



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**CARACTERIZACIÓN DE *Weissella ceti* AISLADA EN BROTES
SEPTICÉMICOS DE GRANJAS DE TRUCHA ARCOÍRIS
(*Oncorhynchus mykiss*) DE MÉXICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

JESICA CASTREJON NAJERA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Noviembre 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**CARACTERIZACIÓN DE *Weissella ceti* AISLADA EN BROTES
SEPTICÉMICOS DE GRANJAS DE TRUCHA ARCOÍRIS
(*Oncorhynchus mykiss*) DE MÉXICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

JESICA CASTREJÓN NÁJERA

COMITÉ DE TUTORES

Dr. Cesar Ortega Santana. Tutor Académico

Dr. Raúl Cuahutémoc Fajardo Muñoz. Tutor Adjunto

Dr. Rubén Avendaño Herrera. Tutor Adjunto

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Noviembre 2017

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

DEDICATORIA

A mis padres, Felix y Lucia, por brindarme su apoyo en todo momento y ser un ejemplo de lucha y perseverancia.

A Jannet, a ti hermana por estar cada momento a mi lado y soportar mis buenos y malos momentos, por haber aguantado todas las desveladas que te hice pasar, por aconsejarme y alentarme en esos momentos difíciles, pero sobretodo hacerme sonreír cada vez que lo he necesitado.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México, por el financiamiento del proyecto que hizo posible la creación de este trabajo de investigación.

Agradezco a el CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEMex, por permitirme hacer uso del espacio, equipo y materiales necesarios para la realización de este trabajo.

A mi asesor de tesis, el Dr. Cesar Ortega Santana, por brindarme la oportunidad de realizar este estudio de posgrado siendo parte de su equipo de trabajo y por la dedicación y tiempo prestado durante mi estancia con el.

A mis padres, hermanos y a mi abuela que han estado a mi lado en todo momento, brindándome su cariño y apoyo.

A Veronica Gonzalez, por todo su apoyo a los largo de estos años que tenemos de conocernos y por su valiosa amistad; y a compañeros y amigos del CIESA, que me brindaron parte de su tiempo, de su compañía, de sus anécdotas y de su amistad durante mi estancia en las instalaciones.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

INDICE

	Paginas
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	iii
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCION	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. ACUACULTURA Y TRUCHA ARCOÍRIS EN MÉXICO	3
2.1.1 Estatus de la producción acuícola en México	3
2.1.2. El cultivo de trucha en México	5
2.1.3 Generalidades de la Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	5
2.1.4 Principales enfermedades que afectan a la Trucha arcoíris	7
2.2. LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS	10
2.2.1 Características generales de las BAL	11
2.2.2 Clasificación de las Bacterias Acido Lácticas	12
2.2.1 Clasificación Fenotípica	13
2.2.2. Clasificación filogenética	14
2.2.3 Metabolitos generados por Bacterias Ácido Lácticas	15
2.2.4 Bacteriocinas	16
2.2.5 Complejo septicémico por bacterias Gram positivas en trucha arcoíris	16
2.3. GENERO WEISSELLA	18

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

2.3.1 Historia y taxonomía de <i>Weissella</i>	18
2.3.2 Descripción del género <i>Weissella</i>	19
2.3.3 Ecología	20
2.3.4 Potencial de <i>Weissella</i> sp. como probiótico	20
2.3.5 <i>Weissella</i> sp. y su asociación con cuadros de infección.....	21
2.4. WEISSELLOSIS	22
2.4.1 Características microbiológicas de <i>Weissella ceti</i>	23
2.4.2 Diagnóstico	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares	25
6. MATERIALES Y MÉTODO	26
6.1 Diseño experimental	26
6.2 Modelo biológico	26
6.3 Materiales de laboratorio	26
6.4 Método	27
6.4.1 Toma de muestras y aislamiento bacteriano	27
6.4.2 Identificación fenotípica bacteriana de acuerdo a características morfológicas y bioquímicas	28
6.4.2.1. Tinción Gram	28
6.4.2.2. Tinción de esporas	28
6.4.2.3. Prueba de la catalasa	29

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

6.4.2.4. Prueba de oxidasa	29
6.4.2.5. Prueba de triple azúcar-hierro y lisina-hierro	29
6.4.2.6. Prueba de citrato	29
6.4.2.7. Producción de sulfuro, indol, motilidad y ornitina	29
6.4.2.8. Prueba de oxidación-fermentación	30
6.4.2.9. Prueba ONPG	30
6.4.2.10. Prueba Rojo de Metilo- Voges Proskauer	30
6.4.2.11. Prueba de urea	30
6.4.2.12. Reducción de nitrato	31
6.4.2.13. Perfil de fermentación de carbohidratos	31
6.4.3 Identificación genética	31
6.4.4 Descripción histopatológica	32
6.4.5 Capacidad bacteriocinogénica	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Toma de muestras y aislamiento bacteriano	33
7.2 Identificación fenotípica bacteriana	34
7.2.1. Caracterización bioquímica y perfiles de fermentación	34
7.3 Identificación genética	38
7.4 Descripción de lesiones	38
7.4.1 Descripción histológica de lesiones	40
7.5 Capacidad bacteriocinogénica	41
7.6 Artículo enviado	43
8. DISCUSION GENERAL	61
9. CONCLUSIONES	67

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Figura 2. Grupos filogenéticos de bacterias ácido lácticas (BAL) con bajo y alto contenido de C-G %mol en el ADN..... 6

Figura 3. Medio Agar sangre con desarrollo de colonias bacterianas de *Weissella ceti*, en donde se muestra la hemólisis generada por la bacteria..... 15

Figura 4. Tinción de Gram de cepas de *W. ceti*., Evidenciando cocobacilos pleomorfos Gram positivos en cadenas..... 37

Figura 5. Tinción de Gram de aislados de muestras B. Diplococos Gram positivos formando cadenas cortas..... 37

Figura 6. Gel de agarosa 2%: amplificación de fragmento correspondiente con la BAL *Weissella ceti*..... 37

Figura 7. Diagrama de barras de lesiones externas observadas con mayor frecuencia en los organismos aparentemente afectados por la enfermedad..... 39

Figura 8. Diagrama de barras de lesiones internas observadas en los organismos afectados..... 39

Figura 9. Organismos de trucha arcoíris afectados con signos característicos de enfermedad *Weissellosis*..... 40

Figura 10. Lesiones histológicas, (A) Hepatitis necrótica multifocal con presencia de bacterias Gram positivas en cadenas y de monocitos en vaso sanguíneo; (B) edema corneal con separación de fibras. (C y D) congestión en cerebro y meningitis... 41

Figura 11. Test de difusión en agar. Halo de inhibición obtenido al inocular caldo MRS con *Weissella ceti*..... 42

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales enfermedades bacterianas que afectan los cultivos de trucha.....	8
Tabla 2. Principales enfermedades de origen viral que afectan los cultivos de trucha.	9
Tabla 3. Principales enfermedades parasitarias que afectan los cultivos de trucha.....	9
Tabla 4. Características fisiológicas de bacterias ácido lácticas con morfología bacilar y cocobacilar.	13
Tabla 5. Características fisiológicas de bacterias ácido lácticas de morfología cocoide.	14
Tabla 6. Enfermedades que integran el complejo septicémico en trucha arcoíris por bacterias Gram positivas.	17
Tabla 7. Aislamientos bacterianos en diferentes medios de cultivo y a diferentes temperaturas.	33
Tabla 8. Resultados de pruebas bioquímicas de aislados bacterianos obtenidos de los organismos muestreados.	35
Tabla 9. Resultado de los perfiles de fermentación de carbohidratos de los aislados bacterianos de organismos muestreados.	36
Tabla 10. Inhibición de <i>W. ceti</i> utilizando el método de difusión en gel contra las cepas prueba.	42

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

RESUMEN

Dentro del grupo de las denominadas bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentra la bacteria *Weissella ceti*, una bacteria emergente identificada como patógena que afecta a la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* presentándose en forma septicémica. En México, se han presentado mortalidades en granjas productoras de trucha arcoíris con signos sugerentes a la enfermedad denominada Weissellosis. En el presente estudio se aislaron bacterias cocobacilares de organismos con signología aparente de enfermedad que incluyen: exoftalmia, opacidad corneal, lesiones hemorrágicas en ojos, boca, aletas pectorales, hemorragias multifocales en hígado y cerebro. Los aislados se caracterizaron bioquímicamente como bacterias Gram positivas, oxidasa y catalasa negativas, hemolíticas, no móviles, con actividad fermentadora a partir de los carbohidratos dextrosa, glucosa, maltosa y trehalosa. La bacteria *Weissella ceti* aislada de los organismos afectados fue genéticamente caracterizada por medio del uso de PCR convencional utilizando primers específicos de un sitio de adhesión al colágeno identificado únicamente en esta especie. Las lesiones histológicas que se evidenciaron en las truchas arcoíris afectadas por esta bacteria fueron en ojo separación de fibras del estroma y hemorragia en la coroides, hepatitis necrótica multifocal con hepatocitos en degeneración y meningitis y congestión en cerebro. Este es el primer reporte de la bacteria en cuadros septicémicos en truchas arcoíris en México.

Palabras clave: *Weissella ceti*, *Oncorhynchus mykiss*, septicemia, Weissellosis.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

ABSTRACT

Within the group of the so-called lactic acid bacteria (LAB) is the bacterium *Weissella ceti*, an emerging bacterium identified as a pathogen that affects the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* occurring in a septicemic form. In Mexico, mortalities were presented in rainbow trout producing farms with signs suggestive of the disease called Weissellosis. In the present study, coccobacillary bacteria were isolated from organisms with apparent signs of disease including: exophthalmos, corneal opacity, hemorrhagic lesions in the eyes, mouth, pectoral fins, multifocal hemorrhages in liver and brain. The isolates were characterized biochemically as Gram positive bacteria, oxidase and catalase negative, hemolytic, non-mobile, with fermenting activity from carbohydrates dextrose, glucose, maltose and trehalose. The *Weissella ceti* bacterium isolated from the affected organisms was genetically characterized by the use of conventional PCR. It uses specific primers from a collagen adhesion site only in this species. The histological lesions evidenced in the rainbow trout affected by this bacterium were in the eye separation of stromal fibers and hemorrhage in the choroid, multifocal necrotic hepatitis with hepatocytes in degeneration and meningitis and congestion in the brain. This is the first report of the bacterium in septicemic outbreaks in rainbow trout in Mexico.

Key words: *Weissella ceti*, *Oncorhynchus mykiss*, septicemia, Weissellosis.

1. INTRODUCCION

El perfil altitudinal de México genera una gran diversidad de condiciones climáticas y ecosistemas que contribuye al desarrollo de un sector acuícola muy diversificado contando con kilómetros de líneas costeras y 1.3 millones de hectáreas de aguas epicontinentales las cuales constituyen el marco ideal para el desarrollo de actividades acuícolas, demostrando con ello el potencial del país para el desarrollo de cultivos acuícolas (Arredondo, 1996).

La acuicultura es una de las actividades que a nivel productivo ha tenido un mayor crecimiento económico y alimenticio a nivel mundial, la Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que hacia 2030 la acuicultura producirá el 65% de los alimentos de procedencia acuática destinados para el consumo humano, ya que se ha visto un crecimiento impresionante del suministro de pescado para la alimentación pasando de porcentaje 26% en 1974 al 39 % para el 2004 (FAO, 2005).

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) fue una de las primeras especies de peces que fueron domesticadas, y actualmente se cultiva en todo el mundo de forma intensiva desde fines de los años 1800. En México dentro de la producción acuícola, la trucha arcoíris por su volumen se encuentra posicionada en el lugar 18 de la producción pesquera del país, sin embargo, por su valor económico se posiciona en el séptimo lugar (Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, 2013).

Debido a la importancia en el consumo y en la producción de trucha arcoíris en el país, gran parte de los procesos patológicos que afectan a esta especie han sido el objeto de varios estudios, a pesar de esto, varios aspectos son hasta ahora desconocidos y con el paso del tiempo han sufrido variaciones, dando como consecuencia la presentación de enfermedades emergentes (Gijon y Zarza, 2006) que causan alta mortalidad y morbilidad, generando grandes pérdidas económicas debido tanto a los costos de los tratamientos como a la muerte de los peces (Bastardo, 2012). La etiología de estas enfermedades emergentes que afectan a la trucha varían, pasando desde las víricas, bacterianas y fúngicas, además de patologías de origen desconocido, siendo más frecuentes las afecciones de origen bacteriano (Gijon y Zarza, 2006).

Las enfermedades bacterianas que afectan el cultivo de trucha arcoíris frecuentemente en su mayoría son causadas por bacterias Gram negativas recibiendo menor atención las generadas por bacterias Gram positivas, debido a que se considera que tienen un menor impacto económico y sanitario en la producción piscícola (Vendrell *et al.*, 2006). Sin embargo, actualmente las patologías generadas por cocos y bacilos Gram positivos han aumentado tanto en frecuencia de presentación como en virulencia, generando pérdidas económicas a las granjas acuícolas.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Una de las enfermedades bacterianas emergentes de actualidad en el cultivo de trucha a nivel mundial es la generada por bacterias cocobacilares Gram positivas pertenecientes al género de las bacterias ácido lácticas (BAL). Este tipo de bacterias son un grupo de organismos descritos desde inicios de 1900 y se conocen como una familia de organismos heterogéneos que pueden fermentar una variedad de nutrientes, produciendo principalmente ácido láctico, se encuentran en ambientes ricos en carbohidratos que utilizan como sustrato, estos ambientes son comida y enlatados, pero también se encuentran en cavidades de humanos y animales, en ensilados y en materiales de plantas (Liu *et al.*, 2014).

La mayoría de bacterias ácido lácticas (BAL) no son consideradas patógenas y existen pocos registros de enfermedad en peces que sean causadas por estos agentes. En 1974 Ross and Toth describen por primera vez mortalidades de trucha arcoíris en donde se vieron implicadas este tipo de bacterias. En 2007 Austin y Austin aislaron bacterias ácido lácticas de riñones de trucha arcoíris moribundas tras sufrir una enfermedad crónica.

Weissella ceti es una bacteria ácido lácticas que recientemente se ha descrito como causantes de enfermedad en granjas trutícolas a nivel mundial, se reportó por primera vez en China, seguida de Brasil y Estados Unidos (Liu, *et al.*, 2007, Figueiredo, *et al.*, 2012, Welch, 2014). Provoca una enfermedad septicémica que genera altas mortalidades afectando principalmente a los peces de tamaño mayor de entre 0.25 y 1 kg. Observando como signología característica a los peces cerca de la superficie, letargia y anorexia, oscurecimiento del cuerpo, exoftalmia, opacidad corneal, hemorragias en ojo, en cerebro e hígado (Welch, 2014).

En México no hay registro de esta u otras bacterias Gram positivas que generen enfermedades de tipo septicémico en truchas arcoíris, es por ello que a medida que pasa el tiempo es de suma importancia la continua investigación de enfermedades que afectan la producción de las especies piscícolas, con la finalidad de diagnosticarlas oportunamente, dando pie a establecer tratamientos efectivos para su control, y así evitar pérdidas y mejorar la salud de los cultivos en las granjas acuícolas.

El presente proyecto de investigación tiene como finalidad realizar la identificación fenotípica y genética de bacterias Gram positivas clasificadas como bacterias ácido lácticas (BAL) que están generando cuadros septicémicos en truchas arcoíris, y realizar la descripción patológica que estas bacterias desencadenan en los peces debido a la singular característica de formar parte de la microbiota de una gran variedad de animales, además de contribuir en la industria alimentaria; se tiene el antecedente de que hace algunos años se observó esporádicamente en algunas granjas acuícolas de otros países, pero en México no ha sido oficialmente reportada.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ACUACULTURA Y TRUCHA ARCOÍRIS EN MÉXICO

Acuicultura significa “cultivar en agua”, hace referencia a todas las formas de cultivo de animales y plantas acuáticos en ambientes dulceacuícolas, salobres y marinos, al manejo y control de los recursos vivos que habitan en el agua, así como su cultivo bajo condiciones controladas hasta su cosecha, procesamiento, comercialización y consumo (Gutierrez, 1999); implica la cultura del manejo del agua, el ciclo natural de ésta, sus características físico-químicas, su distribución entre otras (Platas y Vilaboa, 2014). Es una actividad orientada a la creación de unidades de producción para conseguir una producción controlada de bienes alimenticios para mejorar el abastecimiento del consumo (Gutierrez, 1999).

La acuicultura a su vez se encuentra dividida según la especie a producir, por ejemplo, la piscicultura que se encarga del cultivo y producción de peces, o específicamente la truticultura que se refiere al cultivo y cría de trucha (Platas y Vilaboa, 2014).

El desarrollo de la acuicultura implica considerar factores bióticos y abióticos del agua como el medio en el que se desarrollan estos organismos. El ambiente acuático abarca una amplia variedad de parámetros que influyen en el mantenimiento de la homeostasis, siendo esenciales para el crecimiento y la reproducción de los peces; así mismo, cada especie de peces requiere de parámetros físico-químicos específicos, los cuales determinaran el equilibrio entre salud-enfermedad. Si por alguna razón los factores ambientales se alteran más allá de los límites aceptables pueden predisponer o incluso causar alguna enfermedad a los peces (FAO, 2005).

2.1.1 Estatus de la producción acuícola en México

En México la acuicultura nace como una actividad complementaria de apoyo social a las comunidades rurales, con lo cual se pretendía incrementar el consumo de proteína de origen animal, y así mejorar el nivel nutricional de la población de las áreas marginadas en donde justamente existen las condiciones para realizar actividades de piscicultura (FAO, 2005). Actualmente, esta actividad ha trascendido por diferentes etapas de desarrollo siguiendo tres vertientes, la acuicultura de fomento principalmente para autoconsumo y destinadas al cultivo de especies como tilapia y carpa; las pesquerías acuiculturales de medianas y grandes dimensiones para el cultivo de carpa, tilapia, bagre y lobina; y los sistemas controlados que incluyen el cultivo de la trucha con fines de comercialización (Ramírez-Martínez y Sánchez, 1998).

Afortunadamente la república mexicana se encuentra ubicado en una región en donde cuenta con variedad de zonas costeras, además de cuerpos de agua dulce, lo que le permite poder mantener una gran variedad de especies acuícolas bajo

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

condiciones de cultivo, entre las que encontramos: especies pelágicas (sardinas, anchovetas, arenques), las demersales (pargo, lisa) crustáceos y moluscos así como especies de cría en donde se ubica la producción de especies como trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), bagre (*Ictalurus punctatus*), tilapia (*Oreochromis* sp.), carpa (*Cyprinus carpio*) y langostino (*Macrobrachium acanthurus*), siendo estas especies las de mayor consumo en la población, especialmente la trucha arcoíris, y de las cuales se han implementado granjas ampliamente difundidas por todo el territorio nacional, proporcionando fuentes de trabajo y contribuyendo a la alimentación (FAO, 2015, SAGARPA, 2014).

Al igual que en otras partes del mundo, la acuicultura ofrece alternativas de ocupación laboral a las poblaciones locales, favoreciendo el arraigo de las personas a sus zonas de origen. Así, en el período de entre 2005-2010 la proporción de personas que se dedican a la acuicultura aumentó del 17 % al 33%. Las actividades en pequeña escala continúan desempeñando una función decisiva en el sustento de los medios de vida, en particular de las áreas rurales, al contribuir a la seguridad alimentaria y en mitigar la pobreza (FAO, 2016).

Actualmente, a nivel mundial México se encuentra en la posición 29 en cuanto a la producción derivada de la acuicultura y ocupa el 3er lugar a nivel Latinoamérica. Sin embargo, de acuerdo a registros de la FAO, México ha retrocedido niveles internacionalmente entre los años 2009 y 2010, aunque a nivel nacional ha habido un aumento en este tipo de actividad (FAO, 2010, 2015). En términos de producción, lo generado por pesquerías derivadas de la acuicultura hasta el 2014 fue un volumen de 129 142 toneladas de peso vivo (SAGARPA, 2014), lo que representa una oportunidad para el desarrollo de esta actividad en el territorio nacional.

Las especies acuícolas de mayor producción en volumen en México son camarón con una producción nacional de 127, 517 toneladas (t), mojarra-tilapia 102, 039 t, ostión 42, 945 t, carpa 33, 003 t, trucha 9, 757 t, bagre 6, 754 t, charal 2, 932 t, langostino 2, 483 t y lobina 477 t; sin embargo, de acuerdo al valor económico que representa su producción, las especies con mayor valor por ventas en pesos MX, fueron camarón con 3,925,479 miles de pesos, mojarra-tilapia 1,766,060, atún 547,425 y trucha arcoíris con 398,443 (SAGARPA, 2014).

Los estado con mayor volumen de producción pesquera de acuicultura en México son Sinaloa con 38,118 toneladas, Jalisco 29,742 t, Veracruz 28,831 t, Tabasco 18,977 t, Sonora 18,480 t, Chiapas 17,153 t, México 14,309 t, Nayarit 13,589 t y Michoacán 13,465 t (SAGARPA, 2014).

El reto para México en el sector acuícola es mantener su producción, generando aportes de proteína de origen animal de buena calidad, contribuyendo de igual manera a la economía de los productores y por ende a la productividad del país, así como ayudar a contrarrestar los efectos ocasionados por el crecimiento poblacional (Norzagaray *et al.*, 2012).

2.1.2. El cultivo de trucha en México

La cría de la trucha arcoíris en México se inició a finales del siglo XIX con el fin de repoblar los cuerpos de agua, aunque Gómez y Sarmiento (2011) refieren que desde 1889, en el Estado de México, ya crecían truchas, pero no fue hasta 1937 que se formalizó la cría de la trucha con la creación del centro piscícola "El Zarco", responsable de esparcir el cultivo de la trucha por todos los cuerpos de agua del país (García *et al.*, 2013), existiendo tan solo en el estado de México más de 335 granjas productoras de trucha arcoíris (Guzmán-Hernández *et al.*, 2013).

A pesar de que la tasa de crecimiento de la trucha arcoíris es relativamente lenta, su conversión alimenticia la hace una especie económicamente rentable; representando este un punto a favor de la producción de esta especie en el territorio nacional (SAGARPA, 2014). La pesquería de esta especie se realiza en 19 entidades federativas y es una de las actividades pesqueras más importantes del país, al impactar en la economía y desarrollo de las comunidades rurales, principalmente en las que registran mayores rezagos (SAGARPA, 2017).

Con base en estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en 2014 la producción de trucha en el país alcanzó las 15 mil 695 toneladas, lo que representa un crecimiento a 2015 de 22 por ciento, en términos anuales.

Actualmente en México existen poblaciones de trucha arcoíris silvestre y cultivada en los estados de Chiapas, Hidalgo, Jalisco, México, Baja California, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Guerrero, Coahuila, Chihuahua, Durango Sinaloa, Sonora, Oaxaca y Distrito Federal (SAGARPA, 2014).

El eslabón de comercialización de la trucha se enfoca a los mercados regionales, en particular en centros turísticos y lugares que cuentan con restaurantes que hacen más atractivo el consumo de trucha fresca. Aunado a esto se ha logrado penetrar en tiendas de autoservicio ofreciendo el producto en diferentes presentaciones (Guzmán-Hernández *et al.*, 2013).

2.1.3. Generalidades de la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

La trucha arcoíris, es un pez perteneciente a la familia de los salmónidos siendo la especie de trucha de mayor cultivo a nivel mundial (Arregui, 2013), es un pez teleosteo que habita en agua frías, que se caracteriza por presentar una línea iridiscente (que hace referencia a su nombre) a nivel de la línea lateral, y manchas pequeñas en todo el cuerpo (Figura 1). Sus orígenes datan de la Costa Este del Océano Pacífico que se extiende desde Alaska hasta la Península de Baja California (SAGARPA, 2014).

De acuerdo a Walbaum (1792) la clasificación taxonómica de la trucha arcoíris es

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Salmoniformes

Familia: Salmonidae

Subfamilia: Salmoninae

Género: *Oncorhynchus*

Especie: *O. mykiss*



Figura 1: Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

La trucha arco iris es una especie eurohalina (habitan aguas dulces y saladas), presenta un cuerpo alargado y fusiforme, con 60- 66 vértebras; tiene una aleta adiposa, generalmente con un borde negro, presentan una coloración azul a verde oliva con una banda irisada rosácea a lo largo de su cuerpo y una línea plateada por debajo de esta, además cuenta con una línea lateral completa con 100 a 150 poros; por debajo el vientre es color gris plateado o blanquecino. Presenta pequeños puntos negros sobre el lomo, los costados, la cabeza y aletas. Los machos presentan mayor tamaño y durante la etapa reproductiva desarrollar dimorfismo sexual, mientras que las hembras presentan vientre abultado y el orificio genital aparece hinchado y con coloración rojiza (Armendáriz, 2009; Arregui, 2013).

En etapa adulta, la trucha arcoíris puede alcanzar una longitud máxima de 120 cm, un peso máximo de 25.4 kg y una edad hasta de 11 años. A esta especie se le puede encontrar en aguas con temperaturas que oscilan entre los 10 y los 24 °C (Armendáriz, 2009).

La madurez sexual en las hembras de trucha se alcanza a los 18 meses y a los 24 en los machos. Desovan anualmente y la velocidad de desarrollo de los huevos depende mucho de la temperatura del agua, la cual es óptima entre 8 y 12 °C. Al ser una especie anádroma, naturalmente se reproduce en agua dulce en las partes

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

altas y frías de los ríos, posteriormente migra al mar para crecer y alcanzar el estado adulto. La época de desove es de diciembre a mayo (Armendáriz, 2009).

La trucha es una especie carnívora, su alimentación en el medio natural comprende cuatro grupos principales de organismos: zooplancton, invertebrados del bentos (anfípodos, insectos acuáticos, crustáceos, moluscos y gusanos planos), insectos terrestres y peces, consumiendo estos ultimo al alcanzan una talla de 25 a 40 cm. En condiciones de cultivo, se hace uso de alimentos balanceados en diferentes presentaciones comprendiendo desde alimento de iniciación con 52% de proteína y 14% de lípidos, hasta el alimento finalizador con 40% de proteína y 10% de lípidos (Armendáriz, 2009).

La trucha es una de las especies acuícolas que requiere condiciones de cultivo estrictos: temperatura baja que oscila de 8 -15 °C dependiendo de la etapa, pH neutro con tendencia a base (6.5 a 9.0) por debajo del pH 5,0 los salmónidos pierden la facultad para regular concentraciones de cloro y sodio en el plasma y se producen erosiones en piel y branquias. La concentración óptima de oxígeno es mayor a 5 ppm (partes por millón), los límites de cultivo para incubación de huevos y primeras fases embrionarias suelen rondar 6 ppm, en etapas posteriores el límite puede encontrarse en 4-5 ppm. Para su cultivo exitoso, la trucha requiere agua corriente y limpia; se necesitan aguas claras para la incubación y alimentación por ello los sólidos disueltos deben ser menos de 500 mg/L y sólidos suspendidos menos de 80 mg/L. Estas características permitirán el adecuado desarrollo de la especie y con ello ayudan a mantener en buen estado su salud (Roberts y Shepherd, 1980, Armendáriz, 2009, Arregui, 2013).

2.1.4. Principales enfermedades que afectan a la Trucha arcoíris

En el cultivo de salmónidos pueden ocurrir pérdidas importantes que pueden deberse a diversos factores tales como intoxicaciones, nutrición incorrecta o averías en los sistemas, de tal manera que el desarrollo de una acuicultura sana requiere de mantener condiciones adecuadas de temperatura y oxígeno, una alimentación que reúna los requerimientos nutritivos de los organismos, densidades adecuadas en el cultivo y medidas profilácticas al final de cada ciclo de producción. Sin embargo las enfermedades aparecen a veces en forma esporádica o periódica y pueden manifestarse en forma asintomática o bien, desarrollar el cuadro clínico específico de una enfermedad afectando el pez, siguiendo un curso crónico, terminando por producir muerte de los organismos (Roberts y Shepherd, 1980, CONAPESCA, 2001).

Gran parte de las enfermedades generadas en las especies piscícolas son causadas por agentes patógenos tales como virus, parásitos, hongos y bacterias, siendo estas últimas el grupo con mayor repercusión económica en el cultivo de trucha, tanto por la mortalidad directa como por costes derivados de tratamientos y por el manejo de las enfermedades (Platas y Vilaboa, 2014). Así mismo, recientemente se ha dado importancia a otras enfermedades de etiología incierta o

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

compleja (Roberts y Shepherd, 1980, Noga, 2010, FAO, 2011). En las siguientes tablas se enlistan las principales enfermedades que afectan a esta especie.

Tabla 1. Principales enfermedades bacterianas que afectan los cultivos de trucha.

Enfermedad	Agente causal	Manifestación
Furunculosis	Bacteria: <i>Aeromonas salmonicida</i>	Exoftalmia, lesiones en la piel, úlceras, branquias pálidas o muy hemorrágicas, inflamación del intestino pudiendo sufrir necrosis, enrojecimiento de las aletas, furúnculos en la piel, muerte de tejidos. Enfermedad septicémica.
Enfermedad similar a Furunculosis	Bacteria: <i>Aeromonas liquefaciens</i>	Lesiones pequeñas sobre el cuerpo que se convierten en llagas abiertas, aletas enrojecidas y los tejidos se rompen.
Vibriosis	Bacteria: <i>Vibrio anguillarum</i>	Pérdida de apetito, enrojecimiento de aletas y alrededor de orificios respiratorio y boca, branquias hemorrágicas, ulceración en la piel. Enfermedad sistémica.
BKD (Enfermedad Bacteriana del Riñón)	Bacteria: <i>Renibacterium salmoninarum</i>	Pérdida de apetito, oscurecimiento corporal, exoftalmia, distención abdominal, hemorragias en base de aletas, masas nodulares blancas en el riñón.
Estreptococcosis	Bacteria: <i>Streptococcus iniae</i> otros <i>Streptococcus</i> y otras bacterias Gram positivas relacionadas al género	Oscurecimiento del cuerpo, letargia, nado errático, rigidez dorsal, hemorragias en el cuerpo, ascitis. Enfermedad septicémica.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Pseudo BKD / Carnobacteriosis	Bacteria: <i>Carnobacterium piscícola</i>	Oscurecimiento corporal, exoftalmia, ascitis, lesiones hemorrágicas en hígado, en menor proporción también en bazo y riñón.
-------------------------------	--	---

Tabla 2. Principales enfermedades de origen viral que afectan los cultivos de trucha.

Enfermedad	Agente	Manifestación
IPN (Necrosis Pancreática Infecciosa)	Virus <i>Birnavirus</i> (IPNV)	Oscurecimiento en el dorso de los peces, nado errático, distensión abdominal, exoftalmia, hemorragias ventrales, branquias pálidas, signos neurológicos, hemorragias petequiales en vísceras. Los peces permanecen en el fondo del estanque hasta la muerte.
IHN (Necrosis Hematopoyética infecciosa)	Virus <i>Rabdovirus</i> (IHNV)	Letargia, exoftalmia, distensión abdominal, hemorragia en base de aletas, los peces presentan largas tiras fecales blanquecinas en el recto. Vísceras pálidas y con petequias, tracto gastrointestinal distendido y sin alimento.
VHS (Septicemia Hemorrágica Viral)	Virus <i>Rabdovirus</i> (VHSV)	Oscurecimiento del cuerpo, letargia, exoftalmia, enrojecimiento en base de aletas y en branquias, hemorragias en ojos, branquias pálidas, ascitis.

Tabla 3. Principales enfermedades parasitarias que afectan los cultivos de trucha.

Enfermedad	Agente	Manifestación
Punto blanco	Protozoo <i>Ichthyophthirius miltifilis</i>	Manchas blancas sobre el cuerpo, letargia, los peces se frotan sobre las paredes del estanque.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Enfermedad del torneo (Myxosomiasis)	Protozoo <i>Myxosoma cerebralis</i>	Oscurecimiento del cuerpo, nado en círculos (remolino), deformación del opérculo y de aleta caudal, muerte.
Hexamitiasis Octomitis	Protozoo <i>Hexamita truttae</i>	Letargia, los peces permanecen en el fondo del estanque hasta su muerte.
Costiasis	Protozoo <i>Costia necatrix</i>	Mucosidad gris azulosa sobre la piel en donde se encuentran los parásitos.
Girodactilosis (gusanos planos)	Trematodo <i>Gyrodactylus</i> sp.	Parásito fijado en la aleta caudal y anal, erosiones en el cuerpo y aletas.
Parasitismo por trematodos	Trematodo <i>Displostomum spathaceum</i>	Opacidad corneal, pobre condición corporal

Las enfermedades bacterianas son el grupo de patologías que tienen mayor repercusión económica en la producción de trucha, tanto por las mortalidades que generan como por los costos que se derivan de los tratamientos y de las vacunaciones como medidas de manejo de las enfermedades (Gijón y Zarza, 2006).

Las septicemias bacterianas de peces tradicionalmente se han asociado con las bacterias de tipo Gram negativas, que contienen endotoxinas. Sin embargo, ahora se sabe que las bacterias Gram positivas también pueden causar el síndrome de sepsis (Koneman *et al.*, 2008).

Dentro de este último tipo de organismos, en los últimos años han cobrado importancia sanitaria en la acuicultura mundial la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL).

2.2. LAS BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

El concepto de bacterias ácido lácticas (BAL) como un grupo de organismos surgió a principios del siglo XX (García, 2007). Originalmente este tipo de microorganismos eran aisladas de plantas verdes, con el paso del tiempo y por un proceso de evolución y adaptación han colonizado otros hábitats distintos, que son lo suficientemente ricos para satisfacer sus necesidades nutricionales y ambientales (Acedo *et al.*, 2006).

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

El término “*Bacterium acidi lactici*” se debe a Wei Emamn que lo propuso en 1899, aunque las primeras referencias a este tipo de bacterias se deban a Hueppe (1884), quien describió una parte de la flora microbiana responsable de la acidificación de la leche y productos lácteos, a la que se denominó “*Milch sauer bacillus*”. Pero fue Orla-Jensen quien dio las pautas para su clasificación, teniendo en cuenta la morfología, modelo de fermentación de glucosa, temperatura de crecimiento entre otros; inicialmente se describieron cuatro géneros, pero desde 1985 se han descrito nuevos géneros (Heineman, 1920, Salminen *et al.*, 2004).

El hábitat en donde se ha encontrado a este tipo de microorganismos son espacios ricos en nutrientes caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles, productos de la degradación de proteínas, vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno, como en la leche y principalmente sus derivados (Acedo *et al.*, 2006, Gervasio, 2012).

2.2.1. Características generales de las BAL

Las BAL son microorganismos Gram positivos, cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5-0.8 μm , catalasa negativos, no formadores de esporas, aerotolerantes, carecen de actividad respiratoria porque les falta una enzima (citocromo catalasa), contienen un grupo hemo que les permite poner en marcha la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones (Parra, 2010). Son organismos quimioorganotróficos, esto quiere decir que obtienen su energía a través de la oxidación de compuestos orgánicos y crecen en medios complejos ya que necesitan medios de cultivos ricos con carbohidratos fermentables, son tolerantes a la acidez, capaces de fermentar los hidratos de carbono para obtener energía y producir ácido láctico (Ringo y Gatesoupe, 1998, König y Fröhlich, 2009); presentan en su ADN un porcentaje de C-G menor del 55 mol% (García, 2007).

La vía metabólica por la cual degradan la glucosa puede ser homofermentativa o heterofermentativa (Gervasio, 2012). En el primer caso se producen dos moléculas de ácido láctico a través de la degradación de hexosas, siendo esta la característica esencial del metabolismo de estas bacterias (Acedo *et al.*, 2006), y en el segundo caso se obtiene solamente 50% de ácido láctico, produciendo el restante 50% de etanol, ácido acético, ácido láctico y/o dióxido de carbono (Parra, 2010, Gervasio, 2012). Todos los miembros de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, y *Vagococcus* son homofermentativas, y *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*, y algunos lactobacilos son heterofermentadores; siendo estos últimos más importantes en la industria de los alimentos por su contribución en la producción de sabor y aroma (Salminen *et al.*, 2004).

La temperatura en la que este tipo de bacterias se desarrolla abarca un amplio rango que va de los 15 a los 35°C (llamadas mesófilas), pero algunas son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 5°C y otras a temperaturas tan altas como 45°C. La mayoría de estas bacterias se desarrollan en una escala de pH que va de 4 a

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

4.5, aunque algunas de ellas son capaces de crecer a pH tan bajo como 3.2 y otras a pH tan alto de 9.6 (García, 2007). La tolerancia a la sal (6.5 % NaCl) puede ser usada para distinguir entre los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* o *Streptococcus*; la tolerancia extrema a sal (18%) es confinada al género *Tetragenococcus* (Salminen *et al.*, 2004).

Las BAL se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, en general, LAB se desarrollan en hábitats con un rico suministro de nutrientes. Se producen en la descomposición de material vegetal y frutas, en los productos lácteos, en productos cárnicos, embutidos y pescado fermentado, remolacha, patatas, puré, chucrut, masa madre, verduras en escabeche, ensilaje, bebidas, plantas, agua, jugos, aguas residuales y en las cavidades (boca, genitales, tracto intestinal y respiratorio) de humanos y animales (Konig y Fröhlich, 2009). Son parte de la microbiota saludable de boca, de la mucosa intestinal y cavidades de animales y humanos (Acedo *et al.*, 2006, Gervasio, 2012).

En el sistema intestinal, estas bacterias contribuyen a la salud y el bienestar de los individuos mediante diversos efectos, como por ejemplo manteniendo el equilibrio de la microbiota intestinal (Parra, 2010, Fernández, 2014), la exclusión competitiva de patógenos y la estimulación y/o modulación del sistema inmunitario (Reviriego, 2009).

Estos microorganismos son considerados como probióticos, los cuales se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2002). El uso de probióticos se ha asociado con un gran número de efectos beneficiosos como la mejora de la intolerancia a la lactosa, la modulación del sistema inmunitario, la reducción de la hipercolesterolemia y la hipertensión, y la protección frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias, alérgicas y tumorales. Sin embargo, no se ha comprobado que las bacterias lácticas y bifidobacterias solo posean propiedades beneficiosas (Reviriego, 2009), en varios estudios se han llegado a identificar como patógenos.

2.2.2. Clasificación de las Bacterias Acido Lácticas

La primer clasificación de estas bacterias fue hecha por Orla-Jensen en 1919, basándose en la morfología, disposición celular, tipo de metabolismo fermentador de glucosa, tipos de isómeros del ácido láctico, capacidad de desarrollarse a diferentes temperaturas (10° C y 45° C) y morfología bacilar o cocoide (Acedo *et al.*, 2006).

Las bacterias acido lácticas son un grupo de bacterias difícil de definir debido a que engloba a microorganismos muy heterogéneos tanto morfológicamente como filogenéticamente; comprende alrededor de 20 géneros (Reviriego, 2009, García, 2007). En la 8a. edición del Manual de Bergey's se dio una clasificación de las BAL, bacterias Gram positivas, morfología cocoide o bacilar, no esporuladas, anaerobias

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

facultativas y productoras de ácido láctico; y de acuerdo a la composición de ácidos grasos, constituyentes de pared celular y técnicas moleculares, están clasificadas en los siguientes diferentes géneros: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Acedo *et al.*, 2006).

2.2.3. Clasificación Fenotípica

Las principales características para su primera clasificación se basaron en el uso de pruebas fenotípicas por medio de esquemas de fermentación, constituyendo las bases de identificación y descripción de los taxos. La caracterización fenotípica abarca pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas para diferenciar especies a nivel género (Tabla 4 y 5) (Acedo *et al.*, 2006).

Tabla 4. Características fisiológicas de bacterias ácido lácticas con morfología bacilar y cocobacilar

	Bacilos		Coco-bacilo
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Weissella</i>
CO2 de glucosa	-	+/-	+
Crecimiento a 10°C	+	+/-	+
Crecimiento a 45°C	-	+/-	-
Crecimiento en Na Cl 6.5%	ND	+/-	+/-
Crecimiento en Na Cl 18%	-	-	-
Crecimiento a pH 4.0	ND	+/-	+/-
Crecimiento a pH 9.6	-	-	-

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Tabla 5. Características fisiológicas de bacterias ácido lácticas de morfología cocoide

	Cocos						
	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> s/ <i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i> / <i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
CO ₂ de glucosa	-	-	-	+	-	-	-
Crecimiento a 10°C	+	+	+	+	+/-	-	+
Crecimiento a 45°C	-	+	-	-	+/-	+/-	-
Crecimiento en Na Cl 6.5%	+	+	-	+/-	+/-	-	+
Crecimiento en Na Cl 18%	-	-	-	-	-	-	+
Crecimiento a pH 4.0	-	+	+/-	+/-	+	-	-
Crecimiento a pH 9.6	+	+	-	-	-	-	+

2.2.4. Clasificación filogenética

Debido a que la secuencia de nucleótidos de DNA es única para especies individuales de microorganismos, el análisis del parentesco de los ácidos nucleicos microbianos fue reconocido como una posible herramienta para descifrar la taxonomía y nomenclatura bacteriana. Inicialmente, el DNA fue analizado por su contenido en G + C% (porcentaje de guanina + citosina) (Koneman *et al.*, 2008).

Pero la clasificación óptima para determinar las relaciones filogenéticas bacterianas se basó en el ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) 16S por medio de técnicas como hibridación DNA-rRNA, uso de transcriptasa reversa para secuencias segmentos grandes de rRNA después remplazada por secuenciación directa de genes rRNA y amplificados por PCR. Se han comparado datos de secuencias de otras moléculas conservadas, como rRNA 23S o el factor de elongación *Tu* (Acedo *et al.* 2006).

De acuerdo a las secuencias 16S y 23S del rRNA las bacterias Gram positivas se dividen en 2 grupos; el primero en donde se encuentran bacterias con una composición en G+C de su DNA menos a 50 mol% (rama de los *Clostridium*) (Stiles y Holzapfel, 1996) y el segundo grupo de bacterias con alto contenido en C+G mayor de 50 mol% (rama de los *Actinomyces*); de acuerdo a esta clasificación las BAL se encuentran en la subdivisión de los *Clostridium* (Acedo *et al.*, 2006, König y Fröhlich, 2009).

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

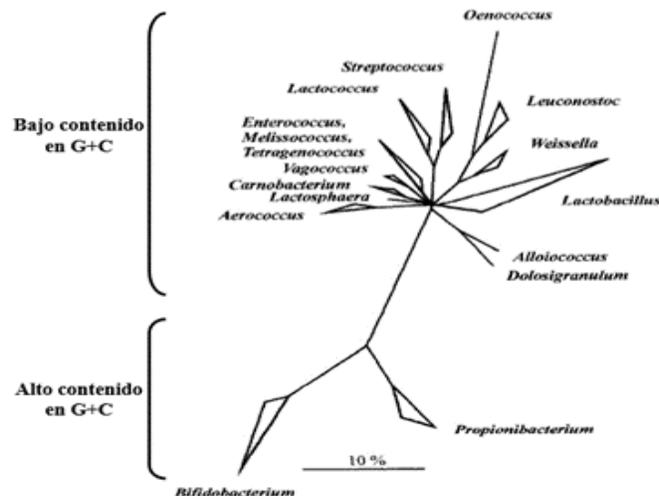


Figura 2. Grupos filogenéticos de bacterias ácido lácticas (BAL) con bajo y alto contenido de C-G %mol en el ADN. Tomado de Stiles y Holzapfel (1996).

Con la aplicación de nuevos métodos de clasificación y la descripción de nuevos géneros, las bacterias lácticas se clasifican en los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alliococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Acedo *et al.*, 2006).

2.2.5. Metabolitos generados por Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son de gran utilidad en la producción comercial de alimentos fermentados debido a los efectos que ejercen sobre el sabor, aroma, textura e incremento del valor nutricional de los alimentos (Fernández *et al.*, 2014). Estos efectos se atribuyen por la actividad metabólica que las BAL que ejercen sobre proteínas, azúcares y lípidos, además favoreciendo la digestión del consumidor y a su vez aumentando la vida útil de los productos alimenticios, siendo utilizadas como biopreservadores (Vásquez *et al.*, 2009). Este grupo de bacterias presentan un efecto antagónico frente a diferentes microorganismos patógenos, propiedad atribuida por los productos finales de su metabolismo: ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores de microorganismos patógenos como: el ácido láctico, ácido cítrico, acético, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), aniones super óxido, radicales libres, diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas (Stiles y Holzapfel, 1996, Vásquez *et al.*, 2009).

2.2.6. Bacteriocinas

De los metabolitos generados por BAL, los de uso más frecuente tanto en alimentos como en otras matrices son las bacteriocinas (Fernández *et al.*, 2014), que son péptidos pequeños con actividad antimicrobiana, son segregadas de forma extracelular para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Mondragón *et al.* 2013) pudiendo tener actividad bactericida o bacteriostática, en donde la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de ésta (Moreira, 1993).

Se ha demostrado que la aplicación de bacteriocinas, ya sea directamente como un compuesto purificado en un fermento bacteriano crudo, y/o indirectamente a través del organismo productor de bacteriocina puede reducir los niveles de microorganismos patógenos en diferentes matrices alimentarias (Vásquez *et al.*, 2009), y en acción combinada con una o más bacteriocinas o con otros metabolitos (como reuterina, glicina, ácido láctico y antimicrobianos de uso industrial) aumentan su eficacia y estabilidad (Fernández *et al.*, 2014).

Además de servir como barreras antimicrobianas, las bacteriocinas también mejoran la digestibilidad e incrementan la actividad inmunológica de muchas especies animales y son ampliamente utilizadas en la cría de cerdos, aves y recientemente en la producción de organismos acuáticos.

Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares (Monroy, *et al.*, 2009), clasificadas de acuerdo a características bioquímicas y genéticas: Clase I- Lantibióticos, con un tamaño <5kDa, pequeños péptidos activos a nivel de membrana, contienen lantionina y B-metil lantionina. Clase II – No lantibióticos, tamaño <10kDa, lineales y sin modificaciones postraduccionales, termoestables, se reportan en esta clase divergicina A y acidocina B. Clase III – Proteínas de alto peso molecular, termolábiles, complejas, son ejemplos Helveticina J. V, acidofilicina A y lactacinas A y B. Clase IV – péptidos con una parte proteica y una o fracción lipídica o glucídica, incluye la lactocina S o mesenterocina 52. Clase V – con estructura circular, sin modificación postraducciona, como la enterocina AS-48 y la gasericina A (Monroy, *et al.*, 2009, Vásquez *et al.*, 2009, Mondragón *et al.*, 2013, Olvera *et al.*, 2015).

La aplicación de las BAL en la industria alimentaria, ha permitido encontrar una gran diversidad de antagonismos microbianos, aportando protección a la microbiota intestinal, brindando sabor y/o calidad a los productos y controlando patógenos o contaminantes de los alimentos (Monroy, *et al.*, 2009, Mondragón *et al.*, 2013).

2.2.7. Complejo septicémico por bacterias Gram positivas en trucha arcoíris

Las bacterias ácido lácticas de peces, son organismos Gram positivos, cocos y bacilos, no móviles, productoras de ácido láctico como producto final de su

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

fermentación y comúnmente se encuentran en el tracto gastrointestinal de peces, formando parte de la microbiota intestinal normal; sin embargo, también se han identificado como bacterias patógenas afectando cultivos de peces (Ringo y Gatesoupe, 1998).

Las bacterias lácticas patógenas, tales como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus* y recientemente *Weissella* han sido detectadas en el líquido ascítico, hígado, corazón y bazo de peces con signología de enfermedad septicémica (Ringo y Gatesoupe, 1998, Fusco *et al.*, 2015).

La signología observada en peces afectados por enfermedades causadas por bacterias lácticas cursan con cuadros clínicos patológicos muy similares, que incluye oscurecimiento del cuerpo, letargia, anorexia, nado errático, exoftalmia u opacidad corneal, distensión abdominal con acumulación de líquido ascítico, en la mayoría de los casos hemorragias en ojos, opérculo y base de las aletas. En la trucha arcoíris, los signos de enfermedad son consistentes con un proceso de septicemia, con daño en cerebro (Austin y Austin, 2016), así como daño en hígado, riñón, bazo e intestino (Ringo y Gatesoupe, 1998).

Como una referencia, en la tabla 6 se describen algunas características diferenciales de las enfermedades que integran el complejo septicémico por bacterias lácticas Gram positivas, aunque el diagnóstico definitivo de la enfermedad se deberá realizar por medio de la secuenciación génica.

Tabla 6. Enfermedades que integran el complejo septicémico en trucha arcoíris por bacterias Gram positivas

Nombre de la enfermedad	Agente etiológico	Diagnóstico
Estreptococosis	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Vacococcus salmoninarum</i>	Morfología: Cocoide, en cadenas cortas Ocurre a temperaturas de 9 a 10°C. Se observa estómago e intestino con fluido gelatinoso o amarillento, presencia de granulomas en órganos internos.
Estreptococosis de aguas calientes/Lactococosis	<i>Lactococcus garvieae</i>	Morfología: Cocoide, agrupados de dos en dos, o en cadenas cortas de 3 ó 4 cocos. Enfermedad típica de verano con temperaturas superiores a

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

		16 °C, hemorragias petequiales en cuerpo.
Pseudo enfermedad bacteriana del riñón	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Morfología: Cocobacilo pleomorfo, con crecimiento hasta 37°C. Restringida principalmente a salmónidos en periodos de desove. Se observa la formación de pseudo membranas en la cavidad abdominal, localizada principalmente en USA y Canadá.
Weissellosis	<i>Weissella ceti</i>	Morfología: Cocobacilo pleomorfo en cadenas cortas, con crecimiento hasta 42°C. Afecta principalmente truchas adulto, se observan hemorragias en hígado y cerebro.

2.3. GENERO WEISSELLA

2.3.1. Historia y taxonomía de *Weissella*

El género *Weissella* fue dado a conocer en los 90's, anteriormente se encontraba clasificada en el género *Leuconostoc*. Este género comprende cocos y bacilos Gram positivos, siendo el primer genero de BAL que incluye estas dos morfologías (Salminen *et al.*, 2004). Todos los miembros son productores de gas a partir de carbohidratos y se identifican como bacterias heterofermentativas que difieren de otros lactobacilos heterofermentativos debido a que no producen amonio de arginina, y únicamente *Weissella paramesenteroides* y *Weissella hellenica* producen la isoforma D (-) de ácido láctico a partir de glucosa (Jay *et al.*, 2005).

Para la reclasificación del género *Weissella*, se realizaron análisis del gen 16S del ARN ribosomal (rRNA) de los miembros del género *Leuconostoc*, en donde se identificaron 3 líneas genéticas: el género *Leuconostoc sensu stricto*, *Leuconostoc paramesenteroides* (Collins, 1993) y *Leuconostoc oenos* (recientemente clasificados como *Oenococcus oeni*) (Fusco *et al.*, 2015); y en el género *L. paramesenteroides* es en donde se incluyen los lactobacilos atípicos: *Lactobacillus*

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

confusus, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* y *Lactobacillus viridescens*, que ahora se consideran como miembros del género *Weissella* (Björkroth *et al.*, 2002).

Fue en el año de 1993 cuando Collins y colaboradores designaron por primera vez al género *Weissella* al identificar organismos tipo-*Leuconostoc* en salchichas fermentadas, las cuales diferían de especies de *Leuconostoc* en pruebas bioquímicas (Fusco *et al.*, 2015). El énfasis en estos organismos resultó en la descripción del género *Weissella*, por medio de los datos de secuencia 16S y 23S rRNA (Björkroth *et al.*, 2002). El nuevo género descrito comprende a una bacteria que puede ser de morfología coco o bacilo (Fusco *et al.*, 2015); y el contenido de G + C en el DNA es 37 – 37 %mol.

A lo largo del tiempo y mediante el uso de técnicas moleculares se ha identificada nuevas especies que se han incluido en este género: *W. hellenica* reportada por Collins en 1993 (Fusco *et al.*, 2015), en 2002 Björkroth y colaboradores contribuyeron al estudio de estas bacterias al realizar estudios en *W. confusa* e identificar una nueva especie *W. cibaria* sp. nov. Actualmente el género comprende 19 especies válidas las cuales poseen del 93.3 - 99.2% de similitud en secuenciación del gen 16S rRNA (Bjorkroth *et al.* 2014), clasificadas en 5 ramos filogenéticos basados en la región 16S: ramo 1- *W. soli*, *W. diestrammenae*, *W. koreensis*, *W. kandleri* y *W. oryzae*. Ramo 2- *W. cibaria* y *W. confusa*. Ramo 3- *W. thailandensis*, *W. hellenica* y *W. paramesenteroides*. Ramo 4- *W. ceti*, *W. halotolerans*, *W. viridescens*, *W. minor* y *W. uvarum*. Ramo5- *W. beninensis*, *W. fabalis*, *W. fabaria* y *W. ghanensis* (Fusco *et al.*, 2015).

2.3.2. Descripción del género *Weissella*

Pertenece al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Leuconostocaceae*. Las bacterias que pertenecen al género *Weissella* son Gram-positivas, catalasa negativa, no formadoras de esporas, no móviles, de morfología cocoide o bacilar pudiendo ser pleomorfas, quimiorganotrofos, anaerobia facultativa con metabolismo fermentativoobligado (Collins *et al.*, 1993; Björkroth *et al.*, 2009, 2014). No poseen citocromo, son heterofermentadoras de glucosa por medio de la vía de las hexosas-monofosfato y el camino de fosfoquetolasa, generando como producto final de su fermentación ácido láctico (produciendo las isoformas D (-) o D (-) y L(+)), CO₂, etanol y/o acetato (Collins 1993, Bjorkroth *et al.*, 2014). Las bacterias de este género cuentan con un peptidoglicano específico en su pared celular, que está basado en lisina como un ácido di-amino; contienen alanina o alanina y serina en el puente interpeptídico (Bjorkroth *et al.*, 2014).

Sus requerimientos nutricionales son complejos, necesita péptidos, aminoácidos, carbohidratos fermentables, ácidos nucleicos, ácidos grasos y vitaminas. Crece a una temperatura ideal de 15° C, puede crecer a temperaturas de 42 a 45° C. Producen dextran, hidrolizan esculina y producen amonio de arginina; estas

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

características son variables para cada especie de *Weissella* y son usadas como parte de pruebas fenotípicas para identificación de especies (Collins *et al.*, 1993).

W. beninensis es la única especie que se ha reportado como móvil (Padonou *et al.*, 2010); así como también fermentadora de azúcares como cellobiosa, fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, melibiosa, raffinosa, ribosa, sucrosa, trehalosa y xylosa (Fusco *et al.*, 2015)

En base a las características fenotípicas es difícil separar a los miembros del género *Weissella* del género *Leuconostoc* o de lactobacilos heterofermentativos, esto es posible mediante el uso de técnicas taxonómicas moleculares (Fusco *et al.*, 2015).

Las bacterias de este género tienen la propiedad de sintetizar exopolisacáridos (EPS) siendo el dextran el más conocido a partir de hidratos de carbono presentes en la leche, bebidas fermentadas o azúcar ocasionando el deterioro por la aparición de una filancia (formación de hilos mucosos) no deseada (Jay *et al.*, 2005). Estos exopolisacáridos rodean la superficie bacteriana formando una capa externa la cual está constituida por polímeros de monosacáridos (EPS). Los EPS de bacterias lácticas se dividen en homopolisacáridos (HoPS) los cuales están compuestos por un único tipo de monosacárido y en donde hay una única enzima implicado en su síntesis, y los heteropolisacáridos (HePS) que están constituidos por dos o más tipos de monosacáridos, que pueden llevar unidos otras moléculas, para su síntesis y polimerización están implicadas varias enzimas (Aznar *et al.*, 2012).

2.3.3. Ecología

Las bacterias incluidas en el género *Weissella* han sido aisladas de una gran variedad de fuentes, tradicionalmente asociada a comida fermentada (Björkroth *et al.*, 2002). Incluyendo hábitats que van desde el suelo (solo *W. soli*), sedimentos en costas, peces, agua de lagos, plantas, gran variedad de alimentos fermentados, cavidad oral, piel, leche materna, en tracto gastrointestinal y urogenital en humanos y varios animales (Fusco *et al.*, 2015). Asimismo, especies de *Weissella* son comúnmente encontradas en hábitats asociadas al cuerpo de humanos o animales, como en el tracto gastrointestinal o en leche materna de humanos. *W. cibaria* ha sido reportada en muestras fecales de adultos sanos. *W. confusa* se encontró en leche de madres lactantes así como en heces de infantes y de las madres. *Weissella* spp. también se ha encontrado en la microbiota del íleon en lechones (Fusco *et al.*, 2015).

2.3.4. Potencial de *Weissella* sp. como probiótico

Varias cepas de *Weissella* han sido encontradas actuando como probióticos debido principalmente a su actividad antimicrobiana, o para otras aplicaciones en alimentos, clínica e industria cosmética (Abriouel *et al.*, 2015). *W. paramesenteriodes* es una de las especies más predominantes en los vegetales frescos y tiene un papel importante en la fermentación del silaje; *W. halotolerans* y

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

W. viridescens han sido asociadas con la carne y productos cárnicos, así como *W. minor* se ha aislado en máquinas de ordeña (Björkroth *et al.*, 2002).

Recientemente se han observado efectos quimiopreventivos y antitumorales de algunas weissellas (Kwaketal., 2014).

Especies del genero *Weissella* se han identificado en variedad de alimentos fermentados, uno de ellos es un alimento que forma parte importante en la alimentación de Korea: el Kimchi. *Weissella* junto con otras bacterias ácido lácticas son conocidas por suprimir la actividad de enzimas activadoras de la carcinogénesis, tales como azoreductasa, b-glucosidasa y b-glucoronidasa, e inactiva o neutraliza los agentes causantes de cáncer y microbios patógenos (Kwak *et al.*, 2014). El género *Weissella* predomina en la composición de las BAL de este alimento es un 44.4%, *W. koreensis* se identificó en un 27.2% y *W. cibaria* en 8.7% (Park *et al.*, 2014).

En 2007 Srionnual *et al.* encontraron que *W. cibaria* 110 producía una bacteriocina activa contra bacterias Gram positivas, a la que llamaron weissellicin 110, la cual demostró tener actividad antagónica hacia algunas especies de *Lactobacillus* sp., *Weissella* sp. y *Leuconostoc* sp. Para el 2009 estas sustancias tipo bacteriocinas, indicaron que son péptidos de bajo peso molecular incluidas dentro del grupo de bacteriocinas de clase I y II (Vallejo *et al.*, 2009).

Estudios realizados con *W. cibaria* han identificado a esta especie con posible potencial anti cáncer, antiinflamatorio, antibacterial, antifúngico y estimulante del sistema inmune (Kamboj *et al.*, 2015).

2.3.5. *Weissella* sp. y su asociación con cuadros de infección

Cepas de *Weissella* han sido aisladas de muestras clínicas de sangre, piel, heridas infectadas y heces tanto de humanos como de animales. *W. cibaria* se identificó en muestras de orina, de pulmón y sangre de pacientes con bacteremia, la especie que pertenecen a este género se describen como patógenos oportunistas. En animales como la trucha arcoíris se ha descrito a estas bacterias como patógenos emergentes, principalmente *W. ceti* (Fusco *et al.*, 2015).

W. confusa fue aislada de varias muestras clínicas de humanos en casos de infecciones polimicrobiales, anteriormente a esta especie se le consideraba de poca importancia clínica, posteriormente se describió como único agente microbiano en diversas infecciones y asociado con otros agentes bacterianos por lo que esta especie se describió como patógeno oportunista (Fusco *et al.*, 2015). Existen reportes de *W. confusa* como agente causal de endocarditis atípica y severa comprometiendo las válvulas aortica y mitral (Shin, 2006), así como en infecciones sistémicas en mamíferos, en osteomielitis, sepsis posoperatoria y gran cantidad de casos que involucran bacteremia (Fusco *et al.*, 2015).

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

W. ceti se ha descrito recientemente como el agente etiológico de la llamada “weissellosis”, una enfermedad emergente que se ha presentado en granjas acuícolas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) generando septicemia y altas mortalidades (Fusco *et al.*, 2015). Brotes de esta enfermedad se han reportado en granjas comerciales de trucha arcoíris en Estados Unidos, China y Brasil (Fusco *et al.*, 2015).

2.4. WEISSELLOSIS

Es una enfermedad desarrollada en organismos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) causada por la bacteria Gram positiva *Weissella ceti*, descrita por primera vez por Liu y colaboradores en granjas de trucha en China en 2007, quienes describieron brotes de esta enfermedad generando pérdidas del 40% de truchas adulto las cuales presentaron signología septicémica con lesiones hemorrágicas y tras obtener el aislamiento bacteriano realizaron análisis moleculares identificando a una bacteria perteneciente al género *Weissella* diferente de las identificadas dentro del género; posteriormente fue descrita en granjas trutícolas de Brasil (Figueiredo, *et al.* 2012) las cuales reportaron brotes de enfermedad septicémica hemorrágica en truchas adultos y al realizar pruebas de PCR identificaron a la bacteria *Weissella ceti* la cual fue similar genéticamente con la cepa de China; así como también se describió esta enfermedad en los Estados Unidos de Norteamérica (Welch, 2014) en donde identifican a esta bacteria como la responsable de generar los brotes de enfermedad en diferentes granjas. De acuerdo a la literatura, esta se considera una enfermedad relativamente nueva, que únicamente se ha observado en estos países, sin embargo en el año 2015 se observaron casos sospechosos en Michoacán, México.

Considerado como un patógeno rápidamente emergente, se ha determinado que la enfermedad se desarrolla en los meses de verano cuando la temperatura se encuentra cerca de 18 a 20°C; Welch y Good (2013) observaron que la enfermedad disminuye cuando las temperaturas van descendiendo y en los meses de invierno se encuentra ausente, y que afecta principalmente a los peces de tamaño mayor que se encuentran entre .25 y 1 kg.

El mecanismo de diseminación que ha tenido este patógeno en los tres continentes es aún desconocido así como sus reservorios ambientales.

Los signos característicos que se observan durante el desarrollo de la enfermedad son: peces reunidos en la superficie del estanque y en las salidas de agua, letargia y anorexia. Se observan lesiones oculares que incluyen hemorragias, exoftalmia, opacidad corneal y lenticular, hemorragia periocular e intraocular y ruptura corneal, siendo estos signos característicos de la enfermedad, además, de hemorragias eventuales en cerebro y oscurecimiento del cuerpo (Welch, 2014).

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Las lesiones histopatológicas incluyen inflamación retroorbital, ulceración corneal, inflamación granulomatosa en epicardio y miocardio; también se ha llegado a observar inflamación de vasos sanguíneos (Welch, 2014).

2.4.1. Características microbiológicas de *Weissella ceti*

W. ceti forma colonia pequeñas (25 mm), blancas, crece en agar sangre generando actividad a- hemolítica, no se desarrolla en medios bacteriológicos típicos (TSA, BHI). Su aislamiento puede ser de diversos tejidos: bazo, riñón, cerebro. El crecimiento se produce a partir de 15 -18 horas a 30°. Es una bacteria de morfología bacilar gram positiva, de 1.5 um y 0.30 um de diámetro (Welch, 2014).

2.4.2. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la observación de los signos conductuales, signología característica y el aislamiento e identificación del agente etiológico de diferentes órganos de los organismos enfermos.

Los organismos afectados se observan con comportamiento anormal que incluye letargia, anorexia, peces ubicados en la superficie del estanque, exoftalmia bilateral, hemorragia intraocular, hemorragias en hígado y cerebro (Welch, 2014, Shin, 2006).

El aislamiento de *Weissella ceti* de muestra de peces enfermos se detecta utilizando como medio de siembra agar sangre para detectar la actividad hemolítica de la bacteria y observar la formación y coloración de colonias dentro de 15 – 18 horas incubada a 30°C. La morfología bacteriana es cocobacilar, Gram positiva, con una longitud de 1.5 mm y 0.30 mm de diámetro, negativa a la prueba de oxidasa y catalasa, resultando en pruebas bioquímicas una bacteria fermentadora de carbohidratos. Utilizando kits de fermentación de carbohidratos es difícil la identificación de la bacteria pudiendo ser confundida por otra especie del género o con integrantes del género *Leuconostoc* (Welch, 2013 y 2014).

La identificación y confirmación de la especie por medio de secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal, utilizando para su amplificación primers bacterianos universales y uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Welch, 2014, Shin, 2006)

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de especies acuícolas en México es una de las actividades del sector agropecuario más importantes, debido al impacto económico que representa y por su contribución en el sector alimentario de las zonas de producción, que se traduce en un notable desarrollo social.

Dentro del cultivo de especies acuícolas se encuentra la trucha arcoíris, una especie que a pesar de que por volumen se ubica en la octava posición en la producción acuícola general del país, es una de las más importantes económicamente debido a su valor, y que puede comercializarse desde presentación de producto en fresco hasta ser muy utilizada en la pesca deportiva.

Debido a su importancia económica y por considerarse un producto de primera calidad, la trucha arcoíris es una de las especies mejor conocidas del sector piscícola, y gran parte de las enfermedades que la afectan se encuentran bien estudiadas, incluyendo las de etiología bacteriana, parasitaria, viral y fúngica, además de patologías de origen desconocido.

Sin embargo, en los últimos años y asociado al incremento de la producción y las actividades inherentes que han contribuido a su desarrollo, se ha observado un incremento en el número de patologías que afectan a la actividad trutícola, sobre todo las afecciones bacterianas, destacando los procesos sistémicos causados por distintas bacterias Gram positivas que causan enfermedad clínica similar, siendo una de ellas, la *Weisselosis*, una enfermedad emergente de surgimiento relativamente reciente, que ha sido reportado únicamente en truchas de China, Brasil y en los Estados Unidos de Norteamérica. Sin embargo, tomando en cuenta evidencias clínico patológicas y bacteriológicas, obtenidas de muestras colectadas de peces cultivados en la región central de México, es posible que la enfermedad también esté presente en peces del país desde el año 2015.

Debido a lo anterior, es de suma importancia la constancia en la investigación de estas enfermedades que se presentan en los organismos dulceacuícolas para diagnosticarlas oportunamente, dando pie a establecer tratamientos eficaces y de esta manera mantenerlas bajo control, con el fin de evitar pérdidas de organismos y así mejorar la salud de los cultivos en las granjas acuícolas.

El presente proyecto de investigación pretende establecer un diagnóstico de estas enfermedades mediante el uso de diversas técnicas de laboratorio y en lo posible caracterizar el agente causal.

4. HIPÓTESIS

Los cuadros septicémicos observados en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes del estado de Michoacán, México, son causados por la bacteria ácido láctica *Weissella ceti*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar al agente etiológico implicado en el complejo septicémico generado por bacterias Gram positivas causantes de mortalidad en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en granjas de Michoacán, México, y describir las lesiones patológicas generadas en los organismos.

5.2. Objetivos particulares

- Aislar la bacteria ácido láctica *Weissella* sp. de lesiones de truchas arcoíris con signos característicos de enfermedad septicémica
- Realizar la identificación morfológica y bioquímica del agente bacteriano *Weissella* sp.
- Caracterizar genéticamente al agente bacteriano *Weissella ceti*
- Determinar la capacidad bacteriocinogénica de la bacteria *Weissella ceti* frente a agentes bacterianos causantes de patologías en peces
- Describir la histopatología de lesiones en truchas arcoíris afectadas por la bacteria láctica *Weissella ceti*

6. MATERIALES Y MÉTODO:

6.1. Diseño experimental:

Se utilizó un diseño transversal descriptivo haciendo uso de un muestreo de oportunidad calculado el número de muestra con un 90% de confiabilidad y 5% de error (Casal & Mateu, 2003). Se muestrearon un total de 43 organismos adultos de trucha arcoíris obtenidos en el año 2015 y 12 organismos de trucha arcoíris adultos de talla comercial del año 2016 que en ambos casos manifestaron sinología aparente de enfermedad septicémica severa.

6.2. Modelo biológico:

Organismos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con sinología aparente de enfermedad procedentes de granjas acuícolas del Estado de Michoacán, México; las cuales eran peces adultos de tamaño comercial. Se obtuvieron muestras de mucus para estudio parasitológico y muestras estériles de riñón, hígado, bazo, corazón y cerebro para aislamiento bacteriológico.

6.3. Materiales de laboratorio:

Peces. Truchas arcoíris de etapa adulto

Medios de cultivo: Medio Tripticasa de soya (TSA), Medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI), Medio Agar Sangre suplementado con 5% de sangre de ovino, Medio Sal y Manitol, Medio Cloruro de sodio (NaCl) al 5, 6, 6.5 y 7%, y Medio Man, Rogosa & SHarpe (MRS).

Pruebas de identificación bioquímica: kit de tinción Gram, enzima catalasa H₂O₂ al 3%, verde malaquita, enzima citocromo oxidasa, agar de hierro y triple azúcar (TSI), agar de hierro y lisina (LIA), agar de citrato de Simmons (CIT), medio de movilidad, indol y ornitina (MIO); medio triptófano y SH₂ + reactivo de Erlich o Kovac (SIM); medio oxidación y fermentación (OF), caldo nitrofenil-galactopiranósido (ONPG), medio rojo de metilo-voges proskauer y reactivos metilo y alfa naftol-KOH al 40% (RM-VP), agar urea, caldo nitrato.

Carbohidratos: adonitol, arabinosa, celobiosa, dextrosa, dulcitol, galactosa, inositol, lactosa, maltosa, manosa, melibiosa, manitol, rabnosa, salicin, sorbitol, sacarosa, trealosa, xilosa.

Equipo de laboratorio:

Cámara de electroforesis: Mupid-Exu Electrophoresis System

Microcentrifuga

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Termociclador: Multigene Mini Labnet

Transluminador: DNr Bio Imaging System Mini Pro

Viales para PCR: Corning 200 ul

Pipetas

Puntas

Guantes: Ambioderm Nitrilo Soft

Reactivos:

Agarosa

Kit comercial de extracción y purificación de DNA: Wizard® Genomic DNA Purification.

Kit GoTaq Green Master Mix 2x para PCR convencional

Primers específicos para detección de *Weissella ceti*:

Wei06207F (5'–TGATTACCGTGCTGCAACTG–3')

Wei06207R1 (5'–TGAACCAGCCACACCAAATG–3')

TAE 10X y 1X

6.4. Método:

6.4.1. Toma de muestras y aislamiento bacteriano:

En el mes de Agosto de 2015 se informó de un proceso de enfermedad en una granja de engorda de trucha arcoíris ubicada en el Estado de Michoacán, México, la cual cuenta con estanques de concreto tipo *raceway*, el agua que alimenta la granja es procedente de manantial con temperatura constante de 17°C. Los organismos cultivados en la granja fueron importados de Estados Unidos y mantenidos con alimento comercial de acuerdo a la etapa. Los organismos enfermos se encontraban en etapa adulta con una población total de 4,000 organismos.

Los peces enfermos se remitieron al laboratorio en bolsas de plástico con oxígeno para realizar un análisis de diagnóstico sanitario integral.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

En el laboratorio, se identificó y se anotó la talla de cada pez, seguido de esto se examinó la superficie corporal registrando la presencia de anomalías visibles macroscópicamente, evaluando la homogeneidad de la piel, lesiones, melanosis, dilatación abdominal y posibles afecciones oculares como exoftalmia y hemorragias. Una vez realizada la evaluación macroscópica externa se realizó raspado de mucus de piel, branquias y aletas para estudio parasitológico.

Se realizó la necropsia de los peces de acuerdo al manual de Toma y Recolección de Muestras del laboratorio de Sanidad Acuícola del CIESA, obteniendo muestras de órganos internos: cerebro, corazón, hígado, riñón e intestino para cultivo bacteriológico y cultivo celular.

Para el aislamiento bacteriano se realizó la toma de muestra con asa bacteriológica en condiciones asépticas para siembra en medios de cultivo primarios: agar Tripticasa de Soya (TSA), agar infusión cerebro-corazón (BHI), agar McConkey y agar Sangre de ovino. Como medios selectivos se realizó la siembra bacteriana en: agar Cloruro de Sodio (NaCl) al 5%, 6 %y 7%, agar Sal y Manitol, y agar MRS.

Para descartar la presencia de virus como causa de la enfermedad, muestras de riñón y bazo fueron maceradas y el sobrenadante se inóculo en monocapas de células CHSE-214 de 85% de confluencia, en placas de 24 pozos de poliestireno con medio *Minimal Essential Medium* (MEM-Gibco) enriquecido con suero fetal bovino. Las muestras se incubaron a 15°C y diariamente se revisaron durante siete días.

Fragmentos de tejidos de los órganos internos, piel y cerebro fueron colectados en formalina buferizada al 10% para su fijación y posterior procesamiento e imbibición en parafina, para obtener cortes histológicos que fueron teñidos con Hematoxilina – Eosina (H&E) y Gram modificada (Atlas of Fish Histology, 2009).

6.4.2. Identificación fenotípica bacteriana de acuerdo a características morfológicas y bioquímicas:

Los aislados bacterianos obtenidos de los peces afectados se sometieron a las pruebas bioquímicas convencionales para su identificación.

6.4.2.1. Tinción Gram. Esta prueba se realizó para clasificar las bacterias según la pared celular en Gram positivas o Gram negativas y observar la morfología celular de los diferentes géneros: La tinción se realizó de acuerdo a Pérez *et al.* (1987).

6.4.2.2. Tinción de esporas. El objetivo de esta tinción fue determinar la formación de endoesporas de las cepas seleccionadas con el método de Schaeffer y Fulton. Las cepas de *Weissella* no forman endoesporas. Se extendió colonia bacteriana sobre una gota de agua destilada en portaobjetos y se fijó a la llama, posteriormente

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

se aplicó verde malaquita durante 10 minutos, seguido de enjuague, se añadió safranina durante 15 segundos; tiñendo las esporas en color verde.

6.4.2.3. Prueba de la catalasa. Prueba que se utiliza para identificar bacterias que sintetizan la enzima catalasa (MacDadin, 2003). Se tomó una colonia fresca con asa bacteriológica y se colocó sobre portaobjetos con una gota de H₂O₂ 3%. La reacción positiva a esta prueba es el desprendimiento de oxígeno, la formación de burbujas indica la presencia de la enzima catalasa.

6.4.2.4. Prueba de oxidasa. Esta prueba se basa en la identificación de la enzima citocromo oxidasa y por ello las bacterias utilizan oxígeno en el transporte de electrones. La presencia de la enzima citocromo oxidasa genera un cambio de coloración a morado-azul (MacFadin, 2003). Se utilizó papel impregnado de tetrametil-p-difenilamina en donde se colocó con asa bacteriológica muestra bacteriana.

6.4.2.5. Prueba de triple azúcar-hierro y lisina-hierro. Se utilizó el medio de cultivo TSI y LIA. Prueba que se empleó para la diferenciación de enterobacterias, con base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico (TSI). La prueba LIA se utilizó para la diferenciación de especies bacterianas, basado en la decarboxilación / desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico (Koneman, 1997). Se tomó muestra de la colonia con asa bacteriológica y se sembró en medio por picadura. Los tubos se incubaron a 37 °C por 24 horas.

6.4.2.6. Prueba de citrato. El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, esta prueba se utilizó para detectar la enzima citritasa la cual alcaliniza el medio por el CO₂ que se genera produciendo el cambio de color de verde a azul del medio (MacDadin, 2003). Se inoculó el tubo con asa bacteriológica realizando siembra por estría tomando una colonia bacteriana. Una vez realizada la siembra se incubó a 37 °C por 24 horas.

6.4.2.7. Producción de sulfuro, indol, motilidad y ornitina. Para esta prueba se utilizó el medio de cultivo SIM (Sulfuro, Indol, Motilidad) y MIO (Motilidad, Indol, Ornitina) para identificación de enterobacterias.

Sulfuro: Determina la capacidad de ciertas bacterias de liberar ácido sulfhídrico produciendo una reacción visible de color negro.

Indol: Se detecta a partir de la liberación del anillo de indol del triptófano que se encuentra en el medio, tornando de coloración el reactivo.

Motilidad: está dada por los flagelos que presentan algunas bacterias, la cual puede apreciarse al sembrar el medio como una zona turbia más allá de la zona de inoculación; las bacterias sin motilidad solo crecen en la zona de inoculación.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Ornitina: Detecta la presencia de la enzima ornitina descarboxilasa, formando una amina con la consiguiente alcalinidad del medio generando una coloración purpura intenso en el medio (Alvarez y Barajadas, 1981). Se tomó muestra de la colonia con asa bacteriológica y se sembró en medio SIM y MIO por picadura. Los tubos se incubaron en condiciones anaerobias a 37 °C por 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 5 gotas de reactivo Kovacs a cada tubo.

6.4.2.8. Prueba de oxidación-fermentación. Prueba que se ocupa para obtener información acerca de las vías metabólicas que utilizan las bacterias para obtener sus nutrientes y energía. La vía oxidativa utiliza oxígeno, la fermentativa no utiliza oxígeno (MacDadin, 2003). Se inoculo por picadura en dos tubos, tomando colonia bacteriana con asa bacteriológica. Un tubo se cerró de tal forma quedando floja la tapa, al segundo tubo se agregó 1.5 ml de aceite mineral estéril. Se incubo a 37 °C durante 24h.

6.4.2.9. Prueba ONPG. Utilizada para diferenciar microorganismos fermentadores lentos de lactosa que poseen solo la enzima b-D-galactosidasa, de los no fermentadores. Se utilizó un medio conteniendo orto-nitrofenil-galactopiranosido el cual es metabolizado por la enzima generando un compuesto de color amarillo (MacDadin, 2003; Koneman, 1997). Se realizó la siembra con asa bacteriológica a partir de un cultivo puro en solución fisiológica estéril y se agregó reactivo ONPG. Se incubo en condiciones anaerobias a 37 °C por 24 horas.

6.4.2.10. Prueba Rojo de Metilo- Voges Proskauer. Prueba que determina la capacidad de fermentación de la glucosa produciendo productos finales ácidos o neutros.

Rojo de metilo: revela la presencia de productos finales ácidos, el medio del pH descienda a menos de 4.4 generando un cambio de coloración de amarillo a rojo.

Voges Proskauer: evidencia la presencia de productos finales neutros por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio generando un cambio de coloración de amarillo a rojo (MacDadin, 2003). Se inoculo en el caldo RM-VP con asa bacteriológica una colonia del cultivo bacteriano y se incubó a 37 °C por 24-48 horas. Finalizado este periodo se adicionó al tubo RM 5 gotas del revelador rojo de metilo; al tubo VP se adiciono 12 gotas del reactivo A y 5 gotas del reactivo B.

6.4.2.11. Prueba de urea. Prueba que se utiliza para detectar la enzima ureasa, la cual hidroliza la urea contenida en el medio produciendo amoniaco, generando un cambio de color de amarillo a rojo fucsia (MacDadin, 2003; Koneman, 1997). Se inoculo en caldo muestra bacteriana con asa bacteriológica, se incubo a 37 °C por 24 horas.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

6.4.2.12. **Reducción de nitrato.** Se utiliza para determinar si la bacteria puede producir enzimas que reduzcan los nitratos del medio a nitritos. Las reacciones positivas muestran cambio de coloración a rojo intenso. Se inoculó tomando colonia bacteriana con asa bacteriológica y mezclando dentro del caldo. Se incubaron los tubos en condiciones anaerobias a 37 °C por 48 horas; transcurrido el tiempo se agregaron al medio 5 gotas de reactivo "A" (nitritos) y 5 gotas de reactivo "B" (Alvarez y Barajadas, 1981).

6.4.2.13. **Perfil de fermentación de carbohidratos.** Para la formación de ácidos como productos finales de la fermentación, se determinó por medio del sistema de identificación API 20 CHL; se llevó a cabo inoculando muestra de los aislados bacterianos en cada medio de acuerdo a instrucciones del fabricante, incubando los medios bajo condiciones anaerobias a 37 °C durante 48-72 horas.

6.4.3. Identificación genética:

Los aislados fueron incubados en 5 ml de caldo MRS durante toda la noche a 24°C para la extracción total de DNA, utilizando un kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se cuantificó por espectrofotómetro a 260 nm. La muestra de ADN genómico total obtenida desde el cultivo bacteriano se envió a la empresa MacroGen Inc. Corea del Sur para la amplificación por PCR convencional del gen 16S rRNA eubacteriano usando los primers universales 27F (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1490R (5'- ACG GAT ACC TTG TTA CGA GTT-3') y su secuenciación.

La amplificación y secuenciación del locus de *Weissella ceti* (locus WCNC_06207) (GenBank Accession No. ANCA01000000; Ladner *et al.*, 2013) se realizó por PCR convencional con el kit comercial GoTaq Green Master Mix 2x (Promega), se utilizaron los primers especie específicos Wei06207F (5'- TGATTACCGTGCTGCAACTG-3') y Wei06207R1 (5'- TGAACCAGCCACACCAAATG-3') de acuerdo a Snyder *et al.* (2014); se utilizaron las siguientes concentraciones para llevar a cabo el mix reacción a 10 uL: dNTPs: 0.4 uL, Mg: 0.5 uL, WF: 0.4 uL, WR: 0.4 uL, Taq Pol: 0.4 uL, Buffer: 1.8 uL, DNA: 2.0 uL, y Agua Free Nuclease: 4 uL

La amplificación fue corrida en un termociclador (Multigene Mini Labnet) con el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 95 °C durante un periodo de 5 minutos; 30 series de ciclos de 94 °C por 60 s, 58 °C por 60 s y 72 °C por 60 s, con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. El producto de PCR fue analizado en gel de agarosa al 2% por electroforesis y visualizado en transiluminador bajo UV.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

6.4.4. Descripción histopatológica: la descripción de las lesiones microscópicas de los organismos afectados se realizó mediante la interpretación de los cortes histológicos de tejidos de diferentes órganos: cerebro, corazón, hígado, bazo, riñón, intestino y ojo, utilizando un microscopio óptico (Olimpus.) (Atlas of Fish Histology, 2009)

6.4.5. Capacidad bacteriocinogénica. Para determinar la habilidad de inhibición de otros agentes bacterianos se utilizó el método de difusión en agar (Piddock, 1990). Para esto, se sembró en caldo 1.5×10^6 ufc/mL de *E. coli*, *Aeromona hydrophila* y *Streptococcus* sp. como microorganismo indicador, se utilizó 0.1 mL de caldo indicador mezclando uniformemente en 15 ml de agar tibio (~45 °C); el agar fue depositado en placas de Petri y se mantuvo a 4 °C por 1 hora. Las placas se mantuvieron a 37 °C durante 1 hora. Pasado el tiempo en el agar se hicieron pocillos de 6 mm de diámetro, y en cada uno de los pocillos se vierten 25 ul de sobrenadante libre de células y se incubaron a 4 °C durante 2 horas y posteriormente fueron incubados a 37 °C durante 48 horas. La actividad inhibidora se cuantificó midiendo las zonas de inhibición alrededor de los pocillos.

Para la preparación del sobrenadante las bacterias lácticas fueron inoculadas en caldo MRS y fueron incubadas a 37 °C durante 16-18 horas para obtener la máxima producción de bacteriocinas. Después el caldo con los cultivos se centrifugo a 12,000 rpm y a 4 °C durante 20 minutos para obtener el extracto libre de células, el pH se ajustó a 6,2 con NaOH 1N. El sobrenadante fue filtrado con un filtro de 0,22 um de diámetro de poro (Wu, 2004). Los filtrados se liofilizaron antes de su utilización.

7. RESULTADOS

7.1. Toma de muestras y aislamiento bacteriano:

En los 43 organismos muestreados en el año 2015 (muestras A) y en los 12 organismos obtenidos en 2016 (muestras B), no se identificó la presencia de parásitos externos a partir de muestras de raspados de *mucus* de piel, de branquias, aletas, así como tampoco en la inspección de tracto gastrointestinal.

En las pruebas para intentar el aislamiento de agentes virales mediante inoculación en células CHSE-214 no se observó efecto citopático, lo que descarta la presencia de agentes viral en las muestras analizadas.

Se obtuvo crecimiento bacteriano homogéneo en todos los órganos muestreados de donde se intentó el aislamiento en la muestra tomada en 2015 y en la de 2016, a excepción del cerebro en la muestra B (Tabla 7).

No se observó crecimiento de las bacterias en los medios de Agar McConkey y en Agar Sal y Manitol.

En las pruebas de crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas se obtuvo crecimiento a 15, 24, 37 y 42°C por 24 y 48 horas. Únicamente se observó crecimiento a temperatura de 45°C en las muestras B.

En medio suplementado con NaCl se observó desarrollo en concentraciones de 5% y 6%; únicamente las muestras B mostraron crecimiento en una concentración de 6.5%.

Tabla 7. Aislamientos bacterianos en diferentes medios de cultivo y a diferentes temperaturas.

Medio / órgano	TSA	BHI	San gre	McCon key	Sal y manitol	NaCl 5% 6% 6.5 7%	MR S	T °C 15, 24, 37, 42, 45
Muestras A								
Cerebro		-	+	-	-	- , - , - , -	+	-
Corazón	+	+	+	-	-	+ , + , - , -	+	+ , + , + , + , -
Hígado	+	+	+	-	-	+ , + , - , -	+	+ , + , + , + , -
Bazo	+	+	+	-	-	+ , + , - , -	+	+ , + , + , + , -
Riñón	+	+	+	-	-	+ , + , - , -	+	+ , + , + , + , -

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Muestras B								
Cerebro	-	-	-	-	-	- , - , -, -	-	-
Corazón	+	+	+	-	-	+ , + , + , -	+	+ , + , + , + , +
Hígado	+	+	+	-	-	+ , + , + , -	+	+ , + , + , + , +
Bazo	+	+	+	-	-	+ , + , + , -	+	+ , + , + , + , +
Riñón	+	+	+	-	-	+ , + , + , -	+	+ , + , + , + , +

7.2. Identificación fenotípica bacteriana

El desarrollo de colonias bacterianas tanto de las muestras A como de las muestras B en Agar sangre y en Agar MRS fue de forma circular, con superficie lisa, de estructura interna mucoide, mostrando opacidad, con borde entero y de elevación convexa. La coloración observada fue blanquecina, evidenciando actividad a-hemolítica (Figura 4). Únicamente hubo diferencia en el tamaño de las colonias, siendo de 25 – 35 mm para las muestras A y de 30 – 40 mm en las colonias de la muestra B.

7.2.1. Caracterización bioquímica y perfiles de fermentación. A la tinción de Gram se evidenciaron bacterias gram-positivas en donde las muestras A fueron cocobacilos pleomorfos agrupados en cadenas cortas (Figura 3), y las muestras B fueron cocos agrupados en parejas o en pequeñas cadenas (Figura 5). Tanto las muestras A como las B resultaron negativos a las pruebas de oxidasa, catalasa, LIA, CIT, MIO, SIM, ONPG, RM-VP, Urea y Nitrato. Asimismo, ambas muestras mostraron resultados positivos a la prueba bioquímica de TSI en superficie, no formaron gas ni ácido sulfhídrico y con actividad fermentadora (OF). No formaron esporas, no móviles (tabla 8). De acuerdo a los resultados de la prueba de fermentación, en la tabla 9 se muestran los resultados de la fermentación de diferentes azúcares.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Tabla 8. Resultados de pruebas bioquímicas de aislados bacterianos obtenidos de los organismos muestreados.

Prueba	Resultado			
Muestras A				
Gram	+ (cocobacilos pleomorfos)			
Esporas	-			
TSI	-	+	-	-
LIA	-	-	-	-
CIT	-			
MIO	-	-	-	-
SIM	-	-	-	-
OF	-		+	
ONPG	-			
RM	-			
VP	-			
Urea	-			
Nitrato	-			

Prueba	Resultado			
Muestras B				
Gram	+ (diplococos)			
Esporas	-			
TSI	-	+	-	-
LIA	-	-	-	-
CIT	-			
MIO	-	-	-	-
SIM	-	-	-	-
OF	-		+	
ONPG	-			
RM	-			
VP	-			
Urea	-			
Nitrato	-			

TSI: triple azúcar hierro, CIT: citrato; MIO: movilidad, indol, ornitina; SIM: sulfuro-indol- movilidad, OF: oxidación-fermentación; ONPG: nitrofenil-galactopiranosido, RM: rojo de metilo – VP: voges proskauer

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Tabla 9. Resultado de los perfiles de fermentación de carbohidratos de los aislados bacterianos de organismos muestreados.

CH	Hígado	Bazo	Riñón	Crzón	Crbro	Hígado	Bazo	Riñón	Crzón
Muestras A					Muestras B				
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Celobiosa.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrosa	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Manosa.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa.	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México



Figura 3. Medio Agar sangre con desarrollo de colonias bacterianas de *Weissella ceti*, en donde se muestra la hemolisis generada por la bacteria.

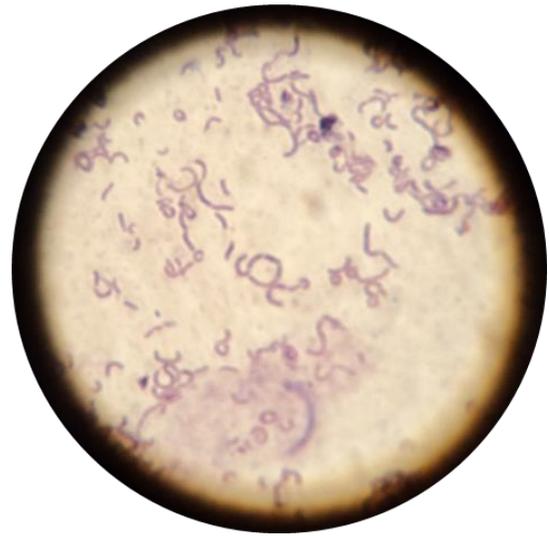


Figura 4. Tinción de Gram de cepas de *W. ceti*, Evidenciando cocobacilos pleomorfos Gram positivos en cadenas.



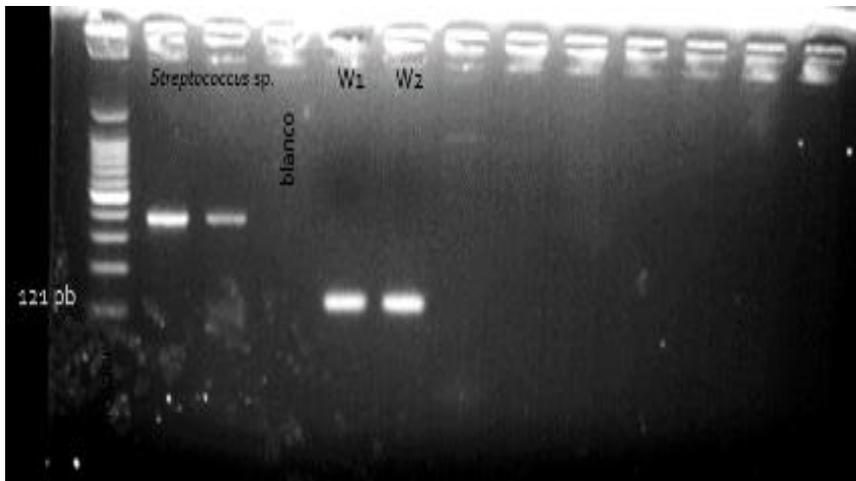
Figura 5. Tinción de Gram de aislados de muestras B. Diplococos Gram positivos formando cadenas cortas.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

7.3. Identificación genética:

De acuerdo a resultados obtenidos en los análisis de las pruebas bioquímicas de las muestras A, se realizaron pruebas de PCR, obteniendo la amplificación de un fragmento de 121 pares de bases (Figura 6), que corresponde a parte del locus de adhesión al colágeno WCNC_06207, identificado como un factor de virulencia de *Weissella ceti*, el cual que no se ha identificado en otras especies de *Weissella*.

Figura 6. Gel de agarosa 2%: amplificación de fragmento correspondiente con la BAL *Weissella ceti*.



7.4. Descripción de lesiones:

Al examen de necropsia se evidenciaron lesiones externas e internas que corresponden a la descripción de Weisellosis en truchas afectadas por *Weissella ceti*.

Entre las lesiones externas más frecuentes de los peces analizados se encontró palidez branquial, exoftalmia unilateral y bilateral, opacidad corneal unilateral o bilateral, hemorragias en ojos y mandíbula así como lesiones hemorrágicas en base de aletas pectorales. En menor presentación se observó ascitis, lesiones erosivas en orificio anal, hemorragias en aletas pectorales y ausencia de aleta dorsal (Figura 7 y 9).

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Lesiones internas: se observó palidez e hipertrofia en corazón, hemorragias difusas en hígado, esplenomegalia, hemorragias en vejiga natatoria y congestión en cerebro (Figura 8 y 10).

Figura 7. Diagrama de barras de lesiones externas observadas con mayor frecuencia en los organismos aparentemente afectados por la enfermedad.

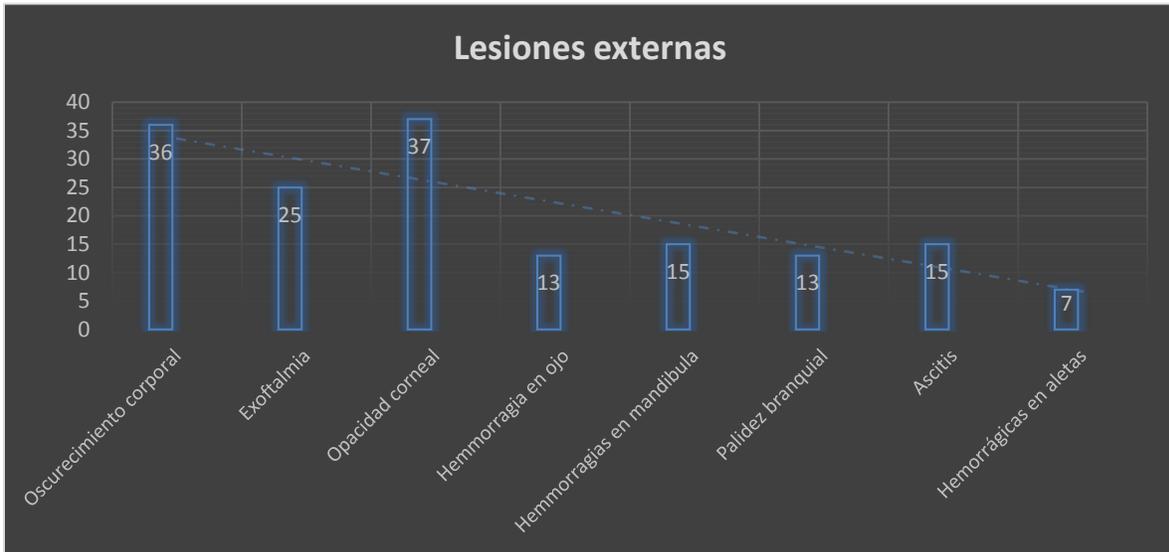
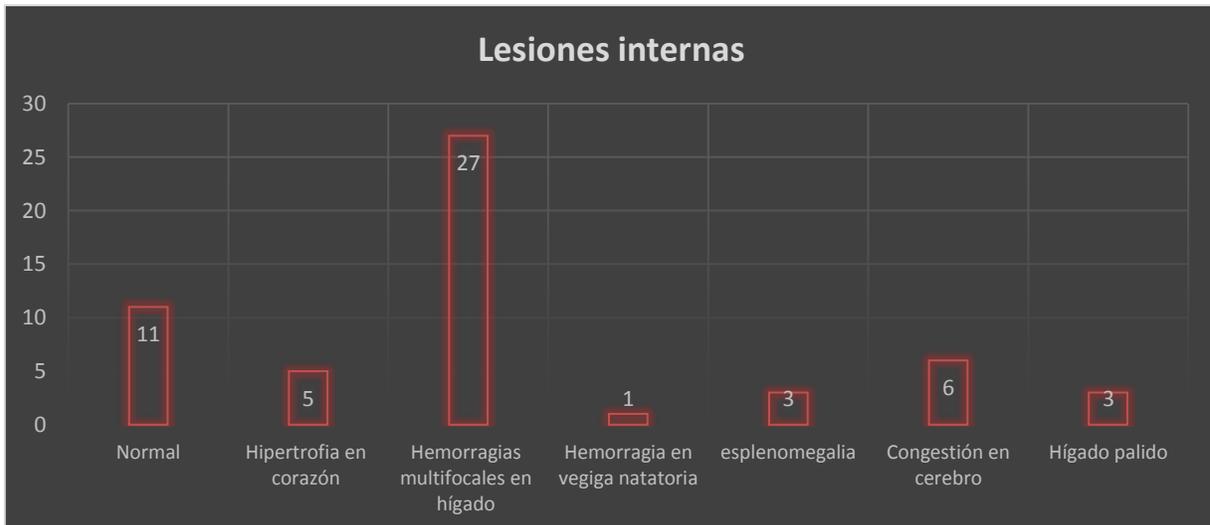


Figura 8. Diagrama de barras de lesiones internas observadas en los organismos afectados.



Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

7.4.1. Descripción histológica de lesiones:

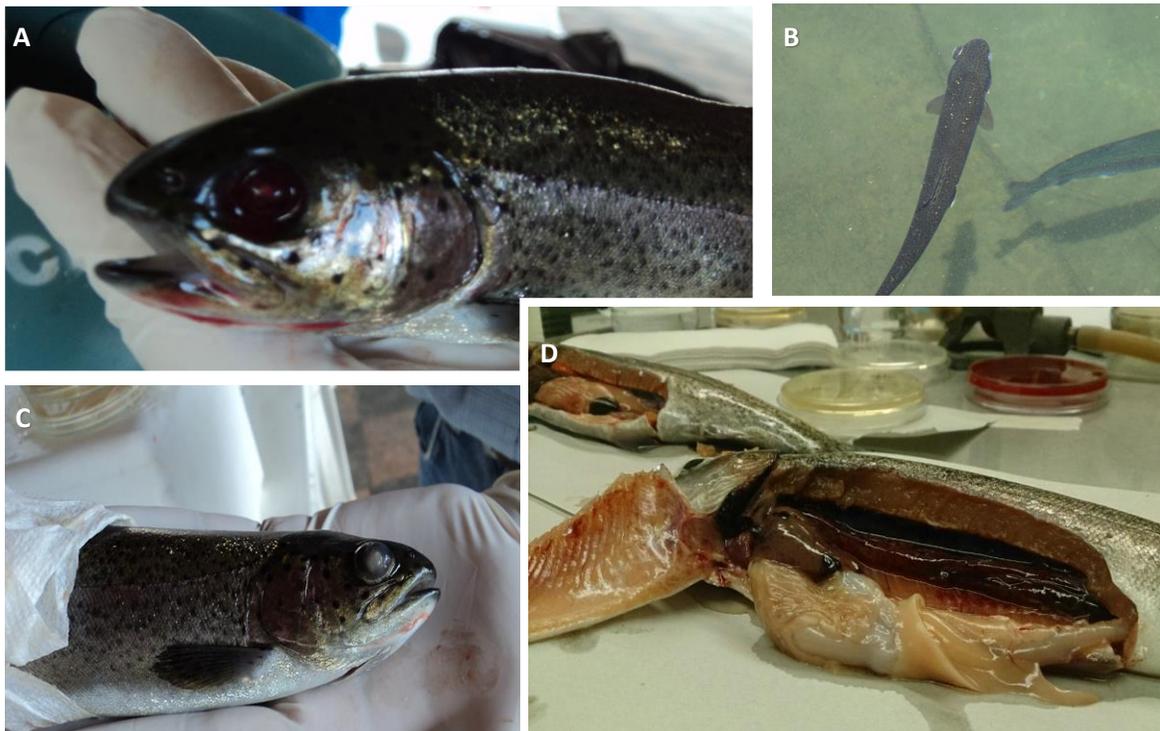
Al examinación histológica de los tejidos de organismos afectados con la enfermedad septicémica se observó hepatitis necrótica multifocal caracterizada por focos de necrosis en todo el tejido hepático, hepatocitos en degeneración y presencia de monocitos dentro de vasos sanguíneos, así como la presencia de bacterias Gram positivas en cadenas en la luz de vasos sanguíneos e infiltración linfocitaria periductal (Figura 10).

En ojo se observó edema y ulceración corneal, encontrándose las fibras corneales separadas por la presencia de edema, aunque no se observó infiltración dentro del nervio óptico ni presencia de células inflamatorias.

En cerebro se observó meningitis linfocitaria y congestión, caracterizada por infiltración de células linfoides entre las meninges, así como gran cantidad de eritrocitos en diferentes zonas de meninges. (Figura 10).

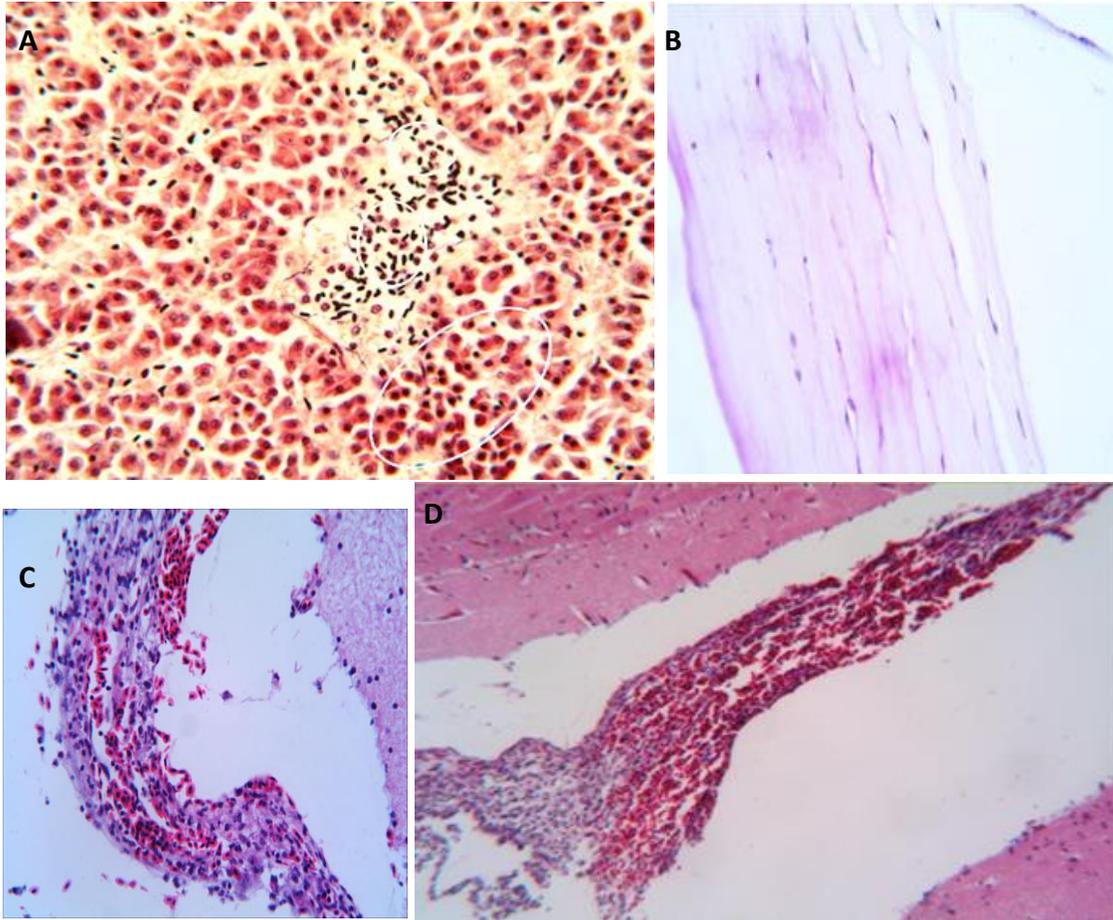
Secciones de branquias, corazón, bazo, riñón y tracto gastrointestinal, no exhibieron cambios histológicos significativos.

Figura 9. Organismos de trucha arcoíris afectados con signos característicos de enfermedad Weissellosis. A) hemorragia en ojo. B) oscurecimiento general del cuerpo. C) exoftalmia y opacidad corneal, e hígado pálido con presencia de hemorragias multifocales.



Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Figura 10. Lesiones histológicas, (A) Hepatitis necrótica multifocal con presencia de bacterias Gram positivas en cadenas y de monocitos en vaso sanguíneo; (B) edema corneal con separación de fibras. (C y D) congestión en cerebro y meningitis.



7.5. Capacidad bacteriocinogénica

La bacteria aislada de cuadros septicémicos en truchas arcoíris procedentes de Michoacán e identificada como *Weissella ceti* no mostro tener efectos inhibitorios o actividad antagónica contra las cepas *Aeromonas* sp., *Streptococcus inniae* y *Escherichia coli* por medio del método de difusión en gel a las 24 ni a las 48 horas (tabla 10). Durante el ensayo no se evidencio un halo de inhibición alrededor de los pocillos que contenían el medio con el extracto libre de células (ELC). Sin embargo, al sustituir el ELC por medio MRS con crecimiento bacteriano de *W. ceti*, se evidencio inhibición contra la cepa *Aeromonas* sp. a las 48 horas (Figura 11).

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Tabla 10. Inhibición de *W. ceti* utilizando el método de difusión en gel contra las cepas prueba.

Medio de prueba	<i>E. coli</i> 24 hrs / 48 hrs	<i>Aeromona</i> sp. 24 hrs / 48 hrs	<i>Streptococcus</i> <i>inniae</i> 24 hrs / 48 hrs
1. Medio TSA	- / -	- / -	- / -
2. Medio TSA semisólido	- / -	- / -	- / -
3. Medio TSA/MRS	- / -	- / -	- / -
4. Medio BHI	- / -	- / -	- / -
5. Medio MH	- / -	- / -	- / -

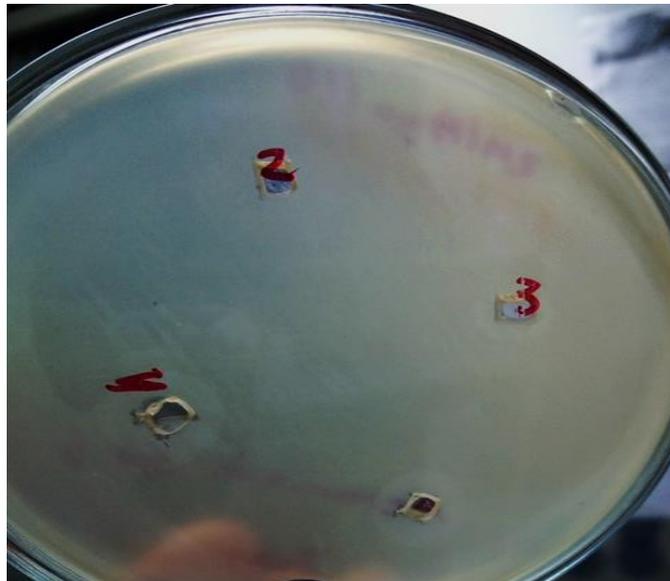


Figura 11. Test de difusión en agar. Halo de inhibición obtenido al inocular caldo MRS con *Weissella ceti*.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

7.6 Artículo enviado

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos en granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México.

Characterization of *Weissella ceti* isolated in septicemic outbreaks in rainbow trout farms (*Oncorhynchus mykiss*) from Mexico.

Jésica Castrejón-Nájera¹ MVZ, Raúl C. Fajardo-Muñoz¹ Ph D, Alex Romero-Zuñiga² Dr, César Ortega-Santana^{1*} Dr. Cs.

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Km 15.5, Carretera Toluca-Atlacomulco, San Cayetano Morelos, Toluca, CP 50200, México. ²Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. Casilla 567.

Correspondencia: César Ortega. cos_mx@hotmail.com; cortegas@uaemex.mx

Resumen

Objetivo. Caracterizar bioquímica y molecularmente a la bacteria *Weissella ceti* obtenida de casos de enfermedad septicémica en granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de la región centro occidente de México. **Materiales y métodos.** Se obtuvieron peces con signos de enfermedad septicémica caracterizados por oscurecimiento y mala condición corporal, exoftalmos y opacidad corneal, de los cuales se intentó el aislamiento en medios de cultivo BHI y agar

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

sangre de ovino. A partir de cultivos puros se hizo la caracterización bioquímica convencional y los análisis moleculares para confirmación de la bacteria y para establecer su filogenia. **Resultados.** Los peces afectados presentaron hemorragias internas multifocales en hígado, riñón, vejiga natatoria y cerebro, y se aislaron bacterias cocobacilares Gram-positivas, que bioquímicamente se caracterizaron como bacterias oxidasa y catalasa negativas, hemolíticas, no móviles, con actividad fermentadora a partir de carbohidratos dextrosa, glucosa, maltosa y trehalosa. Asimismo, las bacterias se confirmaron genéticamente y se caracterizaron en base a estudios comparativos con secuencias genéticas reportadas en bases de datos, lo que confirma su relación genética con secuencias de *W. ceti* que a la fecha únicamente se ha observado como patógeno emergente para la trucha arcoíris de China, Brasil y en los Estados Unidos de Norteamérica. **Conclusiones.** *Weissella ceti* fue confirmada como causa de enfermedad sistémica en truchas de entre 30 a 500 g; aunque esta bacteria ácido láctica se considera agente saprofito, su aparición como causa de enfermedad emergente se relaciona con incremento de la temperatura del agua de cultivo de alrededor de 18°C.

Palabras clave: *Weissella ceti*, trucha, *Oncorhynchus mykiss*, sistémica, weissellosis.

Abstract

Objective. Characterize biochemistry and molecularly the *Weissella ceti* bacterium obtained from cases of septicemic disease in rainbow trout farms (*Oncorhynchus mykiss*) of the central-western region of Mexico. **Materials and methods.** Fish were obtained with signs of septicemic disease characterized by darkening and poor body

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

condition, exophthalmos and corneal opacity, of which isolation was attempted in BHI culture media and sheep blood agar. From the pure cultures, the conventional biochemical characterization and the molecular analysis were done to confirm the bacterium and to establish its phylogeny. **Results.** Affected fishes presented multifocal internal hemorrhages in liver, kidney, swim bladder and brain, and Gram-positive coccobacillary bacteria were isolated, which were biochemically characterized as hemolytic, non-motile, oxidase and catalase negative bacteria, with fermenting activity from carbohydrates, dextrose, glucose, maltose and trehalose. Likewise, the bacteria were genetically confirmed and characterized based on comparative studies with genetic sequences reported in databases, confirming their genetic relationship with sequences of *W. ceti* that to date has only been observed as an emerging pathogen for rainbow trout from China, Brazil and the United States of America. **Conclusions.** *Weissella ceti* was confirmed as a cause of systemic disease in trout of between 30 to 500 g; although this lactic acid bacterium is considered a saprophytic agent, its appearance as a cause of emerging disease is related to an increase in the temperature of the culture water of around 18°C.

Key words: *Weissella ceti*, trout, *Oncorhynchus mykiss*, systemic, weissellosis.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Weissella* son microorganismos Gram-positivos de morfología cocoide o bacilar, catalasa-negativas, no formadoras de esporas, pertenecientes a un grupo taxonómico de bacterias ácido lácticas (LAB) que al fermentar carbohidratos producen ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

acetato; estrechamente relacionados con los géneros *Leuconostoc* y *Oenococcus* (1, 2). A la fecha, se han descrito 19 especies dentro del género *Weissella* (3), obtenidas de un amplio rango de hábitats, desde manantiales, aguas residuales, suelo, carne y pescado, incluso formando parte de la microbiota saludable de cavidades corporales de humanos y animales (3, 4). Se han aislado también de plantas y vegetales, productos fermentados de la industria de panadería y de alimentos tradicionales de Asia y África (4, 5).

Algunas *Weissella* spp. se han utilizado como probióticos y otras aplicaciones en alimentos, clínica y en la industria cosmética (6), incluso se han reportado efectos quimiopreventivos y antitumorales. Sin embargo, otras especies de *Weissella* han sido involucradas en procesos infecciosos como otitis, endocarditis y generando septicemia (7, 8), ostiomielitis post-operatoria e infecciones post-transplante. Únicamente *Weissella confusa* y *Weissella cibaria* se han descrito en muestras clínicas de humanos (9), los cuales se encontraban inmunocomprometidos (7, 8).

En animales, infecciones por *Weissella* spp. han afectado a primates (10), perros y otras especies (4); y recientemente, *W. ceti* fue identificada como causa de mortalidad en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), (11, 12). Desde entonces, la weissellosis es reconocida como una enfermedad emergente que clínicamente se presenta en forma septicémica (13), afectando a peces de todas las edades, principalmente mantenidos a temperatura superior a los 17°C (14).

Hasta este artículo, la weissellosis en trucha arcoíris ha sido reportada únicamente en peces en China (11), Brasil (14) y en los Estados Unidos de Norteamérica (12). En el presente estudio se describe la ocurrencia de un brote infeccioso septicémico

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

en truchas arcoíris cultivadas en México asociado a *W. ceti*; el agente se caracterizó bioquímica y genéticamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Brote. En el segundo semestre de año 2015, durante la realización de muestreos de vigilancia sanitaria en granjas de trucha arcoíris de la región centro-occidente de México, se evidenciaron peces con un cuadro clínico de enfermedad septicémica hemorrágica que al final del brote causó 50% de mortalidad en una población de 20,000 peces con peso de entre 100 a 300 g (tamaño comercial en México). Las truchas se encontraban en estanques circulares y raceways de concreto abastecidos con agua de manantial con temperatura promedio de 17°C.

Necropsia. Se realizó un muestreo dirigido, colectando 10 peces adultos (300 g) que presentaban signos clínicos de enfermedad septicémica y se trasladaron vivos en bolsas plásticas con oxígeno al laboratorio de Sanidad Acuícola de la Universidad Autónoma del estado de México, donde fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia con tricaine methansulfonate MS 222 (250 mg/lit, Sigma México).

Descripción patológica y análisis histológico. Todos los ejemplares fueron examinados macroscópicamente, registrando lesiones externas y documentadas gráficamente, así como alteraciones en órganos internos. Porciones de 1 cm³ de órganos internos (e.g. riñón, hígado y bazo), piel, branquias, ojo, músculo y cerebro

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

fueron colectados y fijados en frascos con formalina buferizada al 10%, para posterior deshidratación con alcoholes e imbibición en parafina usando procedimientos estándar; cada tejido fue seccionado a 5 μ m y teñido con Hematoxilina-Eosina (15). La tinción Gram modificada de McCallum (16) fue realizada para identificar la presencia de bacterias en donde se describieron alteraciones histológicas, bajo un microscopio de luz Olympus BH2.

Análisis bacteriológico. Muestras de riñón, corazón, hígado y cerebro se sembraron por estría en placas de agar infusión cerebro corazón (BHI) y agar sangre suplementado con 5% de sangre de ovino que se incubaron a 28°C por 72 horas. Colonias representativas del morfotipo dominante se seleccionaron y se sembraron en nuevas placas BHI para obtener cultivos puros que se almacenaron a -80°C en caldo BHI con 15% de glicerol y tubos Criobille (AES Laboratories).

Caracterización bioquímica. La caracterización fenotípica de las bacterias se realizó mediante análisis que incluyeron morfología de colonias, tinción de Gram, citocromo oxidasa y reacción de catalasa (3% de H₂O₂). Las pruebas bioquímicas básicas mediante inoculación por punción para pruebas de triple azúcar hierro (TSI), utilización de lisina (LIA) y citrato (CIT), movilidad, producción de indol y oxidación (MIO), producción de sulfuro e indol. También se incluyó el ensayo de oxidación y fermentación (OF), nitrofenil-galactopiranosido (ONPG), prueba roja de Metilo-Voges Proskauer (RM-VP) y urea. Además, se determinó el perfil de fermentación de carbohidratos de los aislados para la formación de ácidos usando el sistema API 20 CH. Se analizó el crecimiento bacteriano en medio TSA con 5%, 6% y 7% de cloruro de sodio (NaCl) y usando agares Man, Rogosa & Sharpe (MRS), McConkey

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

y sal y manitol. También se incluyeron pruebas de crecimiento bajo condiciones aeróbicas a 15, 24, 37 y 42 °C por 48 h en TSA.

Secuencia de 16S rRNA y análisis filogenético. El DNA total fue extraído de cultivos bacterianos puros usando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification según instrucciones del fabricante. El 16S rRNA se amplificó por PCR utilizando primers universales 27F (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1490R (5'- ACG GAT ACC TTG TTA CGA GTT-3') (16). El producto de amplificación fue enviado a secuenciar a Macrogen Inc. (Corea). La secuencia de la amplificación del gen 16S rRNA fue analizada usando Basic local alignment search tool (BLAST <http://blast.ncbi.nih.gov/>), al compararse contra secuencias de cepas tipo de especies de *Weissella*, inicialmente mediante alineamiento de secuencias usando ClustalW y luego mediante un test de filogenia con el método de Neighbor-Joining y una estimación de la divergencia evolutiva entre secuencias usando el programa MEGA 6.0 (17). En los últimos dos ensayos se utilizó el método de Bootstrapping con 1000 replicaciones. El análisis de secuencias del 16S de cepas de *Weissella* se realizó considerando 20 secuencias nucleotídicas del GenBank más la secuencia de interés Tabla 1. Todas las secuencias en el set de datos final se ajustaron a 722 posiciones de nucleótidos.

La amplificación y secuenciación del locus de *Weissella ceti* (locus WCNC_06207) (GenBank Accession No. ANCA01000000; (18) se realizó mediante PCR convencional, con el kit comercial GoTaq Green Master Mix 2x (Promega), utilizando primers especie específicos Wei06207F (5'-TGATTACCGTGCTGCAACTG-3') y Wei06207R1 (5'-TGAACCAGCCACACCAAATG-3') de acuerdo a Snyder *et al.*

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

(2014) (19). Las concentraciones del mix fueron 12,5 UI GoTaq, 1uL primer Forward 10uM, 1uL primer Reverse 10uM, 2 uL DNA y 8,5 uL Agua Free Nuclease. La amplificación fue corrida en termociclador MULTIGENE OPTIMAX, Labnet international Inc. USA, con el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min; 30 series de ciclos de 94 °C por 60 s, 58°C por 60 s y 72°C por 60 s, con una extensión final a 72°C durante 5 min.

RESULTADOS

Descripción clínica. El brote de enfermedad septicémica hemorrágica alcanzo 60% de mortalidad en peces desde 100 g o mayores. Todos los peces afectados colectados mostraron letargia, nado errático, oscurecimiento corporal, exoftalmia uni y/o bilateral, hemorragias y opacidad corneal uni o bilateral. Quince peces manifestaron distención abdominal, mientras que otros 15 con manifestación más crónica mostraron caquexia severa, erosión de aleta caudal y ruptura ocular (Figura 1); algunos con hemorragias en base de aletas pectorales, erosión de orificio anal.



Figura 1. Truchas arcoíris afectadas por weisellosis crónica, con erosión de aleta caudal, caquexia, ruptura ocular.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

A la necropsia los peces afectados presentaron distinto grado de anemia (palidez branquial y de órganos internos), ascitis, corazón cubierto de membranas de aspecto grumoso e hipertrófico; hígado de coloración irregular con congestión difusa y hemorragias. En menor frecuencia se observó esplenomegalia; hemorragias en vejiga natatoria y en superficie parietal del músculo costal (Figura 2); congestión en cerebro. No se observaron hemorragias entre tejido muscular.



Figura 2. Trucha arcoíris afectada por weisellosis. Exoftalmia, branquias pálidas; hígado de aspecto irregular con hemorragias y congestión; hemorragias en vejiga natatoria, ovario y músculo costal; corazón cubierto de membranas de material purulento.

Aislamiento bacteriano. Se obtuvieron 20 aislados (5 de cerebro, 5 de riñón, 5 de hígado y 5 corazón) fenotípicamente homogéneos como bacterias cocobacilares grampositivas irregulares, en pares o formando cadenas cortas; en placa de agar sangre formaron colonias pequeñas de 25-30 mm de diámetro, color blanco, circulares, lisas, ligeramente convexas y con actividad α color $\square\square\square\square\square$ (Tabla 2). Al final se escogió un aislado de cada órgano para estudios posteriores.

Caracterización bioquímica. Las bacterias resultaron negativas a las pruebas de oxidasa, catalasa, LIA, CIT, MIO, SIM, ONPG, RM-VP y Urea; con resultados positivos a la prueba de TSI en superficie, sin formación de gas ni ácido sulfhídrico

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

y con actividad fermentadora (OF), no formadora de esporas. Fermentadora de: dextrosa, glucosa, maltosa y trehalosa.

Histopatología. Las principales lesiones se caracterizaron por panoftalmítis granulomatosa severa, edema corneal generado por separación de fibras del estroma y hemorragia en coroides. En hígado se observó hepatitis necrótica multifocal con hepatocitos en degeneración y presencia de bacterias Gram positivas en cadena dentro del tejido afectado y en la luz de vasos sanguíneos; infiltración linfocitaria periductal y hemorragia. En cerebro se observó meningitis y congestión, encontrándose gran cantidad de células leucocitarias y eritrocitos infiltrados entre las meninges. Miocarditis y epicarditis granulomatosa.

Análisis molecular. Los productos de PCR amplificaron fragmentos de un tamaño de 121 pares de bases (no mostrado), correspondiente al locus de adhesión al colágeno WCNC_06207, considerado un factor de virulencia de *Weissella ceti*. Una secuencia de 930 nt fue confirmada como parte del gen 16S rRNA de *Weissella ceti* mediante el alineamiento básico local de NCBI con un 98% de identidad. El test de filogenia por Neighbor joining agrupó la secuencia obtenida en el clado de las secuencias 16S rRNA de *Weissella ceti* cepa 1119-1A-09 y de *Weissella sp.* cepa HZ-K, con 99% de identidad para el test de bootstrap con 1000 replicados (**Figura 3**). El análisis de divergencia evolutiva indica que la menor divergencia se da con estas mismas secuencias (*Weissella ceti* y *Weissella sp.*) dándose el menor número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias (No mostrado).

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

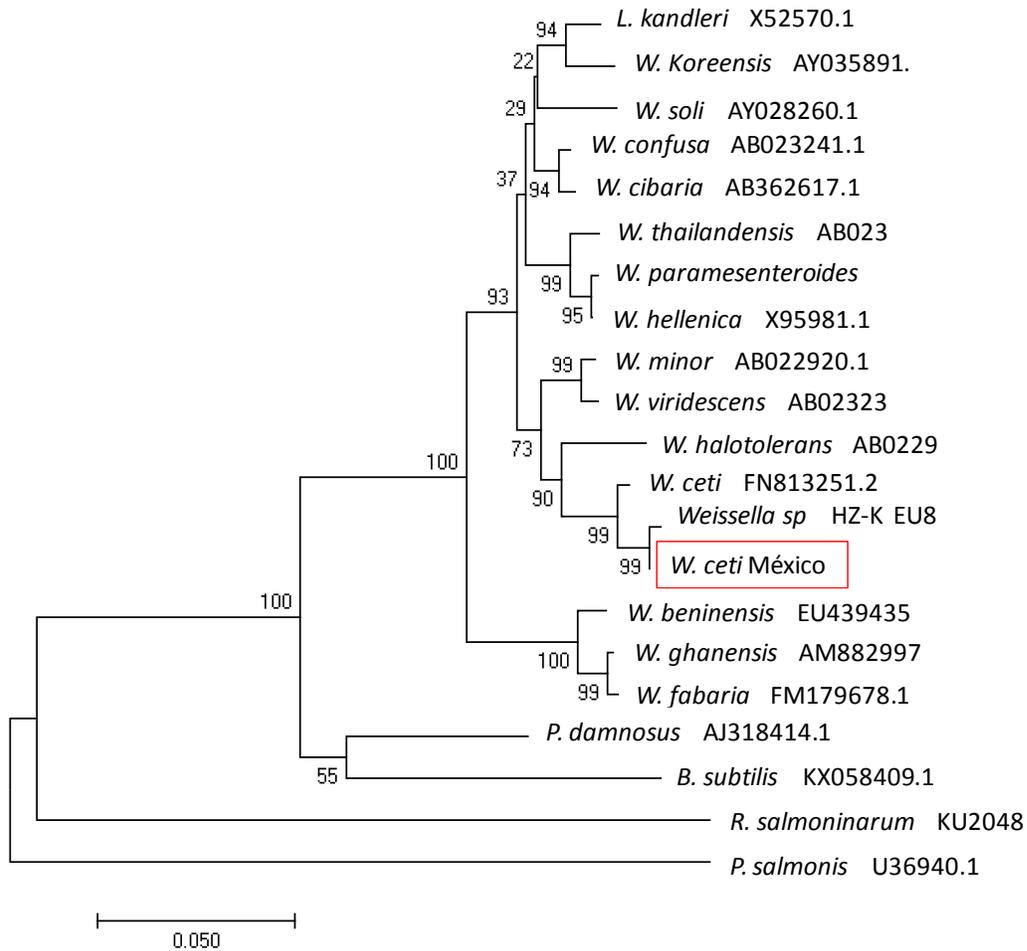


Figure 3. Evolutionary relationships of taxa. Análisis evolutivo de *Weissella ceti*, deducido utilizando el método Neighbor-Joining (20). Las distancias evolutivas se calcularon por el método de máxima verosimilitud compuesta (21). Se muestra el número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias. El análisis involucró 21 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 722 posiciones en el conjunto de datos final.

DISCUSIÓN

El género *Weissella* incluye a 19 especies de bacterias gram-positivas, heterofermentativas que forman parte de la microflora normal de humanos y animales, incluyendo peces. Únicamente las especies *W. confusa*, *W. cibaria*, y *W. viridescens* han sido aisladas de casos clínicos en humanos; mientras que *W. ceti* es un patógeno emergente para la trucha arcoíris (11, 12, 14).

El análisis patológico realizado a los peces afectados por esta enfermedad septicémica registrada en centro-occidente de México, así como los estudios bioquímicos y moleculares realizados a las bacterias aisladas confirman la presencia de *W. ceti* en el país, patógeno oportunista que previamente, únicamente ha sido identificado causando brotes de enfermedad septicémica en forma natural en truchas arcoíris de China (11), Brasil (14) y en los Estados Unidos de Norteamérica (12).

En la trucha arcoíris, además de *W. ceti* otras bacterias ácido lácticas (BAL), tales como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Carnobacterium*, también causan enfermedad con cuadros clínicos muy parecidos, por lo que el diagnóstico requiere de una confirmación definitiva (22). En algunas de estas patologías, el incremento de la temperatura del agua de cultivo a más de 17°C se considera factor determinante en la presentación (14, 21). En los casos descritos en este trabajo la temperatura del agua de cultivo se ubicó entre 16.5 a 17°C. Las altas temperaturas en trucha arcoíris se asocian con brotes de enfermedad bacteriana por incremento del crecimiento de bacterias saprofitas y/o la relación con estrés en los peces.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Las bacterias obtenidas de peces de México mostraron ser fenotípicamente homogéneos, y en general similares con los aislados de China (11), de Brasil (14) y de Norteamérica (12), en cuanto a crecimiento en diferentes medios de cultivo y su descripción fenotípica. En los tres países donde previamente se ha reportado la enfermedad, las cepas han mostrado alta similitud (23).

La descripción histológica de lesiones en casos de weissellosis es escasa; de acuerdo con Welch y Good (2013) (12) Good *et al.* (2016) (24) se incluyen lesiones en ojo como ulceración corneal, hemorragias, inflamación granulomatosa, miocarditis, vasculitis, meningoencefalitis y hemorragia en cerebro; los peces afectados en México han presentado lesiones similares, además de hemorragias en hígado y hepatitis necrótica. Los hallazgos de lesiones cerebrales son similares a los reportados por Figueiredo *et al.* (2012) (14) y por Welch y Good (2013) (12), lo cual evidencia que la cepa patógena de *Weissella ceti* puede causar una infección en donde el órgano blanco es el cerebro; y de acuerdo a la localización de la infección se puede dificultar el tratamiento con antimicrobianos (25).

Mediante el uso de la técnica de PCR, usando los primers específicos Wei06207F y Wei06207R1 (19), se pudo identificar la presencia de la bacteria *Weissella ceti* en peces mexicanos con signología de enfermedad septicémica, amplificando un fragmento de 121 pb, identificado como locus único de la proteína de adhesión a colágeno de *W. ceti* (18), caracterizada como factor de virulencia, lo cual es un indicio de la patogenicidad de esta cepa.

El análisis filogenético de la cepa mexicana *W. ceti*, utilizando la secuencia del gen 16S rRNA, la ubica en estrecha relación con la cepa *W. ceti* aislada de ballenas

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

(10), teniendo un 99% de similitud; en este sentido, aunque las cepas de *W. ceti* previamente observadas en China, Brasil y USA guardaron alta similitud en 16S rRNA, no se ha observado ninguna relación epidemiológica entre ellas.

Para nuestro conocimiento, estos han sido los primeros casos de weissellosis en México. Tomando en consideración que *W. ceti* es un microorganismo frecuentemente obtenido de un amplio número de ambientes y productos, es posible que su expresión clínica sea producto del cambio e incremento de temperatura, tal como se ha descrito en aquellos lugares donde la enfermedad ha ocurrido. Sin embargo, otro factor asociado podría ser el ingreso de animales desde otro lugar en donde la enfermedad previamente se ha presentado. En este sentido, la bacteria pudo haber ingresado desde hace varios años sin manifestarse clínicamente hasta ahora que las condiciones ambientales le fueron adecuadas. De manera extraoficial, se sabe que cerca del 80% de huevos de trucha arcoíris necesarios para poblar las granjas del país se importan de USA (26), aunque no ingresan huevos de China ni de Brazil.

La patogénesis de esta enfermedad se encuentra escasamente descrita y se conoce poco acerca de los mecanismos de diseminación de la bacteria. Probablemente los factores de virulencia descritos por Ladner *et al.*, (2013) (18) pueden contribuir a evadir la respuesta inmune de los peces aunado a las condiciones ambientales, principalmente la temperatura (12, 14). Tomando en consideración que la actividad piscícola con la trucha arcoíris se encuentra en franco desarrollo en el país, es de esperar que la enfermedad pueda diseminarse; por lo

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

que se requiere mejorar las actividades de prevención, control y diagnóstico para disminuir el impacto de esta enfermedad emergente a la piscicultura del país.

REFERENCIAS

1. Collins, M D, Samelis J, Metaxopoulos J, Wallbanks S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J Applied Bacteriol* 1993; 75: 595–603.
2. Salminen S, Wright A, Ouwehand A. Lactic acid bacteria. Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker Inc, Estados Unidos de America. 2004. Pp: 11–18.
3. Fusco V, Quero MQ, Cho GS, Kabisch J, Meske D, Neve H, Bockelmann W, Franz P. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Front Microbiol* 2015; 6: 1–22.
4. Björkroth JK, Schillinger U, Geisen R, Weiss R, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 141–148.
5. Dworkin M, Falkow S, Rosemberg E, Heinz SK, Stackebrandt E. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Volumen 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer Science, 2nd edition, Singapore. 2006.
6. Abriouel H, Lavilla L, Casado MC, Pérez MB, Kabisch J, Pichner R, Cho, GS, Neve H, Fusco V, Franz CP, Gálvez A, Benomar N. The controversial nature of

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

- the *Weissella* genus: technological and functional aspects versus whole genome analysis-based pathogenic potential for their application in food and health. *Front Microbiol* 2015; 6: 1197: 1–14.
7. Shin JH, Kim D, Kim HR, Kim DS, Kook JK, Lee JN. Severe infective endocarditis of native valves caused by *Weissella confusa* detected incidentally on echocardiography. *J. Infect* 2007; 54: 149–151.
 8. Lee MR, Huang YT, Liao CH, Lai CC, Lee PI, Hsueh PR. Bacteraemia caused by *Weissella confusa* at a university hospital in Taiwan, 1997–2007. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1226–1231.
 9. Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2578–2585.
 10. Vela AI, Fernandez A, De Quiros YB, Herraiz P, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF. *Weissella ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Mesoplodon bidens*). *Int J Syst Evol Microbiol* 2011; 61: 2758–2762.
 11. Liu JY, Li AH, Ji C, Yang WM. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Vet Microbiol* 2009; 136: 314–320.
 12. Welch TJ, Good CM. Mortality associated with *Weissellosis* (*Weissella* sp.) in USA farmed rainbow trout: potential for control by vaccination. *Aquaculture* 2013; 388: 122–127.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

13. Austin B, Austin DA. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Springer, Switzerland. 2016. Pp: 27–34.
14. Figueiredo CP, Costa FA, Leal CG, Carvalho-Castro GA, Leite RC. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. Vet Microbiol 2012; 156: 359–366.
15. Fernando CH, Furtado JI, Gussev AV, Hanek G, Kakong SA. Methods for the study of freshwater fish parasites, 1st edn. University of Waterloo, Biology series, 1972. Pp 76.
16. Fredriksson NJ, Hermansson M, Wilén BM. The Choice of PCR Primers Has Great Impact on Assessments of Bacterial Community Diversity and Dynamics in a Wastewater Treatment Plant. PLoS ONE 2013; 8: 10 e76431. doi:10.1371/journal.pone.0076431
17. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013; 30: 2725-2729.
18. Ladner JT, Welch TJ, Whitehouse CA, Palacios GF. Genome sequence of *Weissella ceti* NC36, an emerging pathogen of farmed rainbow trout in the United States. Genome Announc. 2013; 1 (1): e00187-12.
19. Snyder AK, Hinshaw JM, Welch TJ. Diagnostic tools for rapid detection and quantification of *Weissella ceti* NC36 infections in rainbow trout. Letters in Applied Microbiol 2014; 60: 103–110.
20. Fairfax MR, Lephart PR, Salimnia H. *Weissella confusa*: problems with identification of an opportunistic pathogen that has been found in fermented foods and proposed as a probiotic. Front Microbiol 2014; 5: 1–5

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

21. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 2004; 101:11030-11035.
22. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39:783–791.
23. Costa FA, Leal CA, Schuenker ND, Leite RC, Figueiredo HC. Characterization of *Weissella ceti* infections in Brazilian rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farms and development of an oil-adjuvanted vaccine. *J Fish Dis* 2014; 1–8.
24. Good C, May T, Crouse C, Summerfelt S, Welch TJ. Assessing the impact of swimming exercise and the relative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and Atlantic salmon *Salmo salar* L. following injection challenge with *Weissella ceti*. *J Fish Dis* 2016; 39: 1387–1391
25. Black WD, Ferguson HW, Byrne P, Claxton MJ. Pharmacokinetic and tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout following bolus intravenous administration. *J Vet Pharmacol Therapeutics* 1991; 14: 351–358.

Agradecimientos. Este trabajo fue realizado bajo financiamiento del Proyecto de Investigación: “**Caracterización bioquímica y molecular de *Streptococcus spp* obtenidas de trucha arcoíris**”, de la Universidad Autónoma del Estado de México.

8. DISCUSION GENERAL

Durante los últimos años la industria acuícola de México ha adquirido un gran impulso, convirtiéndose dentro del sector pecuario en una actividad económica redituable y como una verdadera opción para contribuir a la seguridad alimentaria de los sectores rurales en donde se desarrolla. Pese a que en los últimos 10 años el cultivo de trucha en México ha mostrado una tasa media de crecimiento de 0.49% anual, se espera que en corto plazo este nivel de producción se incremente notablemente, asociado a apoyos gubernamentales y al uso de nuevas tecnologías e intensificando la actividad.

Aun cuando por volumen la trucha arcoíris se posiciona en el lugar 18 de la producción pesquera del país, por valor económico se ubica en el séptimo lugar (SAGARPA, 2014), lo que la convierte en una de las especies que más contribuyen a la acuicultura del país. Sin embargo, es de esperar que al igual que en otras actividades pecuarias, la intensificación de la actividad se acompañe de una mayor incidencia de enfermedades, las cuales representan uno de los principales obstáculos para el éxito en la piscicultura, en donde el cultivo de la trucha arcoíris requiere alta atención ya que es una especie altamente susceptible.

En la última década, a nivel mundial el cultivo de la trucha arcoíris se ha visto afectada por una serie de enfermedades causadas por bacterias lácticas Gram positivas que se presentan de una forma septicémica, siendo una de estas, la Weissellosis, causada por *Weissella ceti*. A esta fecha, la enfermedad ha sido reportada únicamente en China (Liu *et al.*, 2007), Brasil (Figueiredo, *et al.* 2012) y en los Estados Unidos de Norteamérica (Welch, 2014). Sin embargo, la signología clínica y la mortalidad observada en los peces afectados provenientes de un Estado de la región centro occidente de la república mexicana se corresponden con lo descrito en estos países (Liu *et al.*, 2007, Figueiredo, *et al.* 2012, Welch, 2014).

Basados en los diferentes estudios realizados en el presente trabajo, es factible asegurar que esta enfermedad septicémica también está presente en México a partir del año 2015, ya que previo a ese año, en el país no se han tenido registros de la presencia de alguna enfermedad de características similares.

Para desarrollar este trabajo se tuvo acceso a dos muestreos obtenidos de una sola granja de truchas de la región centro occidente de México; aunque las muestras correspondieron a diferente año, en ambos casos se confirmó a *W. ceti* como la causa de la enfermedad septicémica. Las muestras fueron sometidas a un estudio de diagnóstico sanitario integral, y no se observaron daños o lesiones asociados a la acción de parásitos o agente viral.

Durante los estudios de caracterización de las bacterias, se descartó la probable acción de otros agentes bacterianos mediante el uso de diferentes procesos microbiológicos que confirman a *W. ceti* como el agente causal. Se confirmó la característica termófila de la bacteria, que puede desarrollarse a temperaturas de

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

entre 42 – 43°C a diferencia de la mayoría de otras bacterias lácticas que se desarrollan en una temperatura ideal que suele ir de 30°C a los 35°, y a excepción de *Streptococcus thermophilus* que incluso puede desarrollarse a los 45°C, o las especies del género *Thermobacterium* y *Lactobacillus* que se desarrollan a temperaturas por encima de 40°C (Heineman, 1920); sin embargo, las bacterias en estudio no se desarrollaron a temperaturas superiores a los 45°C.

Asimismo, se determinó la capacidad de nuestra bacteria por sobrevivir en medios salinos de 6 y 6.5 % de NaCl, lo cual concuerda con Brooks (2014) y Austin y Austin (2016), que indican que estas pruebas son discriminatorias para *W. ceti* de otras bacterias Gram positivas debido a que la mayoría de los otros microorganismos son incapaces de prosperar en ambientes con muy baja actividad hídrica y mueren, ya que generalmente crecen en ausencia de solutos añadidos (microorganismos no halofitos).

Austin y Austin (2016) identifican a *Weissella ceti* como una bacteria Gram positiva anaerobia facultativa, a lo cual nuestro resultado es concordante ya que debido a la tinción realizada y al resultado negativo de las pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa se comprueba la ausencia de estas enzimas respiratorias en la bacteria.

Aunado a lo anterior, y de acuerdo con Brooks (2014), las especies del género *Weissella* no sintetizan compuestos porfirínicos como el citocromo c, el cual es necesario en la respiración; y es por ello que las colonias que forman este tipo de bacterias son de color blanco, lo cual se pudo observar al obtener cultivos bacterianos puros sobre las placas de agar sangre y agar MRS. Estas características bacterianas vuelven a la bacteria demandante de gran cantidad de factores nutritivos y es por ello que el tamaño de las colonias de *W. ceti* son tan pequeñas: 25 – 35 mm, de este modo también se acuerda con Welch (2014) quien obtuvo resultados parecidos en el desarrollo de colonia. Sin embargo, nuestros hallazgos son discordantes con este último autor, quien reporta la imposibilidad de *Weissella* de desarrollarse en los medio TSA y BHI, en los cuales nosotros obtuvimos el aislamiento primario; así mismo, en otros estudios se ha reportado el crecimiento de estas bacterias en los medios mencionados, pudiendo existir algún error en lo reportado ya que estos medios son utilizado para propósitos generales, pues favorecen el desarrollo y el aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos y estrictos (Koneman, 1997).

De acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas de fermentación de carbohidratos se concuerda con Vela *et al.* (2011), Figueiredo *et al.* (2012) y Fusco *et al.* (2015), que reportaron a *Weissella ceti* como una bacteria con actividad fermentadora, productora de ácido a partir de glucosa, maltosa y trehalosa, pero no de adonitol, arabinosa, celobiosa, dulcitol, galactosa, lactosa ni de salicin, obteniendo resultados correspondientes con estos, a excepción del carbohidrato dextrosa debido a que no hay datos de este; sin embargo, no coincide con lo reportado por Salminen *et al.* (2004) quien enuncia que las BAL verdaderas

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

generalmente producen ácido de galactosa; siendo esta la característica que diferencia a *W. ceti* de las otras dentro del género.

El obtener el desarrollo de la colonia bacteriana en medio MRS coincide con lo descrito por Marth (2001), ya que este en un medio que evidencia el crecimiento de BAL al contener peptona, glucosa, sorbitán, magnesio y acetato, así como también es un medio que discrimina a bacterias Gram negativas. Sin embargo en este medio no se desarrollan todas las BAL, es un medio adecuado para Lactobacilos y especies del género *Weissella*. De este modo se comprueba que *Weissella ceti* es una bacteria fermentadora perteneciente a las bacterias lácticas y de acuerdo a Klander y Weiss (1992) es clasificada como heterofermentativa por lo que sus productos finales son ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico.

Austin y Austin (2016) describen a *W. ceti* como una bacteria hemolítica; tras la siembra en agar sangre de ovino, se determinó la capacidad alfa hemolítica de los aislados, relacionando esta con la patogenicidad de las cepas, capaces de destruir los eritrocitos. Sin embargo, esta característica también se puede observar en otras bacterias gram-positivas como *Streptococcus* sp., *Lactococcus garviae* y *Vagococcus* (Ringo y Gatesoupe, 1998, Fusco *et al.*, 2015) las cuales también pueden afectar los cultivos de trucha arcoíris, y se encuentran clasificadas dentro del grupo de bacterias lácticas pudiendo llegar a confundirse, sin embargo las características morfológicas, el desarrollo de colonias bacterianas en diferentes medios sólidos, los resultado de pruebas bioquímicas y el perfil de fermentación de carbohidratos (Heineman, 1920), son características que orientan a la identificación de *W. ceti*.

Los peces presentaron los típicos signos clínicos de una enfermedad asociada a un proceso septicémico por bacterias Gram positivas. El aislamiento de *W. ceti* a partir de hígado, bazo, riñón, corazón y cerebro de peces con signos de enfermedad confirman la naturaleza septicémica del agente etiológico, diseminado a través del torrente sanguíneo, con capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y afectar al cerebro, que induce la manifestación de signos nerviosos como son la apatía e incoordinación, observados en las etapas avanzadas de la enfermedad.

Las bacterias del género *Weissella* se consideran habitantes normales de superficies y cavidades de animales, y en general se utilizan ampliamente en la industria alimentaria como preservadores de vegetales y carne fermentada, en la elaboración de quesos y principalmente en enlatados (Björkroth *et al.*, 2014, Fusco *et al.*, 2015). Sin embargo, las infecciones generadas por bacterias del género *Weissella* principalmente *W. confusa* han sido reportadas en pacientes humanos inmuno-comprometidos (Kamboj, 2015); pero *W. ceti* es la única especie del género que ha sido reportada afectando peces. Figueiredo *et al.* (2009) demostraron el potencial patógeno de *W. ceti* como agente primario causante de enfermedad en truchas arcoíris. Considerando que este género forma parte de la microbiota normal del sistema gastrointestinal en peces (Kamboj, 2015), puede resultar un factor de

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

riesgo en la presentación de la enfermedad y una probable vía de entrada al organismo generando consecuentemente la septicemia.

En este sentido, la presentación de la enfermedad en truchas arcoíris de granjas de Michoacán se desarrolló en organismos aparentemente sanos; sin embargo es probable que los peces se encontraran bajo condiciones de estrés crónico, en las cuales los animales en apariencia no muestran alguna anormalidad, pero en realidad se encuentra en un estado de agotamiento orgánico, con constante liberación de cortisol que finalmente induce a inmunodepresión y predisposición a infecciones secundarias (Francis-Flويد, 1991).

Durante nuestra investigación, en la granja se registraron los factores fisicoquímicos del agua encontrándose valores acordes para el desarrollo de la trucha arcoíris, sin varianzas significativas, manteniéndose dentro del rango óptimo las concentraciones de oxígeno y temperatura del agua. La presentación de la enfermedad y mortalidad de organismos se registró en los meses en donde la temperatura alcanza valores altos, correspondiéndose con lo reportado en los casos de enfermedad ocurridos en Brasil y en los Estados Unidos (Figueiredo *et al.*, 2012; Welch y Good 2013).

En relación a lo anterior, los casos de weissellosis reportados en la literatura han sido asociados a incrementos superiores a 17°C de temperatura (Liu *et al.*, 2007, Figueiredo, *et al.* 2012, Welch, 2014). La trucha arcoíris es una especie de agua fría, que idealmente debe cultivarse a menos de esa temperatura ya que puede inducir situaciones de estrés y afectar la calidad del agua. En este caso, los peces analizados se encontraban en condiciones de cultivo en promedio de 18°C, por lo que la temperatura se ajusta a lo descrito por otros autores. Inclusive, Figueiredo, *et al.* (2012), demostraron que la enfermedad puede ser recurrente; que la bacteria permanece latente en los meses de otoño e invierno, y que la enfermedad volvió a aparecer en primavera-verano, cuando la temperatura se incrementó. En nuestra investigación, hemos tomado dos muestras, de distinto año; en el segundo muestreo los responsables de la granja sospecharon de otra enfermedad, sin embargo confirmamos que se trata también de *W. Ceti*, que ha permanecido en la granja y se recrudece en el periodo de verano.

En nuestros resultados existe cierta discrepancia en los hallazgos descritos a la necropsia con otros estudios debido a que no se encontraron cambios significativos en corazón de los organismos afectados como se describe en los estudios de Welch y Good (2013) y Marancik *et al.* (2013), así como también existe discordancia entre los hallazgos en tejido óptico. Las hemorragias encontradas en cerebro coinciden con lo reportado en los brotes de Carolina del Norte (Welch y Good 2013) sugiriendo que este es un órgano blanco en la infección por *Weissella ceti*. Tomando en consideración que esta es una patología relativamente reciente, se requiere realizar más estudios para caracterizar adecuadamente las lesiones macroscópicas y microscópicas que se presentan durante una infección de este agente.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

De acuerdo con Shoemaker *et al.* (2002) las bacterias Gram positivas cuentan con determinados factores derivados de su propio metabolismo que les confieren la capacidad de dañar células y evadir el sistema inmune, como lo es la capsula. En el caso de bacterias perteneciente al género *Weissella* que carecen de cápsula su pared celular además de contar con peptidoglicanos específicos (Björkroth *et al.*, 2014) presentan exopolisacáridos (EPS) (Aznar *et al.*, 2012); estos EPS en las bacterias les permiten formar un *biofilm* que les brinda protección frente a determinadas enzimas liberadas o presentes en el tracto digestivo, que le pudieran conferir a *W. ceti* la capacidad para evadir células del sistema inmune. El dextran es un EPS generado por bacterias del género *Weissella* (Bjorkroth *et al.*, 2014, Nacher, 2015); es un polisacárido formado por moléculas de glucosa y por sus efectos anticoagulantes es utilizado para evitar trombosis, pero en cantidades mayores es responsable de hemorragias, signo que fue observado en los peces afectados por esta bacteria. Aunado a lo anterior, el dextran disminuye la extravasación de linfocitos/células de defensa, al haber proliferación bacteriana en el organismo de los peces, existiría la presencia de este EPS en cantidades considerables lo cual contribuye a la evasión de la respuesta inmune.

En nuestro estudio, *Weissella ceti* se identificó genéticamente desde los aislados de peces enfermos procedentes de Michoacán con signología de enfermedad septicémica por medio de la técnica de PCR, utilizando primers específicos Wei06207F y Wei06207R1, concordando con lo reportado por Snyder *et al.* (2014), dirigido a una proteína de adhesión a colágeno (Ladner *et al.*, 2013), considerado como un factor de virulencia de esta bacteria, siendo esto un indicio que contribuye a la patogenicidad de esta cepa ya que este tipo de adhesinas son moléculas de superficie bacteriana que se unen a las células o a su matriz extracelular (Brook, 2014), en este caso específicamente al colágeno y con ello es capaz de resistir la fagocitosis.

En cuanto a la signología observada, las hemorragias multifocales en los organismos enfermos se deben a la extravasación de sangre que provoca la bacteria por su capacidad hemolítica y por la producción de EPS bacterianos, lesionando al endotelio vascular con la consiguiente aparición de hemorragias y petequias en la superficie de diversos órganos, principalmente en aquellos que están más irrigados, como la región perianal, bucal y aletas (Prieta y cols., 1993) y órganos como el hígado, el cual es muy susceptible por ser un órgano de detoxicación de endógenos y mantiene fluido lento de sangre (Roberts, 2001).

El existir hemorragia dentro del organismo de los peces enfermos se genera una alteración en la velocidad circulatoria, haciendo que esta disminuya y haya estancamiento de sangre, hemoconcentración y por ultimo hay un gasto cardiaco deficiente, produciendo la muerte (Trigo, 2004). Esto concuerda con los hallazgos en la necropsia, ya que el corazón de varios peces se encontraba hipertrofiado, principalmente en los peces con hemorragias en hígado, como respuesta a la demanda funcional del organismo.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Las pruebas de capacidad bacteriocinogénica en agar demostraron que la cepa *W. ceti* aislada de peces mexicanos no tiene la capacidad de producir bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento de otros agentes bacterianos, de acuerdo a la literatura no existen reportes para esta especie, solo existen datos de producción de bacteriocinas dentro de este género y es por *Weissella cibaria*.

Sin embargo la presencia de un halo de inhibición en agar utilizando como organismo indicador a *Aeromonas hydrophila* y al sustituir el extracto libre de células por medio MRS con cultivo de *W. ceti* indican que esta bacteria si es capaz de inhibir a otros microorganismos; sin embargo, esto probablemente se debe a la propiedad de la bacteria de generar diferentes tipos de ácidos (ácido láctico, propiónico, acético y CO₂), ya que según Fernandez *et al.* (2014) y Trigo (2004) estos ácidos pueden atravesar membranas celulares y disociarse en el citoplasma, acidificando así el medio e interviniendo con funciones celulares y generar una desestabilización de componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo de esta forma con la viabilidad celular.

Si bien el aislamiento y la demostración como agente Gram positivo es relativamente sencillo y rápido, incluso durante un brote de enfermedad, en la práctica, la identificación de esta bacteria en peces afectados es complicada debido a que la signología observada en los organismos afectados puede llegar a confundirse con otras bacterias del género *Streptococcus*, *Lactococcus* o *Carnobacterium* que a su vez son Gram positivas. Inclusive erróneamente puede llegar a ser identificada en laboratorio por medio de test fenotípicos y bioquímicos como bacterias tipo *Leuconostoc*.

Debido a lo anterior, para su identificación precisa es necesario el uso de técnicas moleculares utilizando el gen 16S rRNA o genes específicos. En este caso, la confirmación definitiva de *W. ceti* se logró a través de la amplificación de un fragmento de 121 pb que corresponde a la adhesina a fibras de colágeno (WCNC: 06207). Sin embargo, para futuras investigaciones con esta bacteria obtenida en México, se habrán de realizar estudios de filogenia y tipificación, así como pruebas de patogenicidad y de susceptibilidad a antibióticos.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo a la presentación clínica, a las lesiones macroscópicas e histológicas, así como a los resultados de las pruebas de cultivo bacteriano y bioquímicas y su análisis molecular, se identifica plenamente la presencia y acción de *Weissella ceti* como causa de enfermedad en los peces analizados procedentes de Michoacán.

Según la prueba de producción bacteriocinogénica no se identificó la producción en la cepa mexicana de bacteriocinas. Sin embargo, el efecto de inhibición evidenciado por el método de difusión en gel, probablemente fue generado por efecto de los ácidos producidos.

La presentación de la enfermedad producida por la cepa mexicana de *W. ceti* concuerda con lo descrito en literatura, tanto en signos clínicos como en lesiones macro e histológicas.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de filogenia, de patogenicidad y de susceptibilidad a antibióticos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriouel, H., Lavilla L., Casado, M.M.C, Pérez, M.B., Kabisch, J., Pichner, R., Cho, G.S., Neve, H., Fusco, V., Franz, C.M.A.P., Gálvez, A., Benomar, N., 2015. The controversial nature of the *Weissella* genus: technological and functional aspects versus whole genome analysis-based pathogenic potential for their application in food and health. *Frontiers in Microbiology*. 6,1197: 1–14.
- Acedo, E., Zúñiga, M., Pérez G. (2006): Taxonomía de bacterias ácido lácticas. Fundamentos biológicos, procesos y biotecnología de las bacterias lácticas, Vol. 1.
- Agudelo, L. N. (2013). Estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos.
- Armendariz, S.N. 2009. Evaluación del desempeño productivo de una línea genética seleccionada de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultivada en dos sistemas intensivos. Universidad Autonoma Metropolitana, Iztapalapa, México.
- Arredondo, F.J.L. 1996. Estado actual y perspectivas de la acuicultura en México. *ContactoS* (1): 28–38.
- Arregui, M.L. 2013. El cultivo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Ed. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid, España.
- Austin, B.; Austin, D. A., 2016. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Springer, Switzerland. : 27–34.
- Aznar, R., Dueñas, M.T., Jiménez, R., López, P., Ruas-Madiedo, P. 2012. Exopolisacáridos de bacterias lácticas ¿me quieren o no me quieren?. *Red Española de Bacterias Lácticas*. <http://redbal.iata.csic.es>.
- Bergueys Manual, (1957).
- Björkroth, J. K., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, R., Hoste, B., Holzappel, W. H., Korkeala, H. J. & Vandamme, P. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 141–148.
- Björkroth, J., Holzappel, W.H., 2006. “Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*, in *The Prokaryotes*, eds M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, E. Stackebrandt (New York, Springer) , 267–319.
- Björkroth, J., Dicks, L.M.T., Endo, A., 2014. The genus *Weissella* in *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. Edited by W.H. Holzappel and B.J.B. Wood. John Wiley & Sons, 417–425.
- Black, W.D., Ferguson, H.W., Byrne, P., Claxton, M.J., 1991. Pharmacokinetic and tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout following bolus

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 14, 351–358.

Brooks, F.G. 2014. LANGE. Microbiología medica Jawetz, Melnick y Adelberg, 26^a ed. McGraw-Hill, Sao Paulo, Brasil.

Caballero, C. Y. (2014). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein.

Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 595–603.

CONAPESCA 2001: Manual de enfermedades de Peces, (3): 1-14.

Costa, F.A., Leal, C.A., Schuenker, N.D., Leite, R.C., Figueiredo, H.C., 2014. Characterization of *Weissella ceti* infections in Brazilian rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farms and development of an oil-adjuvanted vaccine. *Journal of Fish Diseases*: 1–8.

Desamparados A. M. (2012). Aplicación de nuevas tecnologías para el Diseño y desarrollo de productos de Dorada (*Sparus aurata*) procedente de acuicultura. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosemberg, E., Heinz, S. K., Stackebrandt, E., 2006. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Volumen 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Springer Science, 3rd edition, Singapore.

Fairfax, M.R., Lephart, P.R., Salimnia, H., 2014. *Weissella confusa*: problems with identification of an opportunistic pathogen that has been found in fermented foods and proposed as a probiotic. *Frontiers in Microbiology*, 5: 1–5

FAO 2005: Visión general del sector acuícola nacional – México.

FAO 2016: Anuario de estadísticas de pesca y acuicultura de la FAO 2014.

Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.

Fernández KJ, Chanci IC, Wilches L, Cardona JA. 2014. Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Revista Biosalud* 2014; 13 (1): 45–61.

Figueiredo, H.C.P., Costa, F.A.A., Leal, C.A.G., Carvalho-Castro, G.A., Leite, R.C., 2012. *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. *Veterinary Microbiology*, 156: 359–366.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Francis-Flويد, R. 1991. Stress: it's role in fish disease. AGRIS. <http://www.nal.usda.gov>

Fusco, V., Quero, M. Q., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W. & Franz, C. M. A. P. 2015. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–22.

García, J. 2007. Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. Tesis electrónica, RIA-UAEH. <http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10742/Identificacion%20de%20bacterias.pdf?sequence=1>

García, M.D., Gallego, A.I., Espinoza, O.A., García, M.A., Arriaga, J.C.M. 2013. Desarrollo de la producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el Centro de México. *Revista AquaTIC*, 38, 46–56.

Gervasio, E. A. 2012. Determinación de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas identificadas como *Weissella* sp. Colección de Tesis Electrónicas "TESIUAMI", <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=15774&docs=UAMI15774.pdf>

Good, C., May, T., Crouse, C., Summerfelt, S., Welch, T.J. 2016. Assessing the impact of swimming exercise and the relative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and Atlantic salmon *Salmo salar* L. following injection challenge with *Weissella ceti*. *Journal of Fish Diseases*, 39, 1387–1391

Gutiérrez-Yurrita, P.J. 1999. La acuicultura en México: I. Época prehispánica y colonial. *Biología informa* (29): 1–7.

Guzmaán-Hernandez, C., Garduño M. M., Mendoza, V. R. 2013. Truticultura y el excursionista en áreas rurales. *El Periplo Sustentable*, (24) 99-123.

Heineman, P.G. 1920. Orla-Jensen's Classification of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* (3): 143–155.

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7ª ed. Springer, New York.

Kamboj, K., Vasquez, A., Balada-Llasat, J.M. 2015. Identification and significance of *Weissella* species infections. *Front. Microbiol.* 6: 1204.

Koneman E.W. (1997). *The Enterobacteriaceae in Diagnostic Microbiology*. 5ª. Edición, Washington Square: Lippincott – Raven Publishers: 173–203.

Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. 6ª ed. Ed. Médica Panamericana SA. Buenos Aires.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

- König, H. y Fröhlich, J., (2009). Lactic Acid Bacteria in Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3–6.
- Kwak, S.H., Cho, Y.M., Noh, G.M., Om, A.S., 2014. Cancer Preventive Potential of Kimchi Lactic Acid Bacteria. *Journal of Cancer Prevention*, 19, 253–258.
- Ladner, J.T., Welch, T.J., Whitehouse, C.A., Palacios, G.F., 2013. Genome sequence of *Weissella ceti* NC36, an emerging pathogen of farmed rainbow trout in the United States. *Genome Announc.* 1, e00187-12.
- Lee, M.R., Huang, Y.T., Liao, C.H., Lai, C.C., Lee, P.I., Hsueh, P.R., 2011. Bacteraemia caused by *Weissella confusa* at a university hospital in Taiwan, 1997–2007. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1226–1231.
- Liu, J.Y., Li, A.H., Ji, C., Yang, W.M., 2009. First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology* 136, 314–320.
- MacFadin, (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3ed, Panamericana, Argentina.
- Marancik, D.P., Welch, T.J., Leeds, T.D., Wiens, G.D. 2013. Acute Mortality, Bacterial Load, and Pathology of Select Lines of Adult Rainbow Trout Challenged with *Weissella* sp. NC36. *Journal of Aquatic Animal Health* 25: 230–236.
- Marth, H.E., Steele, L. 2001. Applied dairy microbiology. Second edition. Ed. Marcel Dekker, INC. New York, EEUU.
- Michel, C., Nougayrede, P., Eldar, A., Sochon, E., de Kinkelin, P. 1997. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Diseases of Aquatic Organisms* 30: 199–208.
- Mondragón, P. S., Escalante, M. P., Osuna, C. J., Ibarra, J. V., Morlett, C. J., Aguilar, G. C., Rodríguez, H. R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicaciones en alimentos. *Investigación y ciencia*, 21, 64–70.
- Monroy, D. M. C., Castro, B. T., Fernández, P. F., Mayorga, R. L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas.
- Moreira Do Santos, WL. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria. España.
- Nacher, V.M. 2015. Dextranos de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos: caracterización y aplicaciones. Tesis doctoral Universidad de Valencia, España.
- Noga, E.J. 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. 2nd ed. Office. Iowa, USA. 183–210.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Norzagaray, M., Muñoz, P., Sánchez, L., Capurro, L., Llánes, O. 2012. Acuicultura: estado actual y retos de la investigación en México. *AquaTIC*, 37: 20–25.

Olvera, G.M., Serrano, M.C., Quirasco, M. 2015. Detección de Proteínas con actividad antibacteriana producidas por Bacterias Ácido Lácticas. *BioTecnología*, 9,1, 25–40.

Ortiz, B.M. 2006. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo.

Parra, R. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8, 93–102.

Piddock, L.J.V. (1990): Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacterol.* 68, 307–318.

Platas R.D.E., Vilaboa, A.J. 2014. La acuicultura mexicana: potencialidad, retos y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 8: 1065–1071.

Reviriego, C. (2009). “*Lactococcus lactis*” productores de pediocina pa-1 y enterococcus aislados de leche materna como agentes bioconservantes en queso. Universidad Complutense de Madrid.

Ringo, E. y Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160, 177–203.

Roberts, J.R., Shepherd J.C. 1980. Enfermedades de la Trucha y del Salmon. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Roberts, R.J. 2001. *Fish Pathology*, Ed. W. B. Saunders 4th Edition. London: 12–96.

SAGARPA 2017.
<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC0004-04.aspx>

Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A. 2004: Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., 3rd ed. New York, U.S.A: 11–18

Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberón, J., Dirzo, R., Llorente, J., Halffter, J., González, R., March, I., Mohar, A., Anta, S., De la Maza, J. (2009): Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 1ra ed, CONABIO, México: 33–35, 46–49.

Shin, J. H., Kim, D., Kim, H. R., Kim, D. S., Kook, J. K., Lee, J. N. 2007. Severe infective endocarditis of native valves caused by *Weissella confusa* detected incidentally on echocardiography. *J.Infect.* 54, 149–151.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Shoemaker, W.C., Ayres, S.M., Grenvik, A.G., Holbrook, P.R. 2002. Tratado de Medicina Crítica y Terapia Intensiva. Medica Panamericana, 4ta ed. Madrid, España: 604–

Snyder, A.K., Hinshaw, J.M., Welch, T.J. 2014. Diagnostic tools for rapid detection and quantification of *Weissella ceti* NC36 infections in rainbow trout. Letters in Applied Microbiology 60,103–110.

Stiles, M. y Holzapfel, W. 1996. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology 36:1–29.

Svetoslav, D. t., Vaz-Velho M., Gibbs P. (2004). Comparison of two methods for purification of plantaricin st31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* st31. Brazilian Journal of Microbiology 35: 157–160.

Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Trigo, T.F.J. 2004. Patología general veterinaria. 4ta, ed. UNAM, DF, México

Vallejo M., N. Olivera, C. Sequeiros, E. Marguet. 2009. Actividad antilisteria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos. Analecta Veterinaria 29(2): 19-23

Vásquez S, Suarez H, Zapata S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por Bacterias ácido Lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición 36 (1): 64–71.

Vela, A.I., Fernandez, A., De Quiros, Y.B., Herraiz, P., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., 2011. *Weissella ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Mesoplodon bidens*). Int J Syst Evol Microbiol 61, 2758–2762.

Vendrell D, Balcázar J.L, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Gironés O, Múzquiz JL. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases. 29: 177–198.

Walter, J., Hertel, C., Tannock, G.W., Lis, C.M., Munro, K., Hammes, W.P., (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2578–2585.

Caracterización de *Weissella ceti* aislada en brotes septicémicos de granjas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de México

Welch, T.J. and Good, C.M. (2013) Mortality associated with Weissellosis (*Weissella* sp.) in USA farmed rainbow trout: potential for control by vaccination. *Aquaculture* 388, 122–127.

Welch, T., Marancik, D., Good, Christopher. 2014. Weissellosis:1–10.

Wu, C. W., Yin, L. J., Jiang, S. T. (2004): Purification and Characterization of Bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *J. Agric. Food Chem.* 52, 114–1151.jensen