

# IDENTIFICACIÓN DE *Flavobacterium psychrophilum* EN ALEVINES DE “TRUCHA ARCO IRIS” (*Oncorhynchus mykiss*). DISTRITO DE HUANTA. AYACUCHO 2019

Nilda Apayco Espinoza, Ruth Huamán De La Cruz, Nieves Sandoval Chaupe<sup>1</sup>

Unidad de Investigación e Innovación de Ciencias Biológicas

Programa de Investigación en Biodiversidad y Gestión ambiental -Línea de Investigación en Biodiversidad

E-mail: nilda.apayco@unsch.edu.pe

## RESUMEN

*Flavobacterium psychrophilum* causa la enfermedad de las aguas frías o síndrome del alevín de la trucha. El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio del Área Académica de Microbiología y Laboratorio de Embriología, Histología y Patología Veterinaria. Sección de Ictiopatología. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el objetivo de identificar *Flavobacterium psychrophilum* en alevines de "trucha arco iris" (*Oncorhynchus mykiss*). Distrito de Huanta. El estudio fue de tipo no experimental, descriptivo transversal, la población estuvo conformada por todos los alevines del Centro de Producción de la Empresa Nutrimiento JANA SAC, ubicado en la comunidad de Razuhuillca del Distrito de Huanta, el muestreo utilizado según el código sanitario para los animales acuáticos fue el muestreo específico. Se utilizaron técnicas microbiológicas como el aislamiento de microorganismos en medio *Flavobacterium*, pruebas bioquímicas de orientación y la identificación molecular a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Respecto a los resultados las características fenotípicas de alevinos de “trucha arco iris” presentaron pigmentación oscura en la piel, cambio de color en los riñones y bazo inflamado, en la caracterización fenotípica de las colonias se obtuvieron colonias amarillas, brillantes y mucoides, dentro de las pruebas bioquímicas de orientación las colonias resultaron ser bacterias Gram negativas, catalasa y oxidasa positiva. La confirmación por la técnica de PCR mostro la banda 971pb indicando positivo para *Flavobacterium psychrophilum*; con lo que se confirma la presencia de esta bacteria en los alevines de la “trucha arco iris”.

Palabras clave: *Flavobacterium psychrophilum*, *Oncorhynchus mykiss*.

## IDENTIFICACIÓN DE *Flavobacterium psychrophilum* EN ALEVINES DE “TRUCHA ARCO IRIS” (*Oncorhynchus mykiss*). DISTRITO DE HUANTA. AYACUCHO 2019

## ABSTRAC

*Flavobacterium psychrophilum* causes cold water disease or trout fry syndrome. The research work was carried out in the Laboratory of the Academic Area of Microbiology and Laboratory of Embryology, Histology and Veterinary Pathology. Ichthiopathology section. Faculty of Veterinary Medicine of the National University of San Marcos, with the aim of identifying *Flavobacterium psychrophilum* in "rainbow trout" fry (*Oncorhynchus mykiss*). Huanta District. The study was non-experimental, descriptive cross-sectional, the population It was made up of all the fry from the Production Center of the Nutrimiento Company JANA SAC, located in the Razuhuillca community of the Huanta District, the sampling used according to the sanitary code for aquatic animals was the specific sampling, using microbiological techniques such as Isolation of microorganisms in *Flavobacterium* medium, orientation biochemical tests and molecular identification using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Regarding the results, the phenotypic characteristics of "rainbow trout" fingerlings showed dark pigmentation in skin, discoloration of the kidneys and spleen in Flamed, in the phenotypic characterization of the colonies yellow, bright and mucoid colonies were obtained, within the biochemical tests of orientation the colonies turned out to be Gram negative, catalase and oxidase positive bacteria. Confirmation by the PCR technique showed the band 971bp indicating positive for *Flavobacterium psychrophilum*; thus confirming the presence of this bacterium in the fry of the "rainbow trout".

Keywords: *Flavobacterium psychrophilum*, *Oncorhynchus mykiss*.

## INTRODUCCIÓN

*Flavobacterium psychrophilum* causa la enfermedad de las aguas frías o síndrome del alevín de la trucha, (1) siendo esta las más sobresaliente debido a las manifestaciones clínicas severas y altas mortalidades que presentan. Se ha demostrado que el principal reservorio natural de *F. psychophilum* es el agua de los ríos y lagos, existe evidencia de que la bacteria puede sobrevivir en el agua por lo menos 300 días conservando su virulencia, (2) Las proteasas, exotoxinas, endotoxinas y adhesinas se consideran los principales factores de patogenicidad de esta bacteria. (3) (4) El diagnóstico es el aislamiento de la bacteria en medios de cultivo de tipo oligotrófico es decir bajos en nutrientes (Agar FLP), la temperatura óptima estándar necesaria para conservar la virulencia de las cepas es de 15 a 18 °C (5) (6).

<sup>1</sup> Colaboradora

Los alevines de “trucha arco iris” (*Onchorinchus mikyss*) corresponde a la fase de cultivo con el traslado de las larvas a los tanques y/o pozas de alevinaje, donde serán alimentados artificialmente y permanecerán allí hasta que alcancen la talla de 10 cm y sean trasladados a las pozas de juveniles (7).

Las enfermedades a nivel mundial constituyen un grave problema para el desarrollo y sostenimiento de la acuicultura ya que son una limitante en la producción acuícola apareciendo en forma esporádica y algunas otras de forma periódica. En el departamento de Ayacucho en la actualidad se ve el crecimiento de la actividad piscícola y como consecuencia de ello surgen las enfermedades en la trucha arco iris, así mismo no existen trabajos de investigación sobre la presencia de la bacteria *Flavobacterium psychrophilum* y otros que vienen causando mortalidad en las diferentes etapas de la trucha arco iris.

Según el Ministerio de la Producción (PRODUCE) en el año 2015 se llegó a cosechar 90 996 toneladas métricas (TM) de recursos hidrobiológicos, de los cuales la especie de mayor producción fue la trucha con el 41 % de la cosecha de ese año. De acuerdo con datos de la Red Nacional de Información Acuícola (RNIA) los departamentos que poseían mayor producción de truchas en el año 2016 fueron Puno, Junín, Huancavelica, Ayacucho y Cusco, por lo que es importante realizar estudios sobre la presencia de los diversos microorganismos que causan enfermedad en la trucha arco iris (8).

El presente trabajo sobre Identificación de *Flavobacterium psychrophilum* en alevines de “trucha arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*). Distrito de Huanta, se desarrollo en los laboratorios del Área Académica de Microbiología de la Facultad de Ciencias biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y el Laboratorio de Embriología, Histología y Patología Veterinaria. Sección de Ictiopatología. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este estudio servirá para tomar las medidas adecuadas de prevención y control en el centro de producción de alevinos y así aminorar los gastos económicos y tener una vigilancia de los microorganismos presentes.

Los objetivos trazos en el presente estudio fueron:

#### **Objetivo General**

Identificar *Flavobacterium psychrophilum* en alevines de "trucha arco iris" (*Oncorhynchus mykiss*). Distrito de Huanta. Ayacucho 2019.

#### **Objetivos específicos**

- Aislar bacterias en agar *Flavobacterium* a partir de alevines de "trucha arco iris" (*Oncorhynchus mykiss*) con manifestaciones clínicas aparentes.
- Realizar pruebas bioquímicas orientativas para el diagnóstico de *Flavobacterium psychrophilum* aisladas de alevines “trucha arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*).
- Identificar a nivel molecular mediante PCR *Flavobacterium psychrophilum* aisladas de alevines de "trucha arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Diseño Metodológico:**

Tipo de investigación: Básica

Nivel de investigación: Descriptiva transversal.

Instrumentos: a) Técnicas microbiológicas, b) Técnica de PCR. Tipo de muestreo: Muestreo específico Ubicación espacial: La identificación y caracterización microbiológico y molecular de *Flavobacterium psychrophilum* se realizó en el Laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y Laboratorio de Embriología, Histología y Patología Veterinaria. Sección de Ictiopatología. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Tabla 1.** Características fenotípicas de las muestras de alevinos de “trucha arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*). Distrito de Huanta.

N° alevinos	Tamaño alevinos	Color de piel	Características fenotípicas	Riñón	Bazo
1	9.6	Pigmentación oscura	Melanosis exoftálmica	Blanquecino	Inflamado rojo oscuro
2	6.2	Pigmentación ligeramente oscura	Melanosis	Rojizo	Ligeramente inflamado
3	6.4	Pigmentación ligeramente oscura	Melanosis	Rojizo	Ligeramente inflamado
4	7.2	Pigmentación ligeramente oscura	Melanosis	Rojizo	Ligeramente inflamado
5	8.4	Pigmentación oscura	Melanosis exoftálmica	Rojo pálido	Inflamado rojo oscuro
6	6.5	Pigmentación oscura	melanosis	Rojo pálido	Inflamado rojo claro
7	7.5	Pigmentación ligeramente oscura	Melanosis	Rojizo	Ligeramente inflamado
8	6.5	Pigmentación ligeramente oscura	Melanosis	Rojizo	Ligeramente inflamado
9	6.6	Pigmentación ligeramente oscura	Melanosis	Rojizo	Ligeramente inflamado
10	7.0	Pigmentación ligeramente oscura	Melanosis	Rojizo	Ligeramente inflamado

En tabla 1 se muestra las características fenotípicas de los alevinos de “trucha arco iris” (*Oncorhynchus mykiss*); cuyas características corresponden a pigmentación oscura en la piel; del mismo se observa en 3 muestras el cambio de color en el riñones que va del blanquecino al rojo pálido; bazo inflamado de color normal a un rojo oscuro, y exoftalmia, estos resultados coinciden con la descripción de Barnes et al (28) caracterizada por una amplia patología interna, incluyendo riñones e hígados anémicos y pálidos; letargo, ascitis, exoftalmia (a menudo bilateral), pigmentación oscura de la piel y branquias pálidas. Que en conjunto son signos que determinan la enfermedad. Características similares con nuestros resultados son reportados por Mata S (2017) (9) quien describe las características severas, de tipo necrótico en la piel, y manifiesta que *F. psychrophilum* también ocasiona el síndrome del alevín de la enfermedad septicémica que afecta a los peces de primera alimentación, causando oscurecimiento corporal, abultamiento abdominal. Así mismo León J. et al (1), también relaciona las características fenotípicas con la enfermedad lesión macroscópica externa más frecuente fue la ulceración profunda de la región dorsal del pez acompañado de un ennegrecimiento localizado de la piel, también Gonzales J. (2013) (13), en un estudio realizado a truchas, procedente del Lago Titicaca-Puno determinó la enfermedad flavobacteriosis y una mortalidad aproximada del 60%, posiblemente corresponda a *Flavobacterium psychrophilum*, conocido como el agente que causa la “enfermedad bacteriana de aguas frías” (BCWD) o enfermedad del pedúnculo. La lesión macroscópica externa más frecuente fue la ulceración semejante a “sellos” de la región dorsal del pez, hemorragia acular, erosión extensiva de la cola, con pérdida del tejido dérmico, anemia branquial, hipertrofia e hiperplasia. Internamente se observa una marcada esplenomegalia, hemorragia y zonas pálidas del hígado, inflamación del riñón.

**Tabla 2.** Característica fenotípica de las colonias bacterianas obtenidas de alevinos de "trucha arco iris" (*Oncorhynchus mykiss*). Distrito de Huanta.

N° alevinos	Siembra en medio de cultivo	T° Incubación ( °C )	Tiempo Desarrollo (días)	Color	Superficie	Consistencia
1	FLP	15	14	Amarillo	brillante	mucoide
2	FLP	15	14	Amarillo	brillante	mucoide
3	FLP	15	14	Amarillo	brillante	mucoide

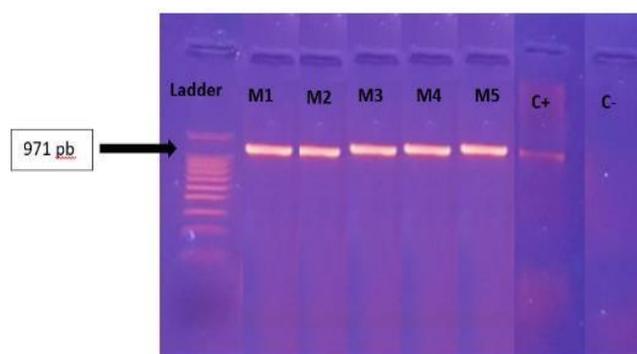
En la tabla 2, se describe características fenotípicas de las colonias en medio FLP, incubadas a una temperatura de 15°C, de las 10 muestras evaluadas (1,5 y 6), se obtuvieron 03 muestras con desarrollo de colonias relacionadas a *F. psychrophilum*, Por el crecimiento típico en medio FLP; colonias con coloración amarilla, brillantes y mucoides, sin embargo existen investigadores que utilizaron diversos medios de cultivo de acuerdo a su composición el crecimiento de *F. psychrophilum* en dichos medios guardan relación con las características fenotípicas. Echo que Castillo A (2017) (10) en su trabajo de investigación sobre caracterización fenotípica, bioquímica y genética de *Flavobacterium psychrophilum*, manifiesta que en medio de cultivo TYES tienen una concordancia fenotípica significativa con lo reportado a nivel mundial. Así mismo León J. et al (1) en su trabajo reporto el desarrollo en agar Cytophaga Modificado (ACM); según Anaker & Ordal (1959) fueron aisladas inicialmente 29 Gram negativas, de las cuales según la caracterización fenotípica y pruebas bioquímicas 9 fueron consideradas como *F. psychrophilum*, observándose que el uso de medios de cultivo para el aislamiento de *F. psychrophilum* fueron diferentes.

**Tabla 3.** Identificación de *Flavobacterium psychrophilum* mediante pruebas bioquímicas de orientación aislados de los alevinos de "trucha arco iris" (*Oncorhynchus mykiss*). Distrito de Huanta.

N°	Coloración Gram	Tamaño de Bacteria	Pruebas Bioquímicas	
			Catalasa	oxidasa
1	Negativo	3-5 µm Filamentosas	+	+
2	Negativo	3-5 µm Filamentosas	+	+
3	Negativo	3-5 µm Filamentosas	+	+

Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos

En la tabla 3, se presenta los resultados de las pruebas bioquímicas orientativas de las cepas aisladas de los alevinos de "trucha arco iris" orientadas a la presencia de *Flavobacterium psychrophilum*, dentro de las cuales se tiene que todas las muestras responden a la coloración de Gram negativa, también bioquímicamente respondieron a la prueba de catalasa y oxidasa de forma positiva; en este aspecto nuestros resultados concuerda con León J. et al (1) en su trabajo reporto que inicialmente aislaron y encontraron 29 Gram negativas, de las cuales según la caracterización fenotípica y pruebas bioquímicas 9 fueron consideradas como *F. psychrophilum*; el mismo autor (León, J) manifiesta que las bacterias Gram negativas son las principales causantes de enfermedades bacterianas en salmónidos; siendo *Flavobacterium* el grupo patológico de mayor importancia; en cambio Castillo A (2017) (10) manifiesta que Bioquímicamente, son pocas las diferencias echo que concuerda con nuestro resultados que bioquímicamente las muestras nos orienta a *F. psychrophilum*. De igual modo Zamora L, 2015 (11) en su trabajo doctoral en un estudio taxonómico polifásico de un grupo de bacterias Gram negativas aisladas de alevinos enfermos de trucha arcoíris que presentaban síntomas clínicos compatibles con un proceso septicémico eran causado por *F. psychrophilum*.



**Fig.2 Identificación de *Flavobacterium psychrophilum*, Mediante prueba molecular (PCR)**

En la fig. 2 Se observa que al llevar la placa con gel de agarosa y posicionarlo en el transiluminador con UV muestra una banda de **971 pb**, echo que significa que las 3 muestras respondieron positivo para *Flavobacterium psychrophilum* sin embargo Castillo A, 2017 (10) en su trabajo de investigación; de acuerdo al análisis de PCR simple se estableció que solo 8 de los 13 aislados fueron positivos a *Flavobacterium psychrophilum*. Echo que podría relacionarse al tipo de cultivo utilizado en el estudio, además del número de muestras. Finalmente, se concluyó con la identificación de *Flavobacterium psychrophilum* partir de alevines de "trucha arco iris" (*Oncorhynchus mykiss*) con manifestaciones clínicas aparentes utilizando técnicas microbiológicas y de PCR en el Centro de Producción de la Empresa Nutrimentos JANA SAC ubicado en la comunidad de Razuhuilca perteneciente al Distrito de Huanta.

#### AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ciencias Biológicas y al laboratorio del Área Académica de Microbiología de la UNSCH por el apoyo con materiales y equipos.

Al Laboratorio de Embriología, Histología y Patología Veterinaria. Sección de Ictiopatología. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por facilitarnos la capacitación, protocolos y realizar la técnica de PCR para la identificación de *Flavobacterium psychrophilum*.

A la empresa Nutrimentos JANA SAC por el apoyo en el muestreo y materiales para la ejecución del presente trabajo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. León, J., Ávalos, R. y Ponce, M. (2008) «*Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Oncorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo, *Revista Peruana de Biología*, 15(2), pp. 117-124. doi: 10.15381/rpb.v15i2.1737.
2. Madetoja, J & Nyman, P & Wiklund, Tom. (2000). *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms*. 43. 27-38. 10.3354/dao043027.
3. Dalsgaard, I., 1993. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3, 127–144. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)90032-7](https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90032-7)
4. Secades, P., Alvarez, B., Guijarro, J.A., 2001. Purification and Characterization of a Psychrophilic, Calcium-Induced, Growth-Phase-Dependent Metalloprotease from the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* 67, 2436–2444. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2436-2444.2001>
5. Izumi, S., Aranishi, F., Wakabayashi, H., 2003. Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Diseases of Aquatic Organisms* 56, 207–214. <https://doi.org/10.3354/dao056207>
6. Ramsrud, A.L., LaFrentz, S.A., LaFrentz, B.R., Cain, K.D., Call, D.R., 2007. Differentiating 16S rRNA alleles of *Flavobacterium psychrophilum* using a simple PCR assay. *Journal of Fish Diseases* 30, 175–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00795.x>
7. Brown, L., 2000. *Acuicultura para veterinarios: Producción y clínica de peces*. Zaragoza: Acribia, pp.110-112; 241-249.

8. López, M., Aníbal, J., 2018. Diagnóstico situacional de la crianza de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en centros de cultivo del Lago Titicaca. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
9. Mata López, S., 2017. *Flavobacterium psychrophilum* como patógeno emergente en piscicultura.
10. Fernández, G., Gregorio, J., 2013. Flavobacteriosis en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), procedentes del Lago Titicaca, Puno, Perú. *The biologist* 11, 205–215.
11. Miranda, C., Yanine, A., 2017. Caracterización fenotípica, bioquímica y genética de *Flavobacterium psychrophilum*. Obtenidas de casos de síndrome del alevín de la trucha arcoíris (rtfs).
12. Castillo Miranda, Yanine A. Caracterización fenotípica, bioquímica y genética de *Flavobacterium psychrophilum*. Obtenidas de casos de síndrome del alevín de la trucha arcoíris (rtfs). 2 de junio de 2017 [citado 23 de abril de 2020]; Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/71044>
13. Zamora Morales, L., Zamora Morales, L., 2015. Estudio taxonómico de bacterias relacionadas con el síndrome del alevín de la trucha (info:eurepo/semantics/doctoralThesis). Universidad Complutense de Madrid, Madrid.