



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

INFORME FINAL DEL  
SERVICIO SOCIAL  
PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE BIOLOGA

Presencia de *Saprolegnia* sp. en huevos de *Oncorhynchus mykiss*  
y agua del sistema de producción acuícola el Zarco

QUE PRESENTA EL ALUMNA

**Anayeli Guzmán Enríquez**

**210321989**

**ASESORES INTERNOS**

**Dra. Judith Castellanos Moguel (28248)**  
Laboratorio de Micología  
Departamento del Hombre y su Ambiente

**M. en C. Araceli Cortes García (30287)**  
Laboratorio de Reproducción, Genética y  
Sanidad Acuícola  
Departamento del Hombre y su Ambiente

Ciudad de México.

Noviembre, 2019.

## ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
MARCO REFERENCIAL.....	9
OBJETIVOS .....	13
METODOLOGÍA.....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIÓN.....	24
AGRADECIMIENTOS.....	24
REFERENCIAS.....	25

## RESUMEN

Casi todas las epizootias que pueden afectar a la trucha arco iris en las piscifactorías dedicadas a la producción para consumo, son atribuibles a la elevada densidad de población provocando problemas sanitarios causados principalmente por hongos y bacterias. En el caso de las enfermedades micóticas como la saprolegniasis se pueden ver afectados los huevecillos.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de *Saprolegnia* sp. en huevos de trucha arco iris y en el agua del sistema de producción, para esto se recolectaron muestras de huevos y agua en el centro acuícola El Zarco. El medio de cultivo utilizado fue APD y las incubaciones se realizaron a 15 °C y 28 °C. Los resultados obtenidos indican que la prevalencia de *Saprolegnia* sp. y agentes bacterianos en huevos y tinas donde se localizan los reproductores de trucha arco iris obtuvieron los valores más elevados 82.5% y 100% respectivamente y se determinó que la velocidad de crecimiento de las colonias de *Saprolegnia* sp. es mayor a una temperatura de 15 °C teniendo una velocidad de crecimiento de 1.49 cm por día, en un medio de cultivo de APD sintético complementado con Cloranfenicol, la prueba de t-Student indica que existe diferencia estadísticamente significativa en la velocidad de crecimiento con un valor de  $p=0.06$ , con un nivel de confianza del 95%. De los 88 aislados positivos de *Saprolegnia* sp., 66 tienen aspecto flocoso y algodonoso (46 H, 5 TC, 5 E, 5 R), 7 aspecto veloso y lanoso (15 H, 1 TC, 1 SI, 4 R) y 1 pulvurulento.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola se ha incrementado de manera significativa en las últimas décadas como una respuesta a las necesidades crecientes de alimentos para una población en constante crecimiento, así como a la necesidad de crear empleos y fuentes de divisas para los países en vías de desarrollo y en los países desarrollados como una industria generadora de enormes ganancias sobre todo en el cultivo de especies de alto valor comercial (Martínez, 1998). Tan solo en 2004 la producción mundial de la pesca y acuicultura suministró alrededor de 106 millones de toneladas de pescado para consumo humano, lo que equivale a un suministro *per cápita* aparente de 16,6 kg (equivalente del peso en vivo), que es el más alto registrado en la historia. De este total, la acuicultura representó el 43 por ciento (FAO, 2006).

En México la acuicultura representa una alternativa para ampliar la oferta alimentaria en el país, contribuyendo a la seguridad alimentaria, generación de divisas y crear fuentes permanentes de empleo, estimulando el desarrollo regional. Esta actividad participa en la producción pesquera nacional con poco más de 15,83 por ciento de la producción nacional y el crecimiento durante los últimos diez años presenta una tasa promedio de 3,44 por ciento, para el año 2001 aportó aproximadamente un 12,93 por ciento de la producción pesquera total (521 957 toneladas). La Carta Nacional Pesquera cita que en México se cultivan un total de 61 especies, de las cuales 40 son nativas y 21 son de origen exótico (FAO, 2005-2017), entre ellas por su relevancia en la producción acuícola encontramos a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Pillay, 2004) de la cual en el año 2005 se produjeron 560 000 toneladas para el consumo (Liñan *et al.*, 2007).

Para fortalecer y consolidar esta actividad se deben considerar ciertos aspectos clave que requieren de la participación del sector productivo en los trabajos de investigación y desarrollo tecnológico sobre aspectos como la sanidad y el manejo ambiental (FAO, 2005-2017). Ya que un manejo inadecuado puede provocar problemáticas en el sistema de producción como la aparición de enfermedades, es por esto que hay que contar con un programa de sanidad para prevenir la dispersión de patógenos de la especie cultivada. De las enfermedades que comúnmente afectan a *Oncorhynchus mykiss* son causadas por virus, bacterias protozoos, parásitos y hongos acuáticos (Liñan *et al.*, 2007). En el caso de las enfermedades micóticas como la saprolegniasis se ven afectadas la piel, branquias y los huevecillos y es causada por *Saprolegnia* sp. (Pillay, 2004).

Por lo anterior, la presente investigación pretende determinar la presencia de *Saprolegnia* sp. en huevos de *Oncorhynchus mykiss* y en el agua del sistema de producción que es el medio en el cual la trucha arco iris pasa sus fases de desarrollo, teniendo como premisa que una identificación temprana de los agentes patógenos presentes en el agua puede dar pie a que se implementen de forma oportuna y precisa las medidas de sanidad adecuadas para prevenir una epizootia en la especie de interés económico, evitando así afectaciones en la producción.

## II. MARCO TEÓRICO

### III. 1. ACUACULTURA

La acuicultura es una actividad que en la actualidad tiene una mayor importancia en el desarrollo económico y en el manejo de los recursos naturales (Pillay, 2004). El cultivo modifica el entorno natural, pero siempre que sea posible lo debe de hacer respondiendo a las necesidades biológicas y sanitarias necesarias para una producción óptima (Barnabé, 1996).

Martínez, 1998 menciona que los beneficios de la actividad acuícola son:

- a) La producción de alimento y mejoramiento de los niveles de nutrición de la población de bajos recursos sobre todo cuando se trata del cultivo de especies de alto valor nutritivo y bajo precio como la tilapia, la carpa, etc.
- b) La generación de ingresos y empleo y por lo tanto la elevación de los niveles de vida.
- c) Evita la sobreexplotación de recursos naturales y en muchos casos contribuye al mantenimiento de los lotes, mediante la repoblación de los sistemas naturales con crías cultivadas.

La acuicultura en la actualidad representa una actividad significativa por la generación de divisas para el país, pero también hay contingencias sanitarias para las cuales la industria debe de estar preparada con programas y tomas de iniciativas que conlleven a un manejo adecuado de la actividad. En el caso del Estado de México a partir del año 2000 el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de México ejerció una mayor vigilancia de las prácticas sanitarias relacionadas con la actividad acuícola, tanto en cantidad como en calidad, a través de la creación del Comité de Sanidad Acuícola del Estado de México teniendo como objetivo que las nuevas Unidades de Producción Trutícola (UPT) estuvieran establecidas bajo un esquema empresarial, a partir de este momento el cultivo de la trucha dejó de ser una actividad complementaria y se convirtió en una actividad productiva integral (García *et al.*, 2013). El objetivo de un programa de sanidad es prevenir la dispersión de patógenos de la especie cultivada y con medidas como la desinfección de huevecillos se pretende impedir la transmisión de patógenos de la población progenitora a la descendencia y del vivero a las aéreas de crecimiento estas medidas sanitarias pueden ayudar a confinar los patógenos de una población infectada a una parte de la granja e impedir que dispersen la infección a cuerpos de aguas naturales. Entre las principales enfermedades a las que el acuicultor tiene que enfrentarse están las enfermedades micóticas como lo es *Saprolegnia* (Pillay, 2004), considerado como el patógeno fúngico más importante en el cultivo de peces de agua dulce. La infección por *Saprolegnia* de huevos de *Oncorhynchus mykiss* y su consiguiente difusión a los huevos vivos adyacentes puede constituir un serio problema, precisando el uso frecuente de verde de malaquita (Brown, 2000).

### II. 2. TRUCHA ARCO IRIS

Pertenece a la familia de los salmónidos y ha demostrado ser la más adaptable y constituye, por un margen muy grande, la especie base en la producción de pescado de

agua dulce en la mayor parte de las piscifactorías europeas y norteamericanas de aguas continentales (Rubín, 1981) ya que esta especie tiene un rápido crecimiento y se adapta fácilmente a la alimentación artificial siendo características que traen como consecuencia que alrededor de 98% del volumen total de producción se tenga gracias a la acuicultura (Liñan *et al.*, 2007). Fue importada de los Estados Unidos, donde se consiguió la selección hace unos cuarenta años, se haya actualmente bastante extendida en las aguas frías de México, es trabajada en cautiverio por algunos granjeros del centro del país en escala incipiente. La reproduce y distribuye el primero que se instaló de los centros reproductores piscícolas oficiales, El Zarco, establecido sobre la carretera México - Toluca (Rubín, 1981).

## **II. 3. CONDICIONES AMBIENTALES PARA SU REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO**

La trucha vive en aguas frías y es capaz de ocupar hábitats muy diversos, es una especie que puede soportar un amplio rango de temperaturas (de 0 a 27 °C), pero el desove y el crecimiento se producen en un rango más estrecho (de 9 a 14 °C). La época de puesta de arco iris es de diciembre a mayo, pero en todas las especies y subespecies existen diferencias individuales (Arregui, 2013), en su medio natural, la trucha busca los remansos para reproducirse, depositando sobre la piedra, o en camas de arena, una freza anual de 1500 huevecillos cuando está joven y una cantidad mayor cuando ha alcanzado la edad adulta. En condiciones propicias la incubación de las ovas tarda de 20 a 30 días, según sea el agua más templada o más fría, pues sobre los 15 °C la eclosión de los óvulos es menos lenta que alrededor de los 5 °C, es decir que a mayor frialdad del agua corresponde un periodo de incubación más dilatado (Rubín, 1981).

En el Zarco, se trabaja provocando artificialmente el desove y la expulsión en sementales seleccionados, y efectuando con ellos la inseminación artificial. Incuban la hueva extendida sobre el fondo de malla de cajones bastidores. En cada uno de dichos artefactos, que han de lavarse bien y manejarse con cuidado y delicadeza cuando se recoja y ponga incubar en ellos el producto de un desove inducido y que se haya fecundado, cabrán extendidos unos 12 000 huevecillos (Rubín, 1981).

### **II. 3. 1. Oxígeno Disuelto**

El rango óptimo de oxígeno disuelto es próximo a saturación (100%), pero los límites de cultivo para incubación de huevos y primeras fases embrionarias suelen rondar los 6 mg/L (Figura 1A), en etapas posteriores el límite puede encontrarse en los 4-5 mg/L, hay que tomar en cuenta que la cantidad máxima de oxígeno disuelto en el agua (saturación) depende principalmente de la temperatura. A mayor temperatura, menor cantidad de oxígeno disuelto, y viceversa (Arregui, 2013).

### **II. 3. 2. Temperatura**

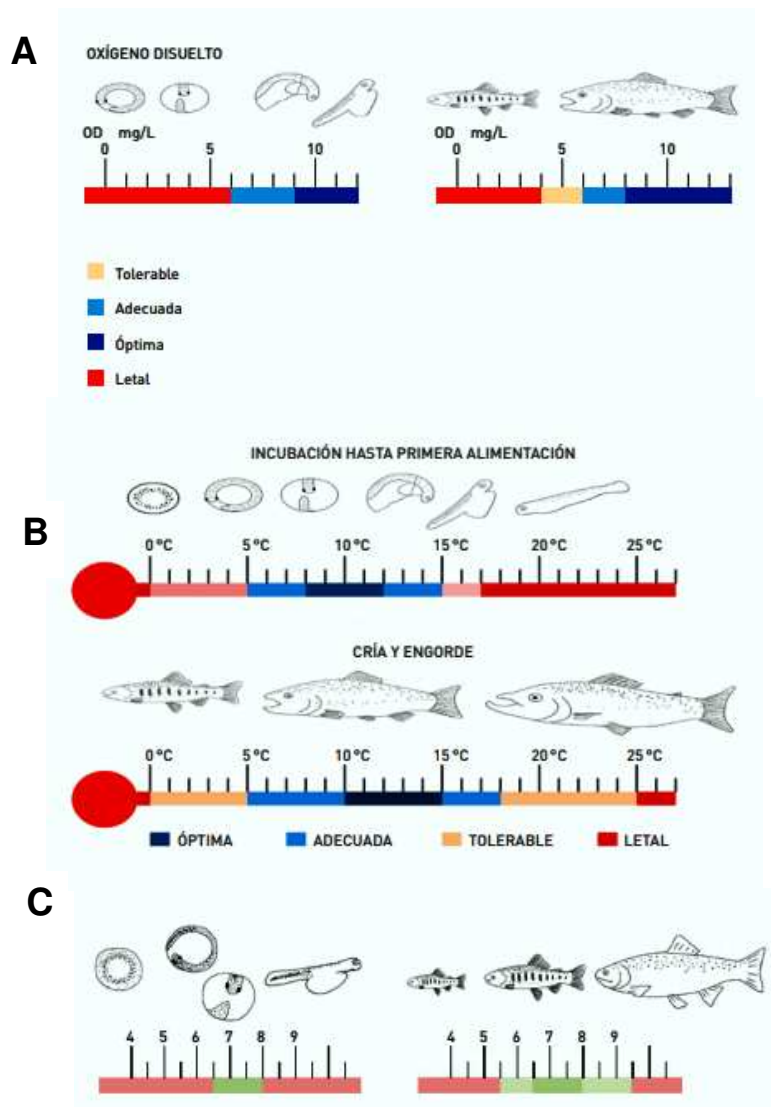
La temperatura es un factor determinante para el desarrollo adecuado de la trucha arco iris desde la incubación hasta la primera alimentación siendo de 8 a 12 °C el rango óptimo (Figura 1B) (Arregui, 2013).

### II. 3. 3. pH

El carácter ácido o básico de un agua es determinante en piscicultura; los salmónidos son poco tolerantes con los cambios bruscos, cosa que puede suceder en zonas de pH ácido. Dependiendo de la edad, la trucha tolera rangos menores o mayores de pH, específicamente en periodo de incubación de huevos y primeras fases embrionarias tolera rangos entre 6.5 y 8 (Figura 1C) (Arregui, 2013).

### II. 3. 4. Materia en suspensión

No todos los tipos de sólidos en suspensión provocan los mismos efectos ni a todas las edades los peces presentan la misma susceptibilidad (Brown, 2000. Tomado de Arregui, 2013). Las truchas necesitan aguas claras para la incubación puesto que los huevos son especialmente sensibles a cargas excesivas de sólidos en suspensión, ya que impiden la respiración a través de la membrana que los recubre (Reiser y White, 1988; Roberts, 2001. Tomado de Arregui, 2013).



**Figura 1.** Rangos de tolerancia para el desarrollo de *Oncorhynchus mykiss*: Oxígeno disuelto (A), temperatura (B), pH (C).

## II. 4. INCUBACIÓN CONTROLADA

Proceso biológico que tiene lugar desde la inseminación de la hueva hasta el momento en que avivan o nacen las larvas del pescado para ello se recomienda que todo él transcurra en un local en penumbra, procurándose, cuando haya necesidad de luz para efectuar alguna manipulación, que ésta sea indirecta y lo más tenue posible. Además de mantener a oscuras o muy poco iluminado el local en donde se hallan las piletas, deben dejarse los huevecillos en absoluta inmovilidad, hasta que, transcurridos de 3 a 5 días, se alcancen a distinguir como dos puntitos negros y a través de la semitransparencia de la cutícula del óvulo, los ojos de los pececillos que se van formando (Rubín, 1981). A partir de entonces, los huevecillos son menos sensibles al manejo, y deberá procederse a conservar limpias las camas de huevo retirando los óvulos estériles, que se distinguirán por su detonante colorido blanco mate, entre los fecundados y en proceso de germinación, los cuales conservan su tono original amarillo brillante. Esto se hace con el fin de que, al descomponerse esos huevos perdidos, no se constituyan en cultivos de hongos cuyos micelios podrían perjudicar a los huevecillos embrionados (Rubín, 1981).

Para el periodo de incubación de trucha arco iris hay que tomar en cuenta ciertos cuidados como: evitar incidencia de rayos solares, tener el agua limpia, libre de sedimentos y bien oxigenada. Este periodo dura entre 16 a 18 días de incubación y los huevos eclosionan a los 26 días en un rango de temperatura de 9 a 12 °C (Liñan *et al.*, 2007).

## II. 5. PATOLOGÍA

Casi todas las epizootias que pueden afectar a la trucha arco iris en las piscifactorías dedicadas a la producción de trucha para consumo, son atribuibles a la domesticación y a la elevada densidad de población. Las enfermedades que comúnmente afectan a la trucha arco iris se pueden clasificar en dos grandes grupos: enfermedades causadas por virus y enfermedades causadas por organismos unicelulares patógenos, bacterias o protozoos. Así mismo, pueden ser atacadas por hongos acuáticos (Liñan *et al.*, 2007).

## II. 6. ENFERMEDADES MICÓTICAS

Las principales enfermedades micóticas son causadas por miembros de los órdenes Saprolegniales, que causan una multitud de micosis tegumentarias en la mayoría de los peces teleósteos (Pillay, 2004).

### II. 6. 1. Saprolegniasis

Algunas especies del género *Saprolegnia* pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo del pez, incluyendo branquias, aletas y boca y comúnmente se reportan como invasores secundarios, es decir que cuando los mecanismos de defensa de los peces se ven afectados por otras enfermedades o por lesiones físicas como las causadas por las bacterias *Aeromonas* y *Flexibacter* son el sitio ideal para el inicio de infecciones por el mencionado hongo, las zoosporas se liberan y quedan en contacto con tejidos muertos o lesionados, una vez que la hifa se establece invade los tejidos sanos. El ciclo de la zoospora puede ocurrir en 48 horas sin importar la época del año. La temperatura del agua es un factor de gran importancia en este tipo de infecciones, ya que éstas se incrementan cuando las temperaturas son bajas, o bien cuando se tienen peces de agua templada en agua fría durante el verano.



*Saprolegnia* tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 15-30 °C, con un rango de 0.5-30 °C (Jiménez *et al.*, 1988) y a los 18 °C puede colonizar la lesión y a menos de 15 °C puede provocar epizootias en la población de truchas (Liñan *et al.*, 2007); entre los factores que pueden ser causa de saprolegniasis están deficiencias nutricionales en los peces, presencia de sustancias tóxicas en el agua, lesiones en la piel, así como estrés físico provocados por cambios bruscos de temperatura y el pH (Jiménez *et al.*, 1988).

**Cuadro clínico:** Las lesiones sobre la piel se presentan como manchas blancas o blanco-grisáceas, las cuales debido al micelio tienen un aspecto algodonoso. En ocasiones estas manchas se observan de color café o marrón debido al barro o arcilla que se adhiere al micelio. Aunque este tipo de infección predomina en la piel y las branquias, el hongo también puede invadir músculos y en ocasiones órganos internos. Generalmente, la vía de entrada son las heridas en la piel y, cuando la infección involucra a órganos internos, la vía es intestinal (Jiménez *et al.*, 1988).

**Diagnóstico:** Se deben localizar las hifas en los tejidos del pez, así como también en la parte externa del mismo. Las hifas son cenocíticas y forman zoosporangios terminales con un poro apical (Jiménez *et al.*, 1988).

**Tratamientos:** Cuando la enfermedad se ha presentado es necesario restablecer el equilibrio entre el hospedante y el patógeno resolviendo los problemas ambientales y aplicando el tratamiento terapéutico adecuado puesto que la rápida multiplicación del patógeno en el hospedante y el peligro de transferencia a otros individuos de la población podría dar por resultado una epizootia incontrolable (Pillay, 2004). Para la resolución de problemáticas de índole micótico como lo es *Saprolegnia* se ha hecho uso de una serie de productos químicos que representan una problemática aún más grande ya que el uso de fármacos provoca una resistencia de los organismos patógenos a dichos fármacos además de la alteración del equilibrio ecológico (Martínez, 1998).

## II. 7. ENFERMEDADES BACTERIANAS

Generalmente los problemas sanitarios en peces causados por bacterias y hongos están asociados al inadecuado manejo de los organismos, principalmente por la mala calidad del agua, entre las enfermedades causadas por bacterias son la Furunculosis, la *Septicemia* causada tanto por bacterias del género *Aeromonas* como *Pseudomonas*, y la Vibriosis, todas estas comunes en nuestro país (Rodríguez, 2001).

## III. MARCO REFERENCIAL

Songe *et al.* (2016) analizaron los cambios morfológicos de huevos de salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.), infectados experimentalmente con *Saprolegnia*. Los especímenes hembras se obtuvieron de Landcatch, Escocia. Se recolectaron huevos infectados por cada hembra (n =70) se colocaron en extracto de agar glucosa-levadura (GY) y para inhibir el crecimiento bacteriano se le añadió cloranfenicol, los aislados fueron incubados a  $21 \pm 1$  °C en un periodo de 2 a 5 días. Como resultados reportaron que de los

diez aislados 2 pertenecen a *Saprolegnia* diclina clado IIIA, 6 a *Saprolegnia* parasitica y con los 2 restantes no tuvieron éxito debido a contaminaciones de levaduras y bacterias. En cuanto al examen que realizaron de los cambios histopatológicos reportaron que existen diferencias dependiendo de la especie, en el caso de los huevos infectados con *S. parasitica* las hifas penetraron el corion del huevo sin destruirlo mientras que los huevos infectados con *S. diclina*, tuvieron una interrupción completa o corion destruido. Por lo anterior, especulan que *S. diclina* posiblemente emplee una estrategia necrotrófica, mientras *S. parasitica* representaría un linaje biotrófico.

Castro *et al.* (2014) realizaron un estudio que se llevó a cabo en dos criaderos artesanales de la localidad de Iquitos, Perú. Tuvieron como objetivo aislar e identificar morfológicamente *Saprolegnia* sp. en paiche (*Arapaima gigas*). Así como la descripción de las características macroscópicas y microscópicas y la identificación de la especie. Para esto ellos muestrearon 30 paiches de un año, con un peso promedio de 7 kg y con una longitud promedio de 97 cm, que presentaron características patológicas como: heridas con manchas algodonosas en piel, aletas deshilachadas y branquias con zonas de aspecto arcilloso. En total fueron confirmadas 13 cepas pertenecientes al género *Saprolegnia*. De estas muestras positivas, el 53,8% fueron provenientes de las aletas, 23,1% de las branquias y 23,1% de otras heridas corporales. Después de las observaciones macroscópicas de las colonias reportaron que: presentaron coloración blanquecina tanto en la superficie como en el reverso, textura algodonosa-lanosa, superficie elevada y de consistencia tenue y suave, y mencionan que el medio agar papa dextrosa (APD) permitió a la colonia producir abundante micelio y un mejor desarrollo de estas. En cuanto a la temperatura de incubación en el medio de cultivo APD reportaron que hubo un crecimiento mayor en placas incubadas a 28 °C que a 25-26 °C. Los autores mencionan que es el primer estudio en el cual se logra identificar a *Saprolegnia* sp. como agente causal de micosis en paiches en Iquitos.

Martínez *et al.* (2014) evaluaron la presencia de agentes bacterianos y micóticos en 120 paiches de dos centros de cultivo de la Amazonía peruana. Su objetivo fue determinar la presencia de bacterias y hongos. Los paiches fueron divididos en cuatro grupos etarios (10-30, 31-180, 181-365 y >365 días de edad) de 30 animales cada uno. El aislamiento de hongos se realizó mediante cultivo en agar Sabouraud dextrosa con antibiótico (penicilina), y se incubaron a 27 °C. Posteriormente sembraron las muestras de piel en placas de APD y Agar Harina de Maíz (Corn Meal Agar). Con este trabajo demostraron la presencia de agentes bacterianos en órganos internos fue del 36.7% y de agentes micóticos en piel fue del 10.8%, en todos los grupos hubo presencia de algún agente bacteriano. Específicamente aislaron bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, siendo estas dos últimas las de mayor prevalencia. Así demostraron la presencia de *Saprolegnia* spp. en piel en 13 ejemplares, y en seis de ellos en forma concomitante con agentes bacterianos como *Pseudomonas*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, los cuales estuvieron presentes en hígado, riñón y líquido peritoneal.

Blažeković *et al.* (2014) realizaron un trabajo que tuvo como objetivo determinar la presencia de micosis en la carpa común (*Cyprinus carpio*) de ocho de las instalaciones más grandes e importantes de cría de peses ciprínidos en Macedonia. De un total de 1134 peces que examinaron, *Saprolegnia parasitica* estuvo presente con un promedio de 12.65 %, los peces fueron obtenidos de estanques, criaderos y embalses. Para el aislamiento de los hongos se utilizó Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y para inhibir el crecimiento de bacterias se añadió ampicilina y sulfato de estreptomycinina en el medio, inocularon frotis de piel y aletas de peces infectados; las placas fueron incubadas a 25 °C. Mencionan que *Saprolegnia parasitica* se caracteriza por su apariencia externa similar al algodón que irradia en un patrón circular en forma de media luna o en espiral y remarcan que las esporas fúngicas pueden ser transmitidas por peces de criadero, peces salvajes, huevos, suministros de agua y equipos. El periodo de muestreo abarcó tres años y esto les permitió afirmar que la variación estacional juega un papel importante en la propagación de las infecciones por *Saprolegnia* sp. en peces de agua dulce, especialmente durante finales del otoño, común en los meses de invierno y principios de la primavera donde la temperatura era baja.

Eldin *et al.* (2013) identificaron, mediante el uso de la técnica filogenética basada en el ADN y algunos parámetros morfológicos fúngicos, los hongos acuáticos que provocan la mortalidad masiva de huevos de peces ángel en una granja de peces ornamentales en Giza, Egipto. Obtuvieron las muestras de 400 huevos y 10 reproductores, reportaron que la temperatura del agua en promedio fue de  $16 \pm 0.5$  °C. En el proceso de desinfección de las muestras obtenidas utilizaron cloranfenicol / gentamicina para evitar la contaminación bacteriana. El medio de cultivo que utilizaron fue SDA con cloranfenicol y las placas las incubaron a 20 °C. Como resultado reportan que la tasa de mortalidad de los huevos de pez ángel examinados fue del 70%, los huevos blanquecinos (no viables) fueron abundantes. Las observaciones que realizaron de las placas cultivadas en SDA denotaron un crecimiento eminente de las colonias del hongo que describen morfológicamente como quistes de pelos largos, algodonosas de tonalidad blanquecina que rápidamente cambiaban a gris y posteriormente a negro después de 96 h. Basados en las características morfológicas y al análisis filogenético confirman se trata de *Saprolegnia parasitica*. Mencionan que *Saprolegnia* spp. crece en la superficie de la cascara del huevo y especifican *S. parasitica* fue capaz de invadir los tejidos de los peces después de esta unido a la piel por los cilios de las esporas móviles con la consiguiente germinación. En cuanto a la temperatura remarcan que la disminución de la temperatura del agua acelero la proliferación de la natación libre de las zoosporas de *Saprolegnia* sp.

Vega et al. (2013) realizaron una investigación, en el Centro Acuícola El Zarco, en la que aislaron 10 especies de la familia Saprolegniaceae. Las muestras las recolectaron de agua de afluentes y efluentes de 25 puntos distintos del centro acuícola por otro lado también obtuvieron muestra directa de huevos y peces infectados de trucha arco iris. La temperatura de incubación fue de 22 °C y 4 °C y observaron crecimiento después de 48 horas de incubación, el medio de cultivo implementado fue SDA. Los resultados que obtuvieron indican que de las 10 especies aisladas 2 pertenecen al género *Achlya* y 8 a *Saprolegnia* de estas últimas los géneros que identificaron fueron: *S. ferax*, *S. australis*, *S. diclina*, *S. glomerata*, *S. parasitica*, *S. terrestris*, *S. uliginosa* y *S. unispora*. *S. diclina* fue

aislada con una frecuencia del 60%, de los huevos de trucha mientras que *S. parasitica* se aisló con una frecuencia del 90% de las lesiones de trucha y tres aislamientos de las muestras recolectadas en los estanques de cría. El 87.7% de las muestras aisladas del género *Saprolegnia* sp. reportaron fueron localizadas en agua mientras que solo el 25% fue aislado de huevos de la trucha arcoíris.

Fadaeifard *et al.* (2011) identificaron la flora fúngica acuática en tres criaderos de trucha arco iris en Irán durante el otoño e invierno de 2008. Las muestras fueron obtenidas de 150 huevos colectados al azar y 15 reproductores de los cuales se obtuvieron muestras de piel, branquias y aletas. Los medios de cultivos que utilizaron fueron SDA y agar glucosa-extracto de levadura e hicieron uso de antibiótico (penicilina y estreptomina) para inhibir el crecimiento bacteriano, los cultivos se incubaron a 15 °C. Reportaron la presencia de ocho géneros de hongos presentes en los huevos de trucha arcoíris y reproductores: *Penecillium* sp., *Acreomonium* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium solani*, *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Saprolegnia* sp. y *Cladosporium* sp. Entre las especies anteriores *Penecillium* sp. con 23% y *Saprolegnia* sp. con 3% tienen más y menos ocurrencia, respectivamente. Describieron a las colonias de *Saprolegnia* sp. con forma de algodón y tonalidad blanca, en agar glucosa extracto de levadura después de una semana el medio estaba completamente colonizado. Concluyen mencionando que los hongos que pertenecen al género de *Saprolegnia* pueden ser una de las causas fúngicas de mortalidad en peces de agua dulce y sus huevos ya que crecen y penetran en la pared celular reduciendo el flujo de agua y la secreción de enzimas conducen a la muerte de los huevos.

Carbajal *et al.* (2011) determinaron la actividad inhibitoria in vitro de bacterias encontradas en la piel de trucha marrón y arcoíris contra *S. parasitica* donde recolectaron 96 truchas marrón, 78 sanas y 18 con saprolegniosis, en tres sitios distintos de la provincia de León, España. La identificación bacteriana la llevaron a cabo primero usando métodos fenotípicos básicos y luego métodos moleculares. Para probar la actividad inhibitoria de los aislamientos bacterianos, llevaron a cabo tres ensayos, el primero probó la inhibición del crecimiento de hifas en medios sólidos (ensayo en placa), el segundo y tercero probó la inhibición del crecimiento de hifas y germinación de quistes, en medios líquidos (ensayos de caldo). Incubaron a *S. parasitica* durante 3 días a 20 °C en agar glucosa peptona (GP). Como resultado obtuvieron que las especies más frecuentes de las muestras obtenidas de trucha marrón con lesiones en la piel fueron: *Lodobacter* sp, *Aeromonas sobria* y *Aeromonas* sp.; mientras que las de la piel de trucha arco iris sana fueron: *Chryseobacterium* sp., *P. fluorescens* y *Staphylococcus* sp. las especies de bacterias probadas demostraron ser letales para *S. parasitica* en cualquiera de las condiciones analizadas siendo *A. piscícola*, *A. sobria*, *Pantoea agglomerans* y *P. fluorescens*, los aislamientos con una alta actividad inhibitoria, capaz de inhibir *S. parasitica*, muchas de ellas (66,6%) las obtuvieron de las lesiones causadas por saprolegniosis. Los autores recalcan que la mayoría de los sobrenadantes bacterianos in vitro inhibieron el crecimiento de *S. parasitica*, lo que sugiere que una sustancia secretada en el medio causa o participa en el efecto inhibitorio de la bacteria.

Zaror *et al.* (2004) analizaron 70 cepas de hongos aisladas de salmón y trucha. Las cepas de *Saprolegnia* spp. fueron obtenidas de ovas, branquias y aletas de alevines e individuos hasta fase smolt, de distintas especies de salmonídeos entre ellas de *Oncorhynchus mykiss*. Purificaron los cultivos realizando trasposos a placas de SDA o Lactrimel adicionado de cloranfenicol levógiro (0.05 g/L) y gentamicina (100 mg/L) y agar MAO este no has definido que es. En los resultados obtenidos reportan que de las 70 cepas de hongos recibidas 35 correspondieron a *S. parasitica* representando el 100% de los aislamientos; de las cuales 18 estaban localizadas en branquias, 13 en aletas y 4 en ovas. Para su trabajo la combinación cloramfenicol-gentamicina ofreció buenos resultados ya que permitió mantener los cultivos puros durante el proceso de identificación. Todas las cepas de *S. parasitica* se incubaron a 30 °C, y se desarrollaron, pero a diferente velocidad de crecimiento; basándose en sus características macroscópicas la describen como una colonia de crecimiento rápido, en tres días aproximadamente, algodonosa y hialina.

González *et al.* (2001) describieron las alteraciones histopatológicas que se observaron en órganos y tejidos de los peces afectados de un brote de saprolegniasis de tipo crónico que afectó a dos especies de peces, bogas (*Chondostromos polylepis*) y rutilus (*Rutilus albugineus*), en un río de la zona sur de la Península Ibérica, para ello extrajeron muestras de distintas zonas corporales (branquias, piel, músculo, hígado, riñón, corazón, bazo, tracto digestivo). En los frotis de piel y branquias observaron la presencia de hifas de hongos del género *Saprolegnia*, en la piel describen que el hongo invade la dermis y se extiende lateralmente sobre la epidermis, erosionándola a medida que progresa la lesión; de esa forma se rompe la barrera defensiva proporcionada por la cutícula frente a agentes infecciosos y precisamente mencionan que en el espacio interlamelar de *C. polylepis*, observaron hifas fúngicas y, asociadas a ellas, colonias bacterianas formadas por cocos (Gram+), bacilos y diplobacilos (Gram-). En términos generales sugieren que la saprolegniasis se trata de una infección fúngica de tipo primario que puede adjudicarse a un cambio de condiciones ambientales (baja salinidad y temperatura) que, por una parte, pueden debilitar el estado de salud de los organismos, debido a fenómenos de inmunosupresión y, por otro, puede favorecer la proliferación de microorganismos oportunistas. Reportan que la forma de propagación es mediante esporas móviles, que una vez que han colonizado un substrato apropiado, germinan. Cabe mencionar que en el espacio interlamelar de *C. polylepis*, observaron hifas fúngicas y, asociadas a ellas, colonias bacterianas formadas por cocos (Gram+), bacilos y diplobacilos (Gram-).

#### **IV. OBJETIVOS**

##### **GENERAL**

Aislamiento de *Saprolegnia* sp. en huevos de *Oncorhynchus mykiss* y agua del sistema de producción acuícola el Zarco.

##### **PARTICULARES**

Evaluar la prevalencia de *Saprolegnia* sp. presente en los huevos de *Oncorhynchus mykiss* y agua del sistema en el que se desarrolla la especie.

Determinar qué medio de cultivo y antibiótico puede ser eficiente para el aislamiento de *Saprolegnia* sp. en condiciones controladas *in vitro*.

Evaluar la temperatura óptima para el crecimiento de *Saprolegnia* sp. *in vitro*.

Reportar la presencia de otros grupos taxonómicos en huevos y agua.

## V. METODOLOGÍA

### V. 1. ZONA DE ESTUDIO

La estación acuícola “El Zarco” está ubicado en el parque nacional “Insurgente Miguel Hidalgo” (Figura 2) localizado en los límites del Estado de México y el Distrito Federal (Arredondo y Lozano, 2003. Tomado de García, 2013). Abarca una superficie de 24.0952 hectáreas y se localiza en la porción Este del Parque Nacional en altitudes que oscilan entre 3,110 a 3,170 m.s.n.m (CONANP, 2019). Fue construido en 1936 y con esta acción el Estado de México se convirtió en la primera entidad federativa productora de crías de trucha arco iris con fines comerciales (Velásquez y Espinoza, 1989. Tomado de García, 2013).



Figura 2. Localización centro acuícola el Zarco, Estado de México (Google Maps).

### V. 2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y CONSERVACIÓN

Las muestras de huevos y agua fueron colectadas en el centro acuícola El Zarco, en total se realizaron tres muestreos en la temporada de otoño, época reproductiva de las hembras de trucha arcoíris. El primer muestreo y segundo engloba la colecta de huevos (H) de *Oncorhynchus mykiss* y agua: en la que se encuentran los reproductores de la especie (R), entrada de agua a los reproductores (E), salida de agua de las incubadoras (SI) y agua de las tinas donde se depositan las crías (TC). El tercer muestreo consistió en la colecta al azar de huevos en distintos días de incubación: Huevos día 0 (D0), huevos día 3 (D3), huevos día 6 (D6) y huevos día 8 (D8) (Figura 3).

Con una espátula se colectaron los huevos de *Oncorhynchus mykiss*, que presentaban a simple vista restos aparentemente de *Saprolegnia* sp., tanto los huevos como el agua fueron vertidos en frascos ámpula y colocados en una hielera donde fueron transportados para su posterior procesamiento en el Laboratorio de Micología de la UAM-X, técnica de acuerdo con Mier *et al.*, 2002.

Aunado a la colecta de las muestras se registraron ciertos parámetros ambientales del agua contenida en las charolas en las cuales se incuban los huevos de trucha arco iris, el pH y la temperatura fueron parámetros medidos con un potenciómetro Hanna HI9125 y con un oxímetro marca Hanna 9146.

### V. 3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO E INCUBACIÓN

El medio de cultivo utilizado fue APD (Agar Papa Dextrosa) ya que se ha reportado permite una mejor observación a nivel macroscópico de la colonia (Castro *et al.*, 2014) además de que este medio permite evaluar la velocidad de crecimiento radial (Gutiérrez *et al.*, 1999). La preparación de las cajas con agar se realizó de acuerdo con lo descrito por Roberts, 1981 y el medio de cultivo se preparó como lo describe Mier *et al.*, 2002, tanto de forma natural como sintético. En total se utilizaron tres medios: el primero (M1) se elaboró con APD natural, pero se le duplico la cantidad de dextrosa, el medio 2 (M2) fue APD natural y el tercer medio (M3) fue APD sintético. Hubo medio al que no se le colocó antibiótico y para el resto se utilizó ceftriaxona o cloranfenicol (Figura 3).

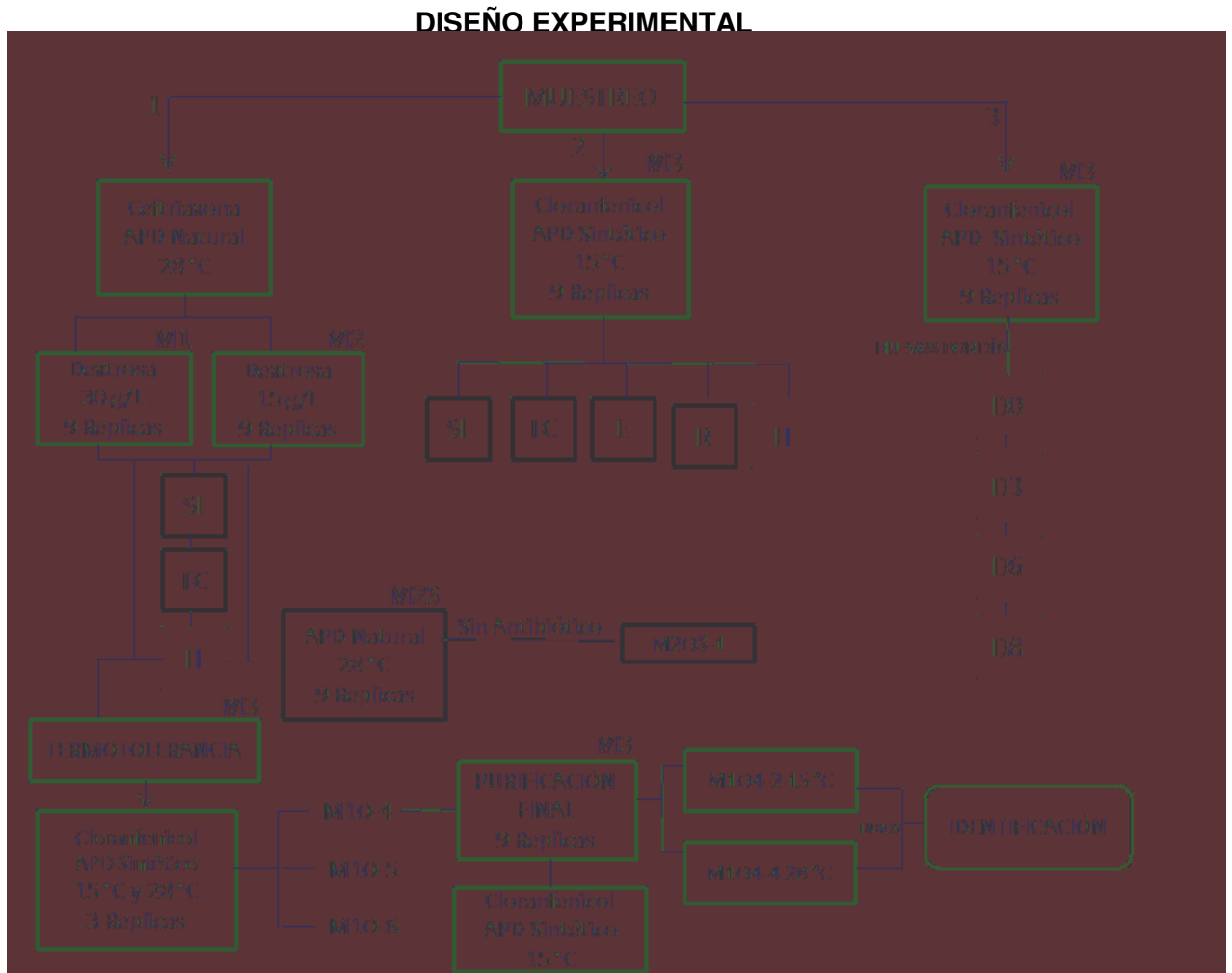
### V. 4. SEMBRADO

Todas las muestras de agua y huevos fueron cultivadas sobre placas con APD ya fuera natural o sintético. Con respecto al cultivo de los huevos estos fueron sembrados en el centro de la placa del medio de cultivo con el apoyo de unas pinzas y las muestras de agua fueron vertidas de forma directa en el centro de la caja con una micropipeta Eppendorf de 1000  $\mu$ L, todo esto en condiciones de esterilidad. Para el inicio del experimento se decidió colocar a incubar en una estufa de cultivo a 28 °C, para potencializar un crecimiento más rápido (Castro *et al.*, 2014), donde permanecieron 15 días aproximadamente. Para el procesamiento de las muestras dos y tres se pusieron a incubar a 15 °C, la toma de decisiones dependió de los resultados obtenidos en el curso del experimento (Figura 3). Todas las muestras fueron por replica teniendo por este método directo de siembra un total de 135 cajas Petri.

Para determinar a qué temperatura se desarrolla mejor *Saprolegnia* sp. se montó una prueba de termotolerancia en la cual las incubaciones se realizaron a dos temperaturas, 15 °C y 28 °C. Para ello se hizo una resiembra de cepas aisladas de huevos obtenidas en el M1, en total se eligieron tres cepas que fueron traspasadas a una nueva placa de agar colocando un disco de cultivo fúngico de 4mm (Zaror *et al.*, 2004; Nieto *et al.*, 2015) se realizaron triplicados de cada cepa, teniendo así un total de 18 cajas Petri. El medio de cultivo fue APD sintético al que se le añadió cloranfenicol y cada 24 horas se observó el crecimiento de la cepa y se registró el crecimiento radial del hongo, para estimar la velocidad de crecimiento radial de la colonia con respecto al tiempo. El crecimiento de *Saprolegnia* sp. se estimó con base al diámetro de la colonia fúngica para ello se midieron cuatro diámetros, en ángulos de 0°, 45°, 90° y 135°, para este caso fueron trazados sobre la caja Petri, tomando como intersección el centro del inóculo. Para la lectura del diámetro de la colonia se utilizó un vernier y la unidad para reportar la medida fue en cm. Con esta

técnica también se realizó un cultivo de los huevos del M2 pero sin colocar antibiótico (M2S - testigo), fueron nueve replicas obteniendo así un total de nueve cajas Petri.

Para el aislamiento final, de dos cepas aisladas en la prueba de termotolerancia se realizó un tercer traspaso de material fúngico pero esta vez en tubos cónicos con 7 ml (Nieto *et al.*, 2015) de agar APD sintético al cual se le añadió cloranfenicol, se realizaron 9 réplicas por muestra teniendo así un total de 18 tubos.



**Figura 3.** Diseño experimental, tres muestreos que incluyeron la colecta de Huevos (H, color amarillo) de trucha arco iris: Día cero (D0), día tres (D3), día seis (D6), día ocho (D8); y agua (color azul claro): Salida de agua incubadoras (SI), agua tina crías (TC), entrada de agua incubadoras (E), agua reproductores (R). Cada muestra se procesó de forma específica para cumplir con los objetivos establecidos.

## V. 5. IDENTIFICACIÓN

De todas las muestras colectadas se hicieron cultivos en cajas Petri en distintas condiciones según el objetivo a cumplir, pero todas ellas fueron procesadas para su aislamiento y posterior identificación siguiendo las observaciones morfológicas reportadas por (Zaror *et al.*, 2004) y se registraron características morfológicas como: color en la



superficie y en el reverso del cultivo, así como coloración, textura, superficie y consistencia (Castro *et al.*, 2014). Los cultivos se purificaron para poder determinar las características principales que permitieran la identificación (Figura 4), ya que habitualmente están contaminadas con distintas bacterias, propias de la micro biota dérmica de los peces (Zaror *et al.*, 2004; Roberts, 1981). Las bacterias (B) y otros hongos (O) presentes en el proceso de purificación de *Saprolegnia* sp. fueron registrados.



**Figura 4.** Proceso de extracción y proceso de la muestra de *Saprolegnia* (Modificada de Zaror *et al.*, 2004).

## V. 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se obtuvieron los valores de prevalencia (Moreno *et al.*, 2000) e intervalo de confianza para evaluar la presencia o ausencia de *Saprolegnia* sp. en agua y huevos de trucha arco iris. Para el procesamiento de los huevos del tercer muestreo se sacó el porcentaje de los huevos viables (coloración amarilla) y no viables (coloración blanca) para realizar una comparación de la prevalencia de *Saprolegnia* sp. y otros organismos en los distintos días del periodo de incubación de los huevos de la trucha arco iris.

El diámetro medio (DM) del micelio se calculó con base al promedio de las cuatro mediciones (Martínez *et al.*, 2015) y se determinó la velocidad de crecimiento. Para evaluar si hay diferencias significativas en el crecimiento de *Saprolegnia* sp., incubada a 15 °C y 28 °C, se realizó una prueba de t-Student (Sánchez, 2015) con un nivel de confianza del 95%.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI.1. CONDICIONES AMBIENTALES EN LAS TINAS DE INCUBACIÓN DE HUEVOS DE *Oncorhynchus mykiss*.

El promedio general de la temperatura del agua de las incubadoras de los huevos de trucha arco iris es de  $11.3 \pm 0.1$  °C que corresponde a una temperatura adecuada como lo reporta Arregui, 2013, mientras que el OD tuvo un valor de  $5.2 \pm 0.3$  ppm siendo un posible valor limitante para el desarrollo de los huevos considerando que un valor de 6 mg/L puede determinarse como lo normal para la incubación de los huevos de trucha arco iris (Arregui, 2013), este valor puede reflejar condiciones deficientes de aeración y a que los huevos requieran estar en un sitio en el cual no haya incidencia de luz y esto puede dar pie a que organismos micóticos y bacterianos (Fadaeifard *et al.* 2011) puedan desarrollarse provocando que el agua sea turbia y el OD disminuya. El pH fue de  $6.5 \pm 0.3$  y se considera es el adecuado ya que en periodo de incubación los rangos adecuados van de 6.5 a 8 (Arregui, 2013), considerando estos valores el OD reportado en este estudio fue de 5.5 ppm y un pH de 6.9.

### VI.2. ORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE *Saprolegnia sp.*, MEDIO CON Y SIN ANTIBIÓTICO

Tanto para el testigo como para los experimentos, en el inicio del aislamiento de S, no se presentó ningún cultivo puro de S o B; en todos hubo presencia de *Saprolegnia sp.* pero acompañada de otros agentes bacterianos como lo mencionan también Carbajal *et al.* (2011), Fadaeifard *et al.* (2011), González *et al.* (2001), Martínez *et al.* (2014). Las muestras procesadas sin antibiótico muestran que el testigo presentó el valor más elevado de prevalencia de agentes micóticos (S+O), mientras que el M2 y M3, presentaron un valor mínimo del 11.1% (Tabla 1). La ceftriaxona en este experimento se podría catalogar como un antibiótico que permitió que los cultivos tuvieran valores de prevalencia bajos de otros agentes micóticos, pero fue el medio en el que mayor prevalencia (77.7%) se tuvo de *Saprolegnia sp.* más agentes bacterianos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Presencia de agentes micóticos (*Sapolegnia sp.* y Otros) y bacterianos en el proceso de aislamiento de *Sapolegnia sp.*, en huevos de trucha arco iris cultivados en tres medios de cultivo: sin antibiótico, con ceftriaxona y con cloranfenicol. Nueve muestras procesadas para cada medio.

Muestra	M2S Sin antibiótico		M2 Ceftriaxona		M3 Cloranfenicol	
	Positivos (n)	P ± IC * (%)	Positivos (n)	P ± IC * (%)	Positivos (n)	P ± IC * (%)
S	-	-	-	-	-	-
S+B	1	11,1 ± 20,5	7	77,7 ± 27,1	4	44,4 ± 32,4
S+O	5	55,5 ± 32,4	1	11,1 ± 20,5	1	11,1 ± 20,5
S+O+B	3	33,3 ± 30,7	1	11,1 ± 20,5	4	44,4 ± 32,4
B	-	-	-	-	-	-

\* Prevalencia ± intervalo de confianza

### VI.3. PRESENCIA DE *Saprolegnia* sp., EN EL PROCESO DE PURIFICACIÓN, EN AGUA Y HUEVOS DE TRUCHA ARCO IRIS.

La prevalencia de *Saprolegnia* sp. en los huevos de trucha arco iris fue del 100% en los tres muestreos procesados, mientras que el mínimo reportado fue del 11.11% (Tabla 2) en las muestras del M2, en el agua de las tinas con crías así como en la salida de agua de las incubadoras, por el contrario la prevalencia aumentó a 66.6% en SI, mientras que el M2 obtuvo el mayor valor de *Saprolegnia* sp. más agentes bacterianos 77.7% (Tabla 1), nos permite concluir que este último medio (M3) al que se le adicionó cloranfenicol ha permitido eliminar agentes bacterianos (Zaror *et al.* 2004; Eldin *et al.* 2013) y por eso obtuvo los valores más elevados de S en todas las muestras con respecto al resto de los medios.

**Tabla 2.** Presencia de *Saprolegnia* sp., en el proceso de aislamiento, en agua y huevos de trucha arco iris cultivados en tres medios de cultivo: Medio 1 (M1) APD natural - ceftriaxona, Medio 2 (M2) APD sintético - ceftriaxona y Medio 3 (M3) APD sintético- cloranfenicol. Nueve muestras procesadas para cada medio.

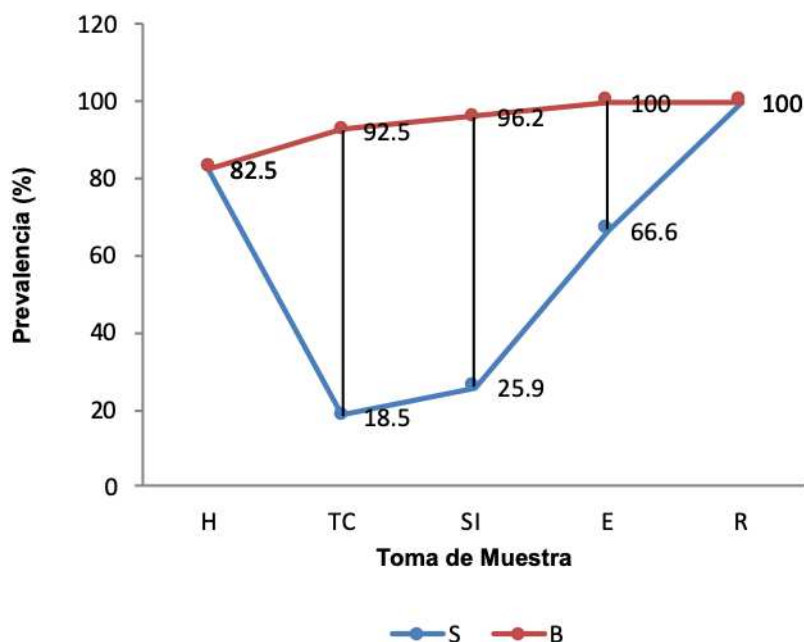
Muestra	<i>Saprolegnia</i> sp. M1		<i>Saprolegnia</i> sp. M2		<i>Saprolegnia</i> sp. M3	
	Positivos (n)	P ± IC* (%)	Positivos (n)	P ± IC* (%)	Positivos (n)	P ± IC* (%)
H	9	100,0 ± 0,0	9	100,0 ± 0,0	9	100,0 ± 0,0
TC	2	22,2 ± 6,27,1	1	11,1 ± 3,20,5	2	22,2 ± 6,27,1
SI	0	0	1	11,1 ± 3,20,5	6	66,6 ± 30,7
E					6	66,6 ± 30,7
R					9	100 ± 0,0

\* Prevalencia ± intervalo de confianza

### VI.4. ORGANISMOS PRESENTES EN TODO EL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE *Saprolegnia* sp., EN MUESTRA DE AGUA Y HUEVOS DE TRUCHA ARCO IRIS.

La prevalencia de *Saprolegnia* sp. (S) y agentes bacterianos (B) en huevos (H) y tinas donde se localizan los reproductores (R) de trucha arco iris obtuvieron los valores más elevados 82.5% y 100% respectivamente (Figura 5). Este patrón resulta relevante porque indica presencia en el agua de las tinas de incubación, en el proceso de manipulación, y durante el desove de trucha arco iris (Rubín, 1981), ya que sería la vía más viable de contagio de los reproductores a los huevos. Las prevalencias de los agentes bacterianos en todas las muestras procesadas tienen los valores más elevados (Figura 5) es decir que denota que *Saprolegnia* sp., eleva sus valores de prevalencia siempre y cuando se encuentre con un sustrato adecuado en el cual pueda desarrollarse, en este caso los huevos y los reproductores de trucha arco iris, y aparentemente las bacterias están haciendo un papel de degradación (Jiménez *et al.*, 1986). Y el agua es el medio por el cual se estaría propagando *Saprolegnia* sp. ya que la forma de propagación es mediante esporas móviles, que una vez que han colonizado un sustrato apropiado, germinan (González *et al.* 2001; Eldin *et al.* 2013). Cabe mencionar que en un estudio realizado por Vega *et al.* (2013) dan a conocer que el 87.7% de las muestras aisladas del género

*Saprolegnia* sp. fueron localizadas en agua mientras que solo el 25% fue aislado de huevos de la trucha arco iris mientras que en el presente trabajo la prevalencia de *Saprolegnia* sp. en huevos de trucha arco iris obtuvo el segundo lugar con un 82.5%.



**Figura 5.** Prevalencia de *Saprolegnia* sp. en cinco sitios de muestreo, en donde pasará algún estadio de desarrollo la trucha arco iris: huevos (H), agua de las tinas donde se depositan las crías (TC), salida de agua de las incubadoras (SI), entrada de agua a los reproductores (E) y agua en la que se encuentran los reproductores (R).

### VI.5. HUEVOS DE *Oncorhynchus mykiss* EN DISTINTOS DÍAS DE PERIODO DE INCUBACIÓN y ORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE *Saprolegnia* sp.

De los 118 huevos colectados, en color amarillo representaron el 63% mientras que los huevos en tonalidad blanca el 53%, con una prevalencia del 27.1% y 1.6% respectivamente, en el día 0 (Figura 6). Para el día ocho los valores se invierten la prevalencia más elevada es de los huevos blancos con un 25% y no hay presencia ya de huevos amarillos (Figura 6), esto concuerda con lo reportado por Eldin *et al.* (2013) ya que, de acuerdo con su estudio, la presencia de *Saprolegnia parasitica* provoca la mortalidad masiva de huevos de peces ángel con un 70%, en su estudio los huevos blancos (no viables) fueron abundantes. Contrastando los resultados con la prevalencia de organismos presentes se puede observar claramente que los agentes bacterianos para el día 0 tienen la mayor prevalencia 66.6%, mientras que *Saprolegnia* sp. para el día 0 solo se encuentra presente en asociación con agentes bacterianos con un 33.3% esto puede indicar que las bacterias pueden estar inhibiendo el desarrollo de este agente micótico; en distintos estudios se han aislado una serie de bacterias de la piel de trucha arco iris entre las más representativas se tienen a: *Chryseobacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus* sp. y han demostrado ser letales para *Saprolegnia*

*parasitica*, lo que sugiere que una sustancia secretada en el medio causa o participa en el efecto inhibitorio de la bacteria (Carbajal et al. (2011).

Para el día seis el valor de agentes bacterianos desciende a 22.2% y se identifica el máximo pico de prevalencia de *Saprolegnia* sp. (33.3%), es decir que las bacterias desde el día 3 posiblemente realizaron un proceso de degradación que permitió que *Saprolegnia* obtuviera este valor puesto que géneros bacterianos como *Aeromonas* y *Flexibacter* pueden propiciar el inicio de la infección cuando las esporas de S se liberan y quedan en contacto con tejido muerto o lesionado y una vez que la hifa se establece comienza a invadir el resto del tejido sano (Jiménez et al., 1986). Para el día ocho la prevalencia mayor es de S+B 88.8% (Figura 7) y los huevos en tonalidad amarilla tienen una erradicación total, esto indica que en este punto la degradación de los huevos permite que los dos organismos se desarrollen a la par que indicaría que estos organismos podrían tener una asociación ecológica como lo demuestran Martínez et al. (2014) que refiere la presencia de *Saprolegnia* spp. en piel en 13 ejemplares de paiches, y seis de ellos en forma concomitante con agentes bacterianos como *Pseudomonas*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Esta posible asociación puede afectar la tasa de sobrevivencia de los huevos de *Oncorhynchus mykiss*, posiblemente estén degradando en conjunto los huevos. Songe et al. (2016) reporta que tanto *S. diclina* clado IIIA y *S. parasitica* por si solas son capaces de penetrar el corion, *S. parasitica* lo hace sin destruirlo mientras que *S. diclina* si lo hace. Por lo anterior, especulan que *S. diclina* posiblemente emplee una estrategia necrotrofica, mientras *S. parasitica* representaría un linaje biotrófico.

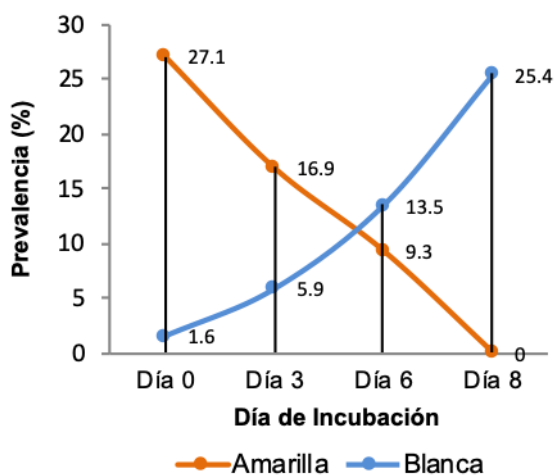


Figura 6. Prevalencia de huevos por color, en cuatro días distintos de incubación.

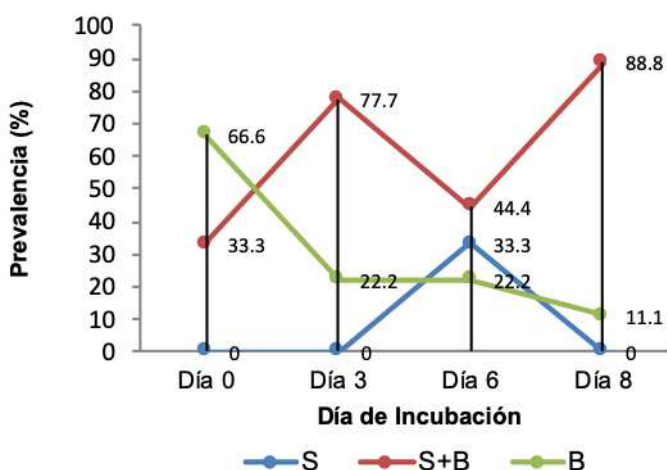
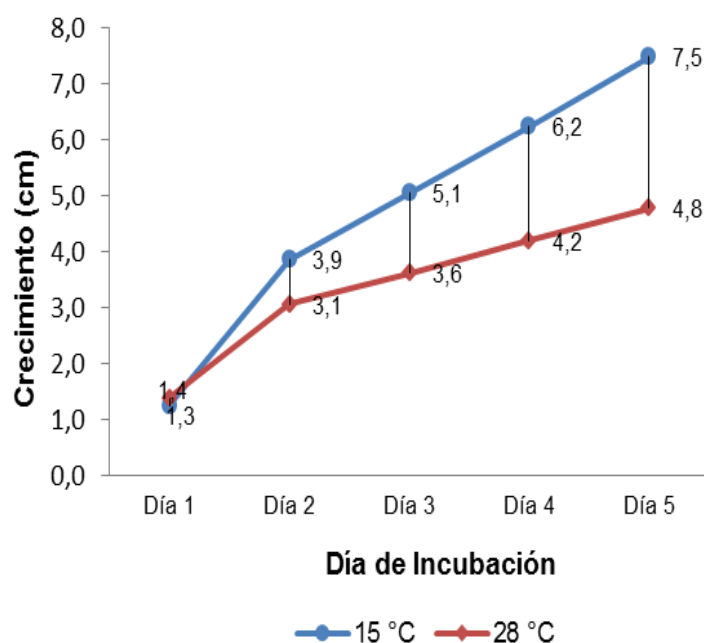


Figura 7. Presencia de *Saprolegnia* sp. (S), más bacteria (S+B) y agentes bacterianos solos (B), en huevos de trucha arco iris en cuatro días distintos de incubación.

## VI.6. TERMOTOLERANCIA

Con la prueba de termotolerancia se determinó que la velocidad de crecimiento de las colonias de *Saprolegnia* sp. es mayor a una temperatura de 15 °C (Figura 8) teniendo una velocidad de crecimiento de 1.49 cm por día, en un medio de cultivo de APD sintético

complementado con Cloranfenicol, en tanto que a 28 °C el promedio de velocidad de crecimiento fue de 0.95 cm por día, este dato contrasta con los resultados obtenidos por Castro *et al.* (2014) que menciona hubo un crecimiento mucho más rápido en placas incubadas a 28 °C que a 25-26 °C. La prueba de t-Student indica que existe diferencia estadísticamente significativa en la velocidad de crecimiento en cuanto a la temperatura, con un valor de P de 0.06, con un nivel de confianza del 95%. Esto refleja que los aislados de *Saprolegnia* que se obtuvieron tanto del agua como de los huevos del Centro Acuícola el Zarco podrían tener un proceso de adaptación limitado por la temperatura, puesto que la variación estacional juega un papel importante en la propagación de las infecciones por *Saprolegnia* sp. en peces de agua dulce, especialmente durante finales del otoño, común en los meses de invierno y principios de la primavera donde la temperatura es baja (Blažeković *et al.* 2014).



**Figura 8.** Promedio de crecimiento radial de *Saprolegnia* sp., con respecto al tiempo, incubada a 15 y 28 °C.

## VI.8. IDENTIFICACIÓN

En cuanto a las características morfológicas de las colonias obtenidas nos permitieron describirlas como colonias algodonosas y flocosas, poco elevadas con bordes continuos que presentan una tonalidad generalizada de un blanco continuo (Castro *et al.* 2014; Zaror *et al.* 2004; Eldin *et al.* 2013; Blažeković *et al.* 2014). Con respecto a los resultados obtenidos por Vega *et al.* (2013) podría indicar que la especie presente en los huevos de trucha arco iris se trata de *S. parasitica*. Cabe mencionar que la morfología muestra que muy posiblemente sean dos especies diferentes puesto que algunas tienen un aspecto marcadamente algodonoso (C) y otras vellosa (D). De los 88 aislados positivos de *Saprolegnia* sp., 66 tienen aspecto flocoso y algodonoso (46 H, 5 TC, 5 E, 5 R), 7 aspecto vellosa y lanoso (15 H, 1 TC, 1 SI, 4 R) y 1 pulverulento.



**Figura 9.** Aislamiento de *Saprolegnia* sp. de huevos de *Oncorhynchus mykiss* (A, B). Crecimiento de *Saprolegnia* sp. en el medio 1, huevo 4 (C) y 5 (D), incubada a 15 °C.

## **VII. CONCLUSIONES**

La prevalencia de *Saprolegnia* sp. es mayor en sitios en los cuales hay un sustrato adecuado para su desarrollo, tina de los reproductores y huevos de trucha arco iris, comportándose, así como un agente patógeno oportunista.

El medio APD sintético más cloranfenicol resultaron ser eficientes para para el aislamiento de *Saprolegnia* sp.

La velocidad de crecimiento de las colonias de *Saprolegnia* sp. fue mayor a una temperatura de 15 °C.

Agentes bacterianos fueron registrados en todos los sitios de muestreo con una prevalencia mayor o igual al de *Saprolegnia* sp.

Además, *Saprolegnia* sp. aparentemente tiene una relación ecológica con agentes bacterianos y esto puede afectar marcadamente la sobrevivencia de los huevos de trucha arcoíris, situación que puede provocar una epizootia y pérdidas económicas para el sistema de producción.

## **VIII. AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos al centro acuícola el Zarco, por permitirnos llevar a cabo el proceso de muestreo cuando fue requerido, sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

Agradezco al Laboratorio de Micología por permitirme realizar el proceso de experimentación en sus instalaciones y en particular a la Dra. Judith Castellanos Moguel por su valiosa guía en el proceso experimental.

Agradezco también al Laboratorio de Reproducción, Genética y Sanidad Acuícola y en especial a mi asesora M. en C. Araceli Cortes García por su compromiso y dedicación en todo momento que conllevó a que este trabajo fuera posible. Y al profesor Jesús Dámaso Bustamante por su apoyo y recomendaciones.



## IX. REFERENCIAS

- Arregui, L. 2013. El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Cuadernos de acuicultura, núm 6. Madrid. 103 p.
- Barnabé, G. 1996. Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza España. 536 p.
- Blažeković, D., Tomovska, J., Ali, M. 2014. New Strains of Fungus *Saprolegnia parasitica* in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) From Cyprinid Fish Breeding Facilities in Macedonia. International Journal of Ecosystems and Ecology Sciences (IJEES). 4 (2): 191-194.
- Brown, L. 2000. Acuicultura para veterinarios producción y clínica de peces. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza España. 460 p.
- Castro, V., Serrano, E., León, J. 2014. Aislamiento e identificación morfológica de *Saprolegnia* sp. en paiche (*Arapaima gigas*) proveniente de criaderos artesanales en Iquitos, Perú AquaTIC. 41: 8-18.
- Carbajal, M., Fregeneda, J., Suárez, S., Rodríguez, F., Aller, J. 2011. Bacterial skin flora variation and *in vitro* inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS Dis Aquat Org. 96: 125–135
- CONANP. 2019. Programa de Manejo del Parque Nacional Insurgente Miguel Hidalgo y Costilla. 103 p.
- Eldin, A., Abdelsalam, M., Tharwat, N., Zaki, M. 2013. Detection of *Saprolegnia parasitica* in eggs of angelfish *Pterophyllum scalare* (Cuvier – Valenciennes) with a history of decreased hatchability. International Journal of Veterinary Science and Medicine. 1: 7–14
- Fadaeifard, F., Raissy, M., Bahrami, H., Rahimi, E., Najafipoor, A. 2011. Freshwater fungi isolated from eggs and broodstocks with an emphasis on *Saprolegnia* in rainbow trout farms in west Iran. African Journal of Microbiology Research 4(22): 3647-3651.
- Rodríguez, M., Gerson, D., Monroy, Y., Mata, J. 2001. Manual de Enfermedades de Peces. III (15): 14.
- FAO. 2005-2017. National aquaculture Sector Overview, Mexico. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Text by Montero Rodríguez, M. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 1 February 2005. [Cited 1 November 2017]. [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_mexico/en](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/en)
- FAO. 2006. El estado actual de la pesca y la acuicultura. In: *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO* [en línea]. Roma. [Citado 1 Noviembre 2017]. <http://www.fao.org/3/a-a0699s.pdf>

Google maps [Citado 26 Septiembre 2019]  
<https://www.google.com.mx/maps/place/Centro+Acu%C3%ADcola+El+Zarco/@19.2953963,99.3541922,86m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x85cdf83a5fc2a527:0x1f3015a9fe9525bc!8m2!3d19.2952343!4d-99.3540246>

García, D., Gallego, I., Espinoza, A., García, A., Arriaga, C. 2013. Desarrollo de la producción de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Centro de México. *AquaTIC*. (38): 46-56

González, M., Bosco, J., González, M., Sarasquete, C. 2001. Saprolegniasis en poblaciones naturales de peces. *Ciencias Marinas*, 27(1): 125-137.

Gutiérrez, G., Saucedo, G., Gaime, I., Augur, C. 1999. Comparación de dos métodos para la selección de cepas para su uso en fermentaciones en medio sólido: crecimiento radial y longitudinal. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. Huatulco, Oaxaca, México. Memorias: VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. 104 p.

Jiménez, F., Galvís, L., Segovia, F., Garza, H., Wesche, P. 1986. Parásitos y enfermedades del Bagre. San Nicolás de los Garza, N.L. U.A.N.L., Fac. de Ciencias. 239 p.

Jiménez, F., Garza, H., Galaviz, L., Iruegas, F., Manuel, J., Salinas, N. 1988. Parásitos y enfermedades de la tilapia. San Nicolás de los Garza, N.L. U.A.N.L., Fac. de C. 109 p.

Liñan, G., Wilbert, E. 2007. Crianza de Truchas. Editorial Macro. 104 p.

Martínez, D., Buglione, M., Filippi, M., Reynoso, L., Rodríguez, G., Agüero, M. 2015. Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera. *Anales de Biología* 37: 1-10.

Martínez, E., Castro, V., Quispe, M., Casas, G., León, J. 2014. Aislamiento de bacterias y hongos en tejidos de paiche (*Arapaima gigas*) criados en cautiverio. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 25 (1): 117-122.

Martínez, L. 1998. Ecología de los Sistemas Acuícolas. Bases ecológicas para el desarrollo de la acuicultura. A.G.T. Editor, S.A. Primera edición. Capítulo 7. Acuicultura e impacto ambiental. 221 p.

Mier, T., Toriello, C., Ulloa, M. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. México: UAM-X, Ciencias Biológicas y de la Salud: UNAM, Instituto de Biología. 90 p.

Moreno, A., López, A., Corcho, S. 2000. Principales medidas en epidemiología. *Salud Pública de México*. 42 (4): 337-348.

Nieto, D., Aguirre, J., Zugasti, A., Rodríguez, R., Rodríguez, R., Aguilar, C. 2015. Actividad antifúngica: Análisis Comparativo de Ensayos *In Vitro* e *In Vivo*. Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. 19(2): 41.

Pillay, T.V.R. 2004. Acuicultura: Principios y prácticas. Limusa: Noriega editores. México. 700 p.

Roberts, R. 1981. Patología de los peces. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 366 p.

Rubín, R. 1981. La piscifactoria: Cría industrial de los peces de agua dulce. Compañía Edit. Continental. México. 191 p.

Sánchez, T. 2015. t-Student: Usos y abusos. *Revista mexicana de cardiología*, 26(1): 59-61.

Songe, M., Willems, A., Wiik, J., Thoen, E., Evencen, Ø., West, P., Skaar, I. 2016. *Saprolegnia diclina* IIIA and *S. parasitica* employ different infection strategies when colonizing eggs of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*. 39, 343–352.

Vega, M., Moreno, M., Valenzuela, R., Cervantes, R., Aller, M., Fregeneda, J., Damas, J., García, V., López, R. 2013. New records of Saprolegniaceae isolated from rainbow trout, from their eggs, and water in a fish farm from the State of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84 (2) 637-649.

Zaror, L., Collado, L., Bohle, H., Landskron, E., Montaña, J., Avendaño, F. 2004. *Saprolegnia parasitica* en salmones y truchas del sur de Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 36 (1): 71-78.