae* obtained from tilapia (*Oreochromis aureus*) farmed in Mexico. *Journal of fish diseases*, 41(5), 773-782.
- Perera, R. P., Johnson, S. K., Collins, M. D., & Lewis, D. H. (1994). *Streptococcus iniae* associated with mortality of Tilapia nilotica × T. aurea hybrids. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(4), 335-340.
- Prescot, L., J. Harley y D. Klein. 2002. Microbiology. Mc Graw-Hill, Nueva York, EEUU.
- Pulpipat, T., Lin, K. H., Chen, Y. H., Wang, P. C., y Chen, S. C. (2019). Molecular characterization and pathogenicity of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from cultured tilapia (*Oreochromis* sp.) in Taiwan. *Journal of fish diseases*, 42(5), 643-655.
- Rahman, M., Colque-Navarro, P., Kühn, I., Huys, G., Swings, J., & Möllby, R. (2002). Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(2), 650-655.
- Ramírez-Paredes, J. G., Thompson, K. D., Metselaar, M., Shahin, K., Soto, E., Richards, R. H., ... & Adams, A. (2017). A polyphasic approach for phenotypic and genetic characterization of the fastidious aquatic pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2324.
- Ramirez-Paredes, J. G., Larsson, P., Thompson, K. D., Penman, D. J., Busse, H. J., Ohrman, C., ... & Colquhoun, D. J. (2020). Reclassification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Ottem et al. 2009 as *Francisella orientalis* sp. nov., *Francisella noatunensis* subsp. *chilensis* subsp. nov. and emended description of *Francisella noatunensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Rey, A. L., Castro, C. I., y Verján, N. (2002). Diagnóstico clínico patológico de brotes de enfermedades en tilapia roja (*Oreochromis* spp.). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 49(1), 13-21.
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., & Demo, M. (2015). Manual de microbiología general.
- Ridgways Biologicals Ltd. a Ceva Santé Animale company. Protocol for Sampling Fish for the Screening of Bacterial and Viral Pathogens.
- Roberts, R.J. (2012). Fish Pathology. Fourth Edition. UK: Wiley-Blackwell.

- Rodríguez, G. M., Rodríguez, C. D. G., Monroy, G. Y. y Mata, S. J. A. (2001). Manual de Enfermedades de Peces. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*, 3(15), 1-14.
- Romano, L. A., & Mejía, J. (2016). Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo ya humanos. *Revista AquaTIC*, (18).
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989 2nd edition Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Soto-Rodríguez, S. A., Cabanillas-Ramos, J., Alcaraz, U., Gomez-Gil, B., & Romalde, J. L. (2013). Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *Journal of applied microbiology*, 115(3), 654-662.
- Suazo-Ortuño, I., Del Val-De Gortari, E and Benítez-Malvido, J. 2013. Rediscovering an extraordinary vanishing bug: *Llaveia axin axin*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Núm.84: pp 338-346.
- Sugita, H., Tanaka, K., Yoshinami, M., & Deguchi, Y. (1995). Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(11), 4128-4130.
- Tey, Y. H., Jong, K. J., Fen, S. Y., & Wong, H. C. (2015). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio vulnificus* in the aquacultural environments of Taiwan. *Journal of food protection*, 78(5), 969-976.
- Tveteras R., Nystoyl R. & Jory D. E.. (2019). GOAL 2019: Revisión y pronóstico de la producción mundial de peces. julio 30, 2020, de Global Aquaculture Advocate Sitio web: <https://www.aquaculturealliance.org/>
- Verner-Jeffreys, D. W., Wallis, T. J., Cano, C. I., Ryder, D., Haydon, D. J., Domazoro, J. F., ... & Bean, T. (2018). *Streptococcus agalactiae* Multilocus sequence type 261 is associated with mortalities in the emerging Ghanaian tilapia industry. *Journal of fish diseases*, 41(1), 175.
- Whitman, K. A. y MacNair, N. G. 2004. *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual, Techniques and Procedures*. Iowa State Press. Iowa, United States of America. 258 pp.
- Woo, P.T.K., Bruno, D.W., & Lim, L.H.S.. (2002). *Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture*. UK: CABI Publishing.

- WRI, C. (2014). Climate analysis indicators tool: WRI's climate data explorer. *World Resources Institute, Washington, DC*. <http://cait2.wri.org>.
- Yamanoi H, Muroga K, Takahashi S (1980) Physiological characteristics and pathogenicity of NAG *vibrio* isolated from diseased ayu. *Fish Pathol* 15:69–73 .
- Ye, X., Li, J., Lu, M., Deng, G., Jiang, X., Tian, Y., ... & Jian, Q. (2011). Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. *Fisheries Science*, 77(4), 623-632.
- Zamri-Saad, M., Amal, M. N. A., & Siti-Zahrah, A. (2010). Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis spp.*) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2-3), 227-229.