



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**“CARACTERIZACIÓN POBLACIONAL DE LA MICROBIOTA BACTERIANA EN TILAPIA
CULTIVADA (*Oreochromis niloticus*)”**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

ROCIO PARRA LACA

Tutor:

Elizabeth Loza Rubio Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI, INIFAP)/Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Comité Tutor:

Gary García Espinosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Carolina Tafalla Piñeiro Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-España).

Ciudad Universitaria, CD. MX., NOVIEMBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mi familia quienes han sido mi apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida.

Agradecimientos

A CONACyT por el apoyo otorgado con la beca No. 391616 2014-2018.

A la Dra. Elizabeth Loza Rubio, el Dr. Gary García Espinosa y la Dra. Carolina Tafalla Piñeiro por su apoyo.

A la Dra. Laura Hernández Andrade por sus enseñanzas y apoyo.

A la Dra. Edith Rojas Anaya y al M. en C. Rodrigo Jesús Barrón Rodríguez por su apoyo y asesoría.

Al Dr. Moisés Cortés Cruz del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y a todo el personal técnico.

A la M.V.Z. Ana Lilia del Monte Rodríguez, Alberto Jiménez Saavedra y Catalina Tufiño Loza por todas sus enseñanzas y apoyo técnico en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

A María Mercedes González Gómez por su apoyo como técnico de laboratorio.

Al Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Morelos por el apoyo logístico y campo para la adquisición de muestras.

A mis compañeros de laboratorio: Ana Lilia del Monte Rodríguez, Malva Danaé Pérez Gerardo, Magda Limón González, Gustavo Carbajal Silva e Israel Daniel Ricardo González por su apoyo y alegrías compartidas.

私の人生に特別な輝きを与えるために来た人であり、この目標を達成するために私をいつでもやる気にさせたあかり。

Resumen

La descripción de la microbiota de la tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758, se basa principalmente en la biota del sistema digestivo debido al interés comercial, sin embargo, un medio acuático es un ecosistema con factores bióticos que interactúan entre sí y son variables que pueden presentar desequilibrios, incluida la microbiota asociada a los peces. Es por ello que el objetivo del presente estudio fue describir la microbiota bacteriana que se encuentra en tilapia aparentemente sana de cultivo, comparando las técnicas de pruebas descriptivas y taxonómicas de bacteriología clásicas, que permiten el cultivo de organismos para estudios posteriores, y con secuenciación masiva (NGS-Next Generation Sequencing), por medio de la descripción de la biodiversidad utilizando índices de diversidad en diferentes niveles taxonómicos. El microbioma bacteriano de *O. niloticus* está mayoritariamente representado por los Phyla Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes. Tanto por aislamiento bacteriológico como por NGS el Phylum dominante es Proteobacteria. En la composición estructural del microbioma bacteriano de *O. niloticus* el mayor porcentaje está representado por organismos con asociaciones ecológicas benéficas para el hospedador, tales como: *Acinetobacter johnsonii*, *Nodularia spaherocarpa*, *Shewanella*, *Rhodomonas*, *Paracoccus* y diversas especies de Actinomicetales, entre otras. Las especies patógenas para *O. niloticus* más representadas son *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas caviae* y *Flavobacterium*. También se encontraron bacterias de interés en inocuidad acuícola tales como: *Serratia marcescens*, *Salmonella entérica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas putida* entre otras.

La presente caracterización es una referencia que permite dar un enfoque ecosistémico al estudio de los cultivos acuícolas que en un futuro pudiera contribuir a dirigir acciones preventivas o de tratamiento de enfermedades, de manera particular a cada granja de estudio, favoreciendo una práctica sanitaria especializada.

Palabras clave: microbiota, tilapia nilótica, *Oreochromis niloticus*, secuenciación masiva.

Abstract

The description of the microbiota of tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758, is based mainly on the biota of the digestive system due to commercial interest, however, an aquatic environment is an ecosystem with biotic factors that interact with each other, and are variables that can present imbalances, including the microbiota associated with fish, so the objective of this study was to describe the bacterial microbiota found in apparently healthy farmed tilapia, comparing the techniques of descriptive and taxonomic tests of classical bacteriology, which allow the culture of organisms for later studies, and massive sequencing (NGS-Next Generation Sequencing), through the description of biodiversity using diversity indices at different taxonomic levels. The bacterial microbiome of *O. niloticus* is represented mainly by the Phyla Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes. The dominant Phylum by both bacteriological isolation and NGS, is Proteobacteria. In the structural composition of the bacterial microbiome of *O. niloticus*, the highest percentage is represented by organisms with beneficial ecological associations for the host, such as: *Acinetobacter johnsonii*, *Nodularia spaherocarpa*, *Shewanella*, *Rhodomonas*, *Paracoccus* and various species of Actinomycetales, among others. The most represented pathogenic species for *O. niloticus* are: *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas caviae* and *Flavobacterium*. Bacteria of interest in aquaculture safety were also found, such as: *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Clostridium perfringens* and *Pseudomonas putida*, among others.

This characterization is a reference that allows an ecosystemic approach for the study of aquaculture and in the future could contribute to direct preventive actions or treatment of diseases, in a specific way for each farm, favoring a specialized sanitary practice.

Key words: microbiome, Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, massive sequencing.

CUADRO DE CONTENIDO

RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
LISTA DE CUADROS	XV
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVO GENERAL	9
<i>Objetivos Particulares</i>	9
REVISIÓN DE LA LITERATURA Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS	15
SITIO DE ESTUDIO.....	15
ORGANISMOS DE ESTUDIO.....	16
NECROPSIA Y OBTENCIÓN DE TEJIDOS.....	16
MÉTODO GENERAL DE CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS CLÁSICOS, SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) Y VALIDACIÓN DE ESPECIES.....	18
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR BACTERIOLOGÍA CLÁSICA	19
<i>Identificación Primaria de Aislados</i>	19
<i>Pruebas Bioquímicas Secundarias</i>	20
ANÁLISIS METAGENÓMICO	22
<i>Extracción de ADN Genómico</i>	22
<i>Obtención de Regiones Hipervariables del Gen 16S</i>	23
VALIDACIÓN DE ESPECIES DE INTERÉS.....	26
<i>Caracterización Molecular por PCR y Secuenciación Sanger</i>	26
<i>Caracterización Molecular de Actinomycetales</i>	26
<i>Caracterización Molecular de Francisella</i>	28

RESULTADOS	33
ORGANISMOS Y SITIO DE ESTUDIO	33
CARACTERIZACIÓN DE MICROBIOMA DE <i>O. NILOTICUS</i> POR MÉTODOS DE TAXONOMÍA CLÁSICA	33
<i>Aislamiento e Identificación Bacteriológica Clásica</i>	<i>33</i>
CARACTERIZACIÓN DE MICROBIOMA DE <i>O. NILOTICUS</i> POR SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS)	39
<i>Análisis Metagenómico.....</i>	<i>39</i>
VALIDACIÓN DE ACTINOMYCETALES.....	61
<i>Identificación de Actinomycetales por Bacteriología Clásica y Análisis Molecular por</i>	
<i>Secuenciación Sanger.....</i>	<i>61</i>
<i>Detección de Francisella por Secuenciación Sanger y Secuenciación Masiva (NGS) .</i>	<i>64</i>
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	82
PERSPECTIVAS	83
REFERENCIAS.....	84
APÉNDICE	I
<i>Abreviaturas.....</i>	<i>i</i>
<i>Definiciones.....</i>	<i>iii</i>
ANEXO I.....	IV
DESGLOSE DE TALLA Y PESO DE LOS ORGANISMOS MUESTREADOS POR GRANJA Y TEMPORADA DEL AÑO. .	IV
ANEXO II.....	V
<u>PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BACTERIANA CLÁSICA</u>.....	V
<u>PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA CARACTERIZACIÓN BACTERIANA MOLECULAR</u>.....	VI
○ <u>EXTRACCIÓN DE ADN CON CTAB.....</u>	VI
☐ <i>TBE 1X.....</i>	<i>viii</i>
☐ <i>Gel agarosa 1.5 %.....</i>	<i>viii</i>

☐ Gel agarosa 2.0 %.....	viii
ANEXO III.....	IX
<u>MÉTODOS MOLECULARES</u>	IX
o <u>Método de extracción de ADN total con CTAB</u>	ix
<u>PROCOLOS DE SECUENCIACIÓN</u>	X
ANEXO IV	XVII
<u>RELACIÓN DE CEPAS DEL MICROBIOMA BACTERIANO DE TILAPIA (OREOCHROMIS NILOTICUS)</u>	XVII
ANEXO V	XXXVII
<u>ARTÍCULO PUBLICADO</u>	XXXVII

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1 CARACTERÍSTICAS Y DENSIDADES DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN EL CULTIVO DE OREOCHROMIS SPP.	7
CUADRO 2 PARÁMETROS DE AMPLIFICACIÓN DE REGIONES HIPERVARIABLES DEL GEN 16S PARA SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) DE MICROBIOMA DE OREOCHROMIS NILOTICUS.	23
CUADRO 3 SECUENCIA DEL GEN SINTÉTICO UTILIZADO COMO CONTROL POSITIVO PARA LA PRUEBA DE DETECCIÓN DE FRANCISELLA NOATUNENSIS POR PCR PUNTO FINAL.	28
CUADRO 4 OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA AMPLIFICAR UNA FRACCIÓN DEL GEN 16S DE FRANCISELLA NOATUNENSIS.	30
CUADRO 5 REACTIVOS Y CONCENTRACIÓN PARA LA REACCIÓN DE PCR DE FRANCISELLA NOATUNENSIS EN MUESTRAS DE TEJIDO DE OREOCHROMIS NILOTICUS.	30
CUADRO 6 CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA PCR PUNTO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE FRANCISELLA NOATUNENSIS EN MUESTRAS DE TEJIDO DE OREOCHROMIS NILOTICUS.	31
CUADRO 7 RELACIÓN DE LECTURAS OBTENIDAS EN ION REPORTER DEL MICROBIOMA POR MUESTREO DE OREOCHROMIS NILOTICUS EN DIFERENTES GRANJAS DE CULTIVO.	39
CUADRO 8 CLASIFICACIÓN POR BACTERIOLOGÍA CLÁSICA Y ANÁLISIS DE 16S DE AISLADOS DEL GRUPO DE LOS ACTINOMYCETALES DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DE OREOCHROMIS NILOTICUS CULTIVADA.	62
CUADRO 9 COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE FRANCISELLA SPP., AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO, SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) Y SECUENCIACIÓN SANGER.	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 MILLONES DE TONELADAS DE PRODUCCIÓN MUNDIAL POR PESCA Y ACUICULTURA A NIVEL MUNDIAL HASTA EL AÑO 2018 (FAO 2020).	1
FIGURA 2 PRODUCCIÓN ACUÍCOLA MUNDIAL DE ANIMALES ACUÁTICOS Y ALGAS 1990-2018 (FAO, 2021). 3	3
FIGURA 3 PRODUCCIÓN DE ACUICULTURA DE TILAPIA EN MÉXICO, 2010-2018.	5
FIGURA 4 REPRESENTACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA EN TILAPIA Y EL CONTROL POR COMPETENCIA E INHIBICIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS POR LA MICROBIOTA BACTERIANA PROPIA DEL HOSPEDERO. ©BIORENDER.	11
FIGURA 5 REPRESENTATIVIDAD DE LOS TRES EJES: HOSPEDADOR, MEDIO AMBIENTE Y PATÓGENO EN LA TRÍADA DE LA ENFERMEDAD. ©BIORENDER.	12
FIGURA 6 DISTRIBUCIÓN DE LAS CUENCAS Y ÁREAS DE MUESTREO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> CULTIVADA EN EL ESTADO DE MORELOS.	16
FIGURA 7 FLUJO DE TRABAJO DEL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR MÉTODO TRADICIONAL Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS), DEL GEN 16S BACTERIANO. ©BIORENDER.	18
FIGURA 8 RELACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> , CON RELACIÓN AL MEDIO DE CULTIVO Y FAMILIA TAXONÓMICA.	34
FIGURA 9 PROPORCIONES POBLACIONALES A NIVEL DE PHYLUM DE LA MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVABLE POR MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS CLÁSICOS A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> APARENTEMENTE SANAS.	34
FIGURA 10 PROPORCIÓN POBLACIONAL A NIVEL DE FAMILIA DEL MICROBIOMA BACTERIANO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> POR MUESTREO Y REPRESENTATIVIDAD TOTAL, POR AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA CLÁSICA.	35
FIGURA 11 COMPARACIÓN DE APARICIÓN DE ESPECIES DE BACTERIAS PROPIAS DE MICROBIOMA DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> OBTENIDAS POR BACTERIOLOGÍA CLÁSICA.	36

FIGURA 12 PROPORCIONES POBLACIONALES DE LA MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVABLE EN LOS ÓRGANOS ANALIZADOS POR MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS CLÁSICOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> SANAS DE CULTIVO.	37
FIGURA 13 COMPOSICIÓN POBLACIONAL DEL MICROBIOMA BACTERIANO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> OBTENIDA POR TAXONOMÍA CLÁSICA.	38
FIGURA 14 CURVA DE ACUMULACIÓN DE LA RIQUEZA OBSERVADA DE CHAO 1 DEL MICROBIOMA BACTERIANO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> , TOMANDO EN CUENTA LAS ESPECIES REPRESENTADAS CON UN SOLO INDIVIDUO Y TAXONES CON 2 INDIVIDUOS.....	40
FIGURA 15 CURVA DE ACUMULACIÓN DE LA ABUNDANCIA OBSERVADA DE SHANNON-WEAVER (1949), DEL MICROBIOMA BACTERIANO <i>O. NILOTICUS</i>	40
FIGURA 16 CURVA DE ACUMULACIÓN DE DOMINANCIA DE SIMPSON, DEL MICROBIOMA BACTERIANO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> , TENIENDO EN CUENTA LA PROBABILIDAD DE QUE DOS MICROORGANISMOS, DENTRO DE UN HÁBITAT, SELECCIONADOS AL AZAR, PERTENEZCAN A LA MISMA ESPECIE.	41
FIGURA 17 ABUNDANCIA POBLACIONAL BACTERIANA POR MUESTREOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> A NIVEL DE FAMILIA.	42
FIGURA 18 ABUNDANCIA POBLACIONAL BACTERIANA POR MUESTREO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> A NIVEL DE GÉNERO.....	43
FIGURA 19 ABUNDANCIA POBLACIONAL BACTERIANA POR MUESTREO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> A NIVEL DE ESPECIE.	44
FIGURA 20 COMPOSICIÓN POBLACIONAL DE REINO Y PHYLA BACTERIANOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> POR SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) DEL 16S.	45
FIGURA 21 COMPOSICIÓN POBLACIONAL DE CLASES BACTERIANOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> POR SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) DEL 16S.	46
FIGURA 22 COMPOSICIÓN POBLACIONAL CON LOS NIVELES TAXONÓMICOS DE PHYLA, FAMILIAS, ORDENES, CLASES, GÉNEROS Y ESPECIES BACTERIANOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> POR SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) DEL 16S.	47
FIGURA 23 COMPOSICIÓN POBLACIONAL BACTERIANA DE ESPECIES DEL MICROBIOMA BACTERIANO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> , OBTENIDA POR SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) DEL 16S.	49

FIGURA 24 COMPOSICIÓN POBLACIONAL CON LOS NIVELES TAXONÓMICOS DE PHyla, FAMILIAS, ORDENES, CLASES, GÉNEROS Y ESPECIES BACTERIANOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> POR SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) DEL 16S CON SECUENCIAS MAPEADAS Y NO MAPEADAS.....	51
FIGURA 25 ÍNDICES DE BIODIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DE TILAPIA (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>) EN DIFERENTES NIVELES TAXONÓMICOS.	53
FIGURA 26 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD BETA DE BRAY CURTIS (CLÚSTER DE SIMILITUD) POR COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA) PARA VISUALIZAR LA DISIMILITUD DE COMUNIDADES MICROBIANAS ENTRE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>	54
FIGURA 27 COMPOSICIÓN PROPORCIONAL DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DE TILAPIA (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>) AGRUPADOS POR NIVEL TAXONÓMICO DE PHYLUM EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN.	56
FIGURA 28 COMPOSICIÓN PROPORCIONAL DE LA MICROBIOTA BACTERIANA DE TILAPIA (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>) AGRUPADOS POR NIVEL TAXONÓMICO DE FAMILIA EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN.	57
FIGURA 29 COMPARACIÓN DE ABUNDANCIA RELATIVA EN OTUS DE MICROBIOTA DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EXPRESADO EN MAPA DE CALOR.....	58
FIGURA 30 COMPARACIÓN DE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE MICROBIOTA DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN REPRESENTADA EN MAPA DE CALOR. SE INCORPORAN LOS OTUS DE LOS GÉNEROS BACTERIANOS DE ACUERDO CON SU ASOCIACIÓN ECOLÓGICA.	59
FIGURA 31 BACTERIAS CON POTENCIAL PATÓGENO MAYORMENTE REPRESENTADAS EN TILAPIAS SANAS <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN.	60
FIGURA 32 ÁRBOL FILOGENÉTICO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD DEL 16S DE MICROORGANISMOS DEL ORDEN DE LOS ACTINOMYCETALES AISLADOS POR BACTERIOLOGÍA CLÁSICA DE LA MICROBIOTA DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> CULTIVADA Y COMPARACIÓN FILOGENÉTICA CON ESPECIES DE MAYOR PARENTESCO DENTRO DEL ORDEN CON EL MODELO JUKES-CANTOR,1969.....	63
FIGURA 33 A) ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS CLUSTALW DE FRANCISELLA SPP. REPORTADA PARA <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> ES TAIWÁN, TAILANDIA, BRASIL, COSTA RICA Y MÉXICO. B) CLUSTALO DEL	

GEN SINTÉTICO DE FRANCISELLA CON LOS OLIGOS DISEÑADOS PARA 16S CON UN PRODUCTO ESPERADO DE 262PB. 64

FIGURA 34 A) ESTANDARIZACIÓN DE PCR PUNTO FINAL POR GRADIENTE DE TEMPERATURA DE UNA REGIÓN CONSERVADA DEL GEN 16S DE FRANCISELLA NOATUNENSIS. GEL DE AGAROSA AL 1.5%, CORRIDA DE 60MIN A 100 V. B) AMPLIFICADO 16S F. NOATUNENSIS, FRAGMENTO ESPERADO DE 262 PB. GEL DE AGAROSA AL 1.5%, CORRIDA DE 60MIN A 100 V..... 65

FIGURA 35 ÁRBOL FILOGENÉTICO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD DE CEPAS DE FRANCISELLA SPP. DE OREOCHROMIS NILOTICUS DE CULTIVO Y DIFERENTES ESPECIES Y SUBESPECIES DEL GÉNERO REPORTADAS EN EL BANCO DE GENES, CON EL MODELO JUKES-CANTOR, 1969. 67

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad de producción que ofrece alimentos con alto valor proteico que puede ser desarrollada en diferentes escalas y en las zonas rurales ofrece la posibilidad de generar policultivos, acuaponía, maricultura en temporadas de veda, entre otros, y es una fuente de alimento e ingreso para las familias. Derivado de lo versátil que puede ser esta actividad, la producción de alimentos por acuicultura ha tenido y conserva un crecimiento exponencial tal que para el año 2012 produjo casi la mitad del pescado a nivel mundial para consumo humano. Se tiene un cálculo de producción pesquera mundial que incluye la acuicultura, excluyendo la producción de algas, con un máximo de 179 millones de toneladas en 2018 comparado con 171 millones de toneladas en 2016. La cuota de la pesca de captura marina fue de 84.4 millones de toneladas en 2018, mientras que la pesca de captura de agua dulce registró 12 millones de toneladas (Figura 1).

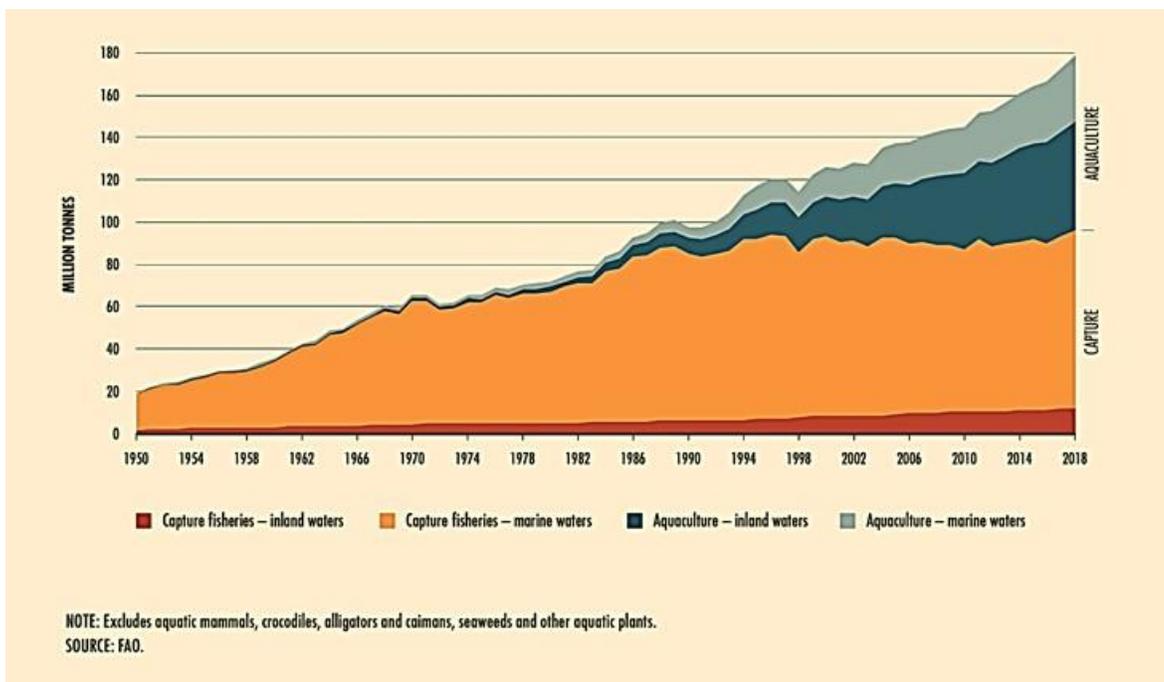


Figura 1 Millones de toneladas de producción mundial por pesca y acuicultura a nivel mundial hasta el año 2018 (FAO 2020).

Si la producción por acuicultura continúa con este crecimiento se prevé que alcance el 62 por ciento de la producción total de pescado para el año 2030. Derivado de la sobre explotación pesquera de los recursos acuáticos, la acuicultura sustentable y responsable es una alternativa productiva para la seguridad alimentaria mundial y el crecimiento económico (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2014).

La acuicultura continental mundial produjo en 2018 la mayoría de los peces de piscifactoría (51.3 millones de toneladas, o el 62.5% del total mundial), principalmente en agua dulce, en comparación con el 57.7 % en 2000. La producción de peces disminuyó gradualmente del 97.2% en 2000 al 91.5% (47 millones de toneladas) en 2018. En 2018, la producción mundial de peces para la acuicultura alcanzó 82.1 millones de toneladas, 32.4 millones de toneladas de algas acuáticas y 26,000 toneladas de conchas y perlas ornamentales, lo que eleva el total a un máximo histórico de 114.5 millones de toneladas. La cría de animales acuáticos en 2018 estuvo dominada por peces (54.3 millones de toneladas, USD \$139.7 mil millones), extraídos de la acuicultura continental (47 millones de toneladas, USD \$104.3 mil millones), así como de la acuicultura marina y costera (7.3 millones de toneladas, USD \$35.4 mil millones). Seguido de los peces se encontraron los moluscos (17.7 millones de toneladas, USD \$34.6 mil millones), principalmente bivalvos; crustáceos (9.4 millones de toneladas, USD \$69.3 mil millones), invertebrados marinos (435,400 toneladas, USD \$2 mil millones), tortugas acuáticas (370,000 toneladas, USD \$3.5 mil millones) y ranas (131,300 toneladas, USD \$997 millones) (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2021) (Figura 2).

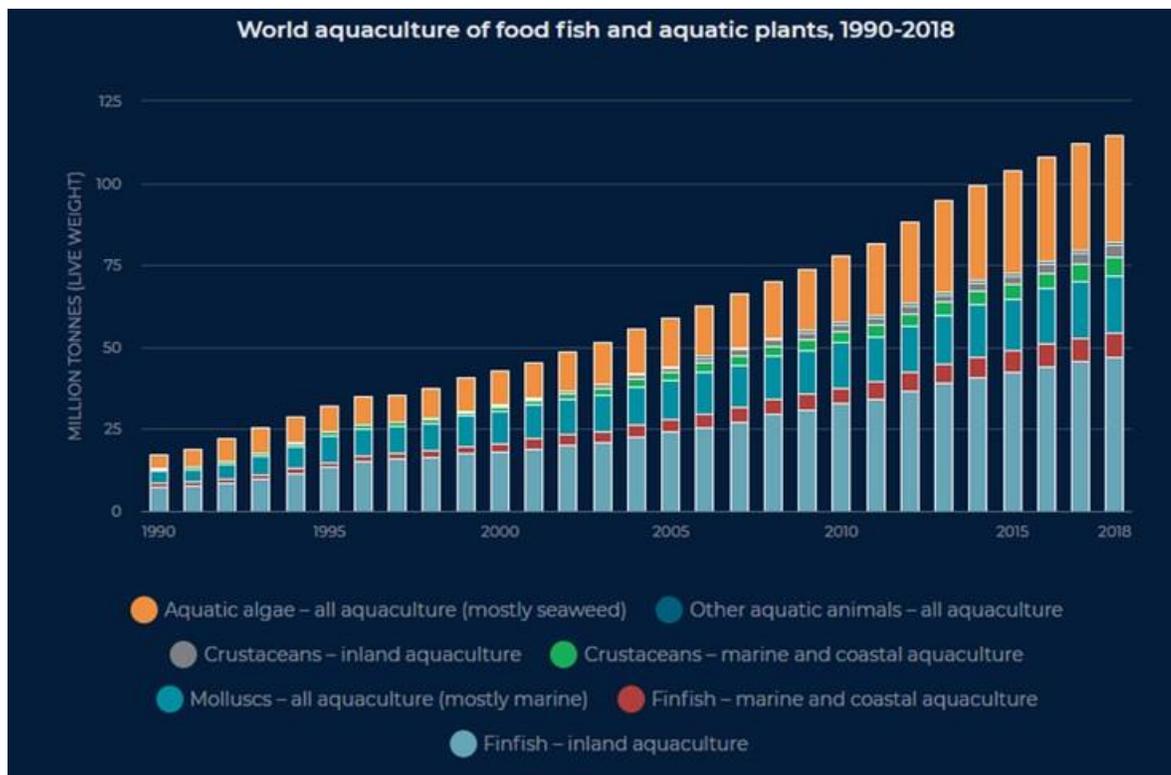


Figura 2 Producción acuícola mundial de animales acuáticos y algas 1990-2018 (FAO, 2021).

El cultivo de la tilapia en México se inició en 1964, con la importación de ejemplares procedentes de Alabama, USA. Los organismos se confinaron en el Centro de Acuicultura de Temascal en Oaxaca y las especies introducidas fueron *Tilapia rendalli*, *Oreochromis mossambicus* y *Oreochromis aureus* (Arredondo y Guzmán, 1986; Morales 1974). Estas fueron distribuidas ampliamente en una gran cantidad de cuerpos de agua naturales y artificiales en las zonas tropical, semitropical y templada del país. Para el año 1978, se importaron de Panamá crías de *Oreochromis niloticus* y en 1981, las primeras crías de *Oreochromis hornorum* y de una línea albina de *O. mossambicus* (Arredondo, 1983).

En los años ochenta, comenzó en México la producción para fines comerciales, y se ha logrado que la acuicultura en América Latina mantenga el crecimiento más elevado a escala global, superando constantemente el 9 por ciento anual promedio en las últimas dos

décadas. Colocándola como el sector primario productor de alimentos con mayor desarrollo.

En México la actividad acuícola se ha dividido en dos grandes vertientes, la producción de peces para el consumo humano y la producción de peces de ornato. El consumo de pescado forma parte de la tradición cultural mexicana sobre todo en las zonas costeras y aledañas a cuerpos de agua continentales. La producción acuícola en México se lleva a cabo en 23 de los 32 estados, los principales productores son: Morelos, Nayarit, Jalisco, Veracruz y Yucatán; en donde el estado de Morelos, es el más importante al producir alrededor de 30 millones de peces anualmente repartidos en 62 especies de los cuales el 70% de la producción total es destinada a la exportación (SADER/INAPESCA,2021).

La producción de tilapia por acuicultura en México estuvo por debajo de las 10,000 toneladas en la mayoría de los años antes de 2010. La producción aumentó rápidamente en la primera mitad de la década, de alrededor de 8,000 toneladas en 2010 a cerca de 55,000 toneladas en 2014; la participación de la acuicultura en la producción total de tilapia del país aumentó del 11.6 al 43 % por ciento; y la tilapia en su producción acuícola total aumentó de 6.5 a 28.1% (Martínez-Cordero *et al.*, 2021) (Figura 3).

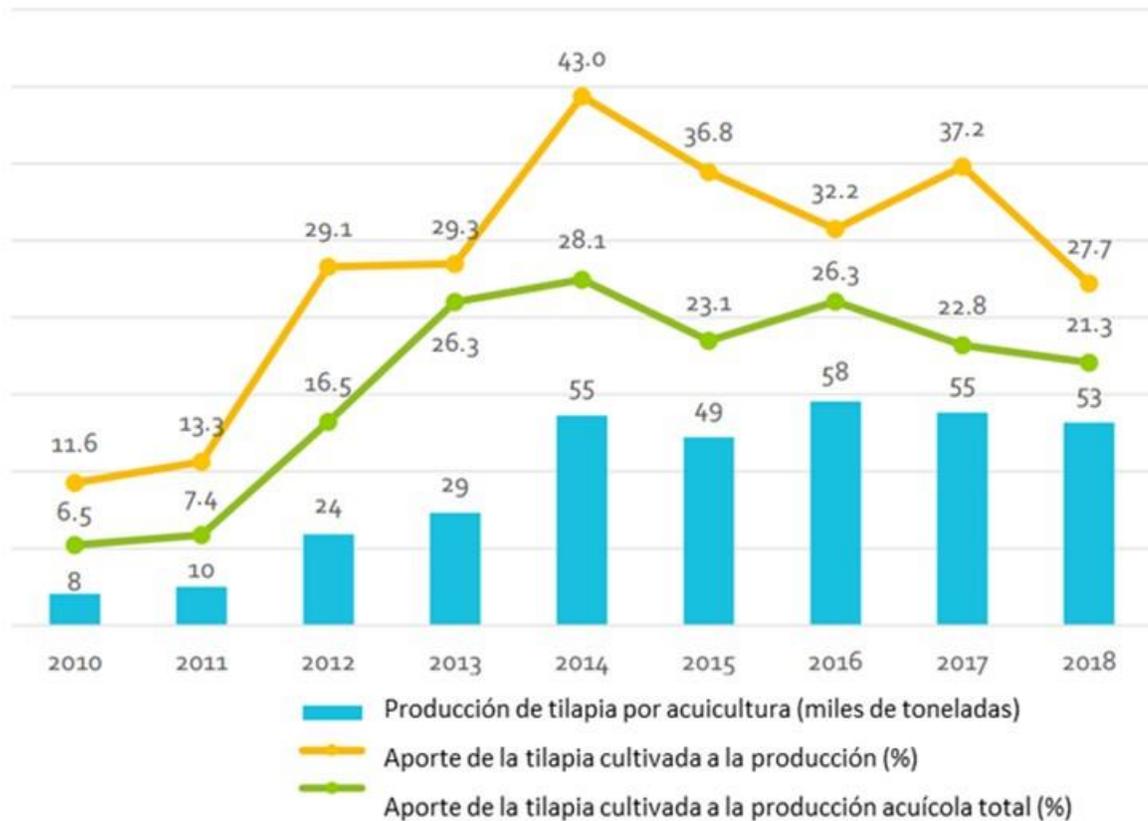


Figura 3 Producción de acuicultura de tilapia en México, 2010-2018.

*Tomado y modificado de Martínez-Cordero *et al.*, 2021.

El colapso del camarón, debido a los brotes de enfermedades a principios de la década de 2010, motivó a los productores de camarón a cultivar tilapias como especie alternativa y como medio para mejorar la calidad del agua y aumentar la resistencia de los camarones contra enfermedades virales a través del efecto beneficioso sobre la ecología del policultivo (Hernández-Barraza *et al.*, 2012).

La tilapia se produce en los 32 estados de México. Los seis estados (Nayarit, Sinaloa, Jalisco, Michoacán de Ocampo, Veracruz y Chiapas) principales con la mayor producción de tilapia representaron las tres cuartas partes de las 168,000 toneladas de tilapia total de México en 2018 (Martínez-Cordero *et al.*, 2021).

El estado de Morelos produce 241 toneladas de tilapia cultivada, lo que corresponde al 0.46 por ciento de la producción total en México (CONAPESCA, 2021). De acuerdo con datos gubernamentales, la actividad acuícola en el Estado de Morelos cuenta con infraestructura en 25 de los 33 municipios que conforman la entidad, con un valor de 93,300 millones de pesos para peces de ornato y producción para consumo humano, en una superficie de 66 hectáreas, esta actividad genera 1,700 empleos y beneficios económicos y de alimentación para la gente de escasos recursos de las comunidades rurales. Para el año 2011, Morelos contaba con 400 unidades de producción, de las cuales 290 son para la producción de peces ornamentales y 110 para producción de tilapia, bagre, trucha, langosta y langostino. En específico para tilapia, en el mismo año, se establecieron los primeros módulos tecnificados para la producción intensiva (Cuadro 1), alcanzando una producción anual de 712 toneladas, para el año 2012 el cultivo de tilapia en sistemas controlados representó el 66 por ciento del total de la acuicultura del Estado, de acuerdo con la Secretaría de Desarrollo Agropecuario local (SADER/INAPESCA, 2021).

Dentro de la producción acuícola hay diferentes tipos de sistemas los cuales pueden ser intensivo, semi intensivo e intensivo los cuales difieren en la tecnología y la densidad de siembra (Cuadro 1). Un sistema típico de cultivo de tilapia en tanque utilizado en México es un tanque de geomembrana circular de 9 m a 15 m de diámetro y 1.2 m de profundidad. También se han utilizado tanques grandes (por ejemplo, de 20 a 25 m de diámetro) en granjas de tamaño mediano, mientras que las pequeñas granjas suelen utilizar tanques de 6 a 12 m de diámetro y 1.2 m de profundidad. Algunos utilizan tanques/estanques de concreto, y la combinación de tanques y estanques revestidos con geomembrana también es común entre las granjas de tamaño mediano. Las granjas de tanques de tilapia tienden a ser más caras de establecer y operar que los sistemas de estanques o jaulas, debido a la necesidad de aireación y bombeo de agua, la mayoría de los equipos o maquinaria son importados y consumen una gran cantidad de electricidad (Martínez-Cordero *et al.*, 2021).

Cuadro 1 Características y densidades de los sistemas de producción en el cultivo de *Oreochromis* spp.

Sistema de Producción	Área de cultivo	Tasa de Siembra (peces/Ha)	Cuidados e Insumos	Ciclo productivo
Extensivo	10 a 20 Ha.	10,000 a 20,000	<p>No se modifica el ambiente Poco control de: Calidad del agua Organismos Nulo control de: Insumos</p>	Variable y mixto, pesquería acuacultural.
Semi-intensivo	Desde 2 Ha hasta pocos metros cuadrados	50,000 a 100,000	<p>Modificación del Ambiente Control completo de: Calidad del agua Organismos Fertilizantes, suplementos y piensos.</p>	Cinco a seis meses, desde siembra con alevín de 5-20 gramos hasta la cosecha.
Intensivo	Variable <ul style="list-style-type: none"> • Estanques 500 a 1000m² • Jaulas 5 metros cúbicos o de volumen alto, mayor de 5 metros cúbicos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Estanques 100,000 a 300,000 • Jaulas 50-100 tilapias/m³ en las jaulas de volumen bajo 600 tilapias/m³ en las jaulas de volumen alto 	<p>Modificación sustantiva del ambiente Control completo de: Calidad del agua con recambios diarios de 250 a 600 litros / segundo y hasta 100% por día. Organismos Fertilizantes, suplementos y piensos. Fertilizantes, suplementos y piensos de 25 a 30% de proteína. Equipamiento: Aireadores mecánicos</p>	Cinco a seis meses, desde siembra con alevín de 5-20 gramos hasta la cosecha.
Super intensivo	Variable <ul style="list-style-type: none"> • Estanques 500 a 1000m² • Jaulas 5 metros cúbicos o de volumen alto, mayor de 5 metros cúbicos. 	Jaula superan las densidades de 600 tilapias/m ³	<p>Modificación sustantiva del ambiente Control completo de: Calidad del agua con recambios diarios hasta de 100%/hora. Organismos Fertilizantes, suplementos y piensos. Fertilizantes, suplementos y piensos de 30 a 40% de proteína. Equipamiento: Sistemas monitoreo digital Aireadores mecánicos Invernadero Alimentadores automáticos</p>	Cinco a seis meses, desde siembra con alevín de 5-20 gramos hasta la cosecha.

En el estado de Morelos, la acuicultura se practica en sus tres modalidades: extensiva, semi intensiva e intensiva.

La mayoría de las granjas de tilapia generalmente dependen de la semilla comprada; sin embargo, muchas granjas medianas y grandes producen sus propios alevines. La reciente situación del virus del lago de la tilapia (TiLV) ha obligado a las granjas a producir sus propios alevines con el fin de tener más control sobre la calidad de la semilla. No existe informe oficial del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) sobre el impacto del TiLV en los laboratorios de semilla. La principal preocupación actual en el cultivo de tilapia son las enfermedades de los alevines por infecciones bacterianas de *Flexibacter columnaris* y para los juveniles y adultos por *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp (Martínez-Cordero *et al.*, 2021).

Se cuenta con poca información referente a la microbiota en organismos sanos cultivados, la mayoría de los estudios publicados se basan en la descripción de la microbiota del sistema digestivo con el fin de mejorar la absorción de nutrientes y mejorar la formulación de las dietas aportadas, así como de la microbiota patógena presente, la cual se describe cuando existen episodios de mortalidades atípicas, con fines sanitarios y de inocuidad de los cultivos.

En los últimos años, los avances en las herramientas de estudio basadas en tecnología molecular, tales como secuenciación masiva (NGS), permiten obtener un panorama global de la microbiota asociada a los organismos y con la descripción de esta se sientan bases para que en episodios futuros de enfermedad se cuente con la información necesaria para determinar que microorganismos están generando un desequilibrio en la microbiota de los organismos de cultivo.

Hipótesis

Si se caracteriza la población bacteriana de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) sana por técnicas clásicas de microbiología y genómica, entonces se podrá definir la microbiota bacteriana de referencia cultivable y no cultivable.

Objetivo General

Realizar la caracterización poblacional de la microbiota bacteriana en tilapia nilótica cultivada *Oreochromis niloticus*.

Objetivos Particulares

- Aislar la microbiota bacteriana cultivable presente en la tilapia aparentemente sana, mediante técnicas de bacteriología básica y clasificar a diferentes niveles taxonómicos
- Identificar y clasificar diferentes niveles taxonómicos, la microbiota bacteriana por secuenciación masiva (NGS) del gen 16S bacteriano, presente en la tilapia cultivada aparentemente sana.
- Determinar la biodiversidad poblacional alfa y beta a nivel de familia, género y especie por NGS del gen 16S bacteriano.
- Determinar la relación ecológica de los aislados bacterianos con el hospedero.
- Validar las especies obtenidas por técnica de PCR punto final.
- Generar un cepario como referencia y fuente de material biológico para estudios posteriores de vacunología, estudio de cepas probióticas e inmunomoduladores, entre otras aplicaciones.

REVISIÓN DE LA LITERATURA Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La relación de los hospederos vertebrados, incluidos los peces teleósteos, con bacterias colonizadoras, data de hace cientos de miles de años (Ley *et al.*, 2010) y se conoce que numerosos procesos metabólicos vitales del hospedero son realizados o facilitados por la comunidad microbiana (Llewellyn *et al.*, 2014). En los peces ovovivíparos como la tilapia, después de la eclosión, las larvas están expuestas a los microorganismos del medio, con ello comienza la colonización de las mucosas y epitelios externos y la formación de comunidades microbianas en el tracto digestivo. En todos los sistemas de cultivo, la tilapia del Nilo *O. niloticus* interactúa regularmente con factores bióticos y abióticos dentro del sistema, lo que resulta en interacciones interespecíficas que pueden ser beneficiosas o causar daños (Odum, 1971). Las bacterias comensales promueven el sistema inmunológico adaptativo en los vertebrados (Ferguson *et al.*, 2010; Standen *et al.*, 2015) e inhiben la colonización por bacterias patógenas, ya sea pasivamente por exclusión competitiva o activamente generando metabolitos secundarios tóxicos (Fig. 4). El estrés causado en los peces por la manipulación, clasificación, transporte y almacenamiento influye en la microbiota de diferentes maneras, con efectos fisiológicos, hormonales y celulares en el hospedero, lo que puede contribuir al desarrollo de la enfermedad (Ley *et al.*, 2008).

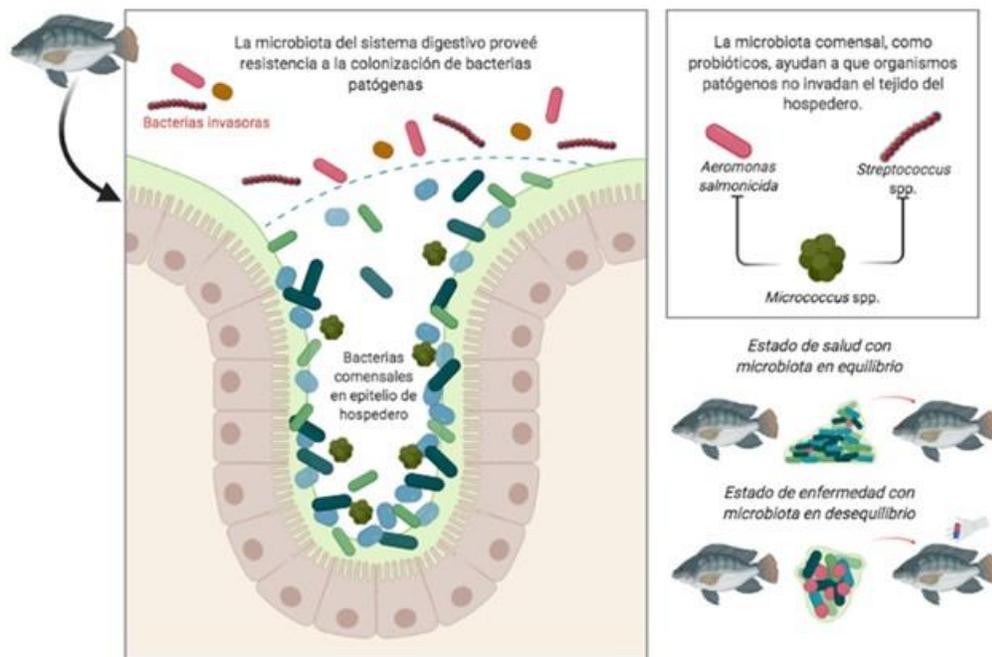


Figura 4 Representación de la comunidad bacteriana en tilapia y el control por competencia e inhibición de bacterias patógenas por la microbiota bacteriana propia del hospedero. ©Biorender.

El hábitat de los organismos acuáticos propicia un contacto constante de los peces con organismos microscópicos como virus, hongos y bacterias, estos se encuentran en la columna de agua asociadas a zooplancton, fitoplancton (Grossart *et al.*, 2010) y en los sedimentos (Wurzbacher *et al.*, 2017). A pesar de que las tilapias son relativamente resistentes a enfermedades, comparadas con otras especies de cultivo, gran variedad de organismos patógenos las afecta. Sin embargo, también hay bacterias comensales Gram negativas y positivas de las cuales se ha reportado un predominio en la microbiota. Algunas de las bacterias Gram negativas benéficas reportadas son: *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Bacillus* y *Pseudomonas* en peces de agua dulce, incluida la tilapia, estas producen amilasa y pueden facilitar la degradación de alimentos con un alto contenido de elementos de plantas como el almidón (Abdelsalam *et al.*, 2017; Assis *et al.*, 2017; Marathe *et al.*, 2016; Ortega *et al.*, 2016). Entre las bacterias Gram positivas existe

una proporción variable de *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Corynebacterium* (El-Rhman *et al.*, 2009; Aly *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 1995).

Por otro lado, existen especies bacterianas relacionadas con los géneros mencionados anteriormente que se comportan como patógenas en *O. niloticus* tales como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Micrococcus luteus*, *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio parahaemolyticus* (Azzam-Sayuti *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Siddique *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020).

Las bacterias patógenas para el humano o indicadoras de contaminación son encontradas con baja prevalencia en los peces recién capturados, a no ser que provenga de aguas excesivamente contaminadas con materia fecal (Marathe *et al.*, 2016).

El estrés puede generar un desbalance en la microbiota y ser precursor de enfermedad, esto es explicado por la triada de la enfermedad, al haber un desequilibrio se favorece el desarrollo de organismos oportunistas y patógenos (Llewellyn *et al.*, 2014) (Fig. 5).

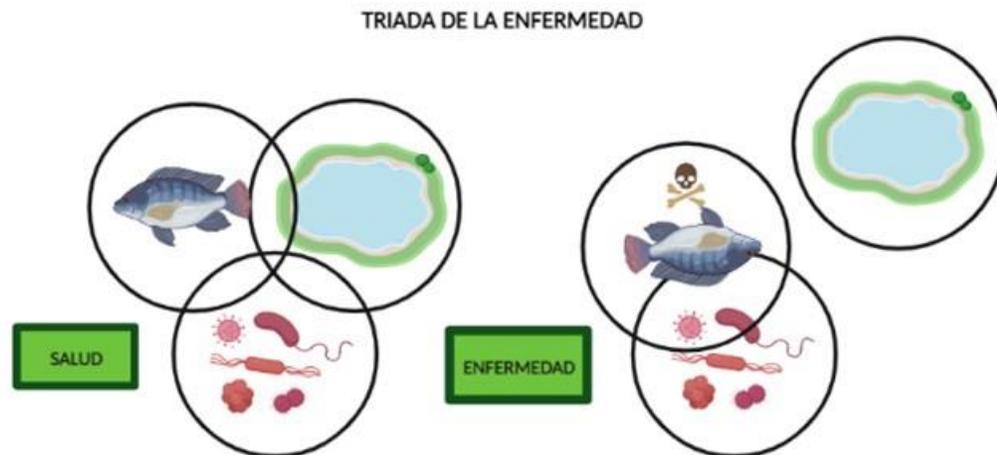


Figura 5 Representatividad de los tres ejes: hospedador, medio ambiente y patógeno en la tríada de la enfermedad. ©Biorender.

En estudios previos se describe la microbiota propia del tracto digestivo de *Oreochromis* spp. (Giatsis *et al.*, 2015; Standen *et al.*, 2015; Ferguson *et al.*, 2010, He *et al.*, 2010) así como bacterias patógenas de interés en inocuidad alimentaria al ser un producto para consumo humano. Estudios de cultivo y secuenciación de la microbiota bacteriana de epidermis e intestino en peces, han demostrado que es poca la presencia de bacterias patógenas en organismos sanos; sin embargo, pueden emerger como patógenos bajo ciertas circunstancias (Navarrete *et al.*, 2010, Boutin *et al.*, 2013) (Fig. 5).

El 90% de las enfermedades en los cultivos de tilapia se asocia a mal manejo, mala implementación de los programas de bioseguridad y el desconocimiento de los riesgos de organismos patógenos y las altas densidades en los sistemas intensivos que aumentan las probabilidades de que se presenten enfermedades (MSD, 2011). Entre los organismos patógenos que causan la mortalidad en la tilapia están bacterias como *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Francisella* spp., *Streptococcus agalactiae* y *S. iniae*. Algunos de estos patógenos están distribuidos en regiones tropicales y templadas donde comúnmente se cultivan especies de aguas cálidas, como la tilapia, y hay una relación importante entre la movilización e introducción de organismo, la densidad, los patógenos y las vías fluviales (Bondad-Reantaso *et al.* 2005; Snieszko, 1975).

En los últimos años, en los cultivos de tilapia del Estado de Morelos se han presentado episodios de mortalidad con cierta temporalidad asociados con la presencia de nódulos en órganos viscerales, así como enfermedades estacionales ocasionadas principalmente por microorganismos del género *Streptococcus* spp. La detección de estos se realiza cuando se observan peces con signos clínicos evidentes de enfermedad, convirtiéndose así en una acción de tratamiento y no de prevención.

Los estudios sanitarios de rutina implican el aislamiento y cultivo de las bacterias de interés, por lo que únicamente es posible determinar la presencia de microorganismos cultivables; sin embargo, con el uso de nuevas tecnologías moleculares como NGS, es posible evaluar toda la comunidad microbiana asociada con los organismos de cultivo incluidos patógenos,

comensales y ambientales. Esto permitirá generar una base de conocimiento de la microbiota de la tilapia del Nilo a partir de organismos visiblemente sanos, mediante técnicas clásicas microbiológicas y tecnologías de nueva generación.

Cualquier alteración de la microbiota comensal que provoque disbiosis pueden aumentar la susceptibilidad a enfermedades (Llewellyn *et al.*, 2014). Al tener el conocimiento de la microbiota bacteriana propia de la tilapia nilótica sana, será posible determinar una condición de salud o enfermedad que favorezca una toma de decisión rápida y oportuna para prevenir episodios de mortalidad y disminuir los costos por aislamiento, tratamiento o eutanasia de los organismos en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio de Estudio

Debido a que el estado de Morelos cuenta con una temperatura media anual de 21.5°C, una temperatura mínima promedio de 10°C en el mes de enero y la máxima promedio alrededor de 32°C en los meses de abril y mayo, es posible el cultivo de tilapia lo largo del año con dos ciclos de cinco a siete meses cada uno para obtener organismos con peso de cosecha de 300-500 g. Con apoyo del Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Morelos (CESAEM), se realizó un estudio de conveniencia, ya que los ejemplares de cultivo son un recurso económico para los productores y depende de ellos la disponibilidad de ejemplares. Derivado de ello los muestreos se realizaron en diferentes etapas de los cultivos y de diferentes granjas de origen, teniendo una visión global de la población bacteriana que compone la microbiota de *O. niloticus*. Se realizaron tres muestreos con un tiempo promedio entre ellos de tres meses. El muestreo se efectuó de tilapia *O. niloticus* cultivada aparentemente sana (n=45), en etapa juvenil de engorda (10 a 100 g). El primer muestreo se realizó en el mes de abril (n=15) en los lugares identificados como granja 1 (G1 sistema intensivo con tanques de geomembrana), granja dos (G2 sistema semi intensivo con tanques de geomembrana) y granja tres (G3 sistema semi intensivo con tanques de concreto); el segundo en el mes de julio (n=15) en las granjas cuatro (G4 sistema intensivo con tanques de concreto) ,5 (G5 sistema semi intensivo con tanques de concreto) y 6 (G6 sistema semi intensivo con tanques de concreto); y el tercero en el mes de octubre (n=15) en la granja 7 (G7 sistema semi intensivo con tanques de concreto), ocho (G8 semi intensivo con tanques de concreto) y nueve (G9 sistema semi intensivo con tanques de concreto), del año 2015. Las granjas muestreadas se localizaban en las cuencas del Río Apatlaco, Rio Tembembe y Río Cuautla del Estado de Morelos, en la zona centro de México (Figura 6).



Figura 6 Distribución de las cuencas y áreas de muestreo de *Oreochromis niloticus* cultivada en el Estado de Morelos.

Organismos de Estudio

Se tomaron parámetros de temperatura y pH en los estanques y el muestreo fue realizado con el uso de atarraya al azar en 4 puntos del estanque. Se tomaron cinco organismos al azar por granja, se registraron las medidas de talla y peso, y se realizó una inspección externa de parásitos o lesiones antes de la necropsia y toma de muestras.

Necropsia y Obtención de Tejidos

El trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias a través del Centro Nacional de Salud Animal e Inocuidad en colaboración con el Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Morelos (CESAEM).

El método para la manipulación y sacrificio de los animales fue sometido y aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación CICUAE, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica FMVZ CU-UNAM, con número de aprobación DC-2015-2-3. Los organismos colectados fueron sacrificados con una sobredosis del sedante MS222 metasulfonato de triclaína, utilizando 0.16 g/mL hasta la muerte del pez (Donald & Andrew, 2009). En gabinete de bioseguridad y con el uso de material estéril, se realizó la necropsia y la toma de muestras de branquia, hígado, bazo, intestino, así como de piel y aleta, solo en caso de observarse se tomó muestra de gónada. En animales grandes se tomaron fragmentos de aproximadamente 1 cm² de tejido y en peces menores de 5cm en talla; los órganos internos se tomaron enteros a excepción de la piel en donde se respetó la medida de 1 cm². Esto se hizo por triplicado para contar con material para las pruebas bacteriológicas, metagenómica y validación de especie. En el caso de los órganos provenientes de organismos menores a 5cm, se dividieron en viales de manera proporcional. El instrumental fue desinfectado con una solución de etanol al 70% entre cada muestra para evitar la contaminación cruzada de las mismas. Durante la necropsia se colocaron medios de cultivo en el gabinete de bioseguridad como control para corroborar que las muestras estuvieran libres de contaminación. Las muestras fueron almacenadas en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL a -20 °C hasta su análisis bacteriológico y molecular.

Método General de Caracterización por Métodos Bacteriológicos Clásicos, Secuenciación Masiva (NGS) y Validación de Especies

Para la caracterización por bacteriología clásica, análisis por secuenciación masiva (NGS) del gen 16S bacteriano y validación de especies se realizaron las actividades de acuerdo con la Figura 7:

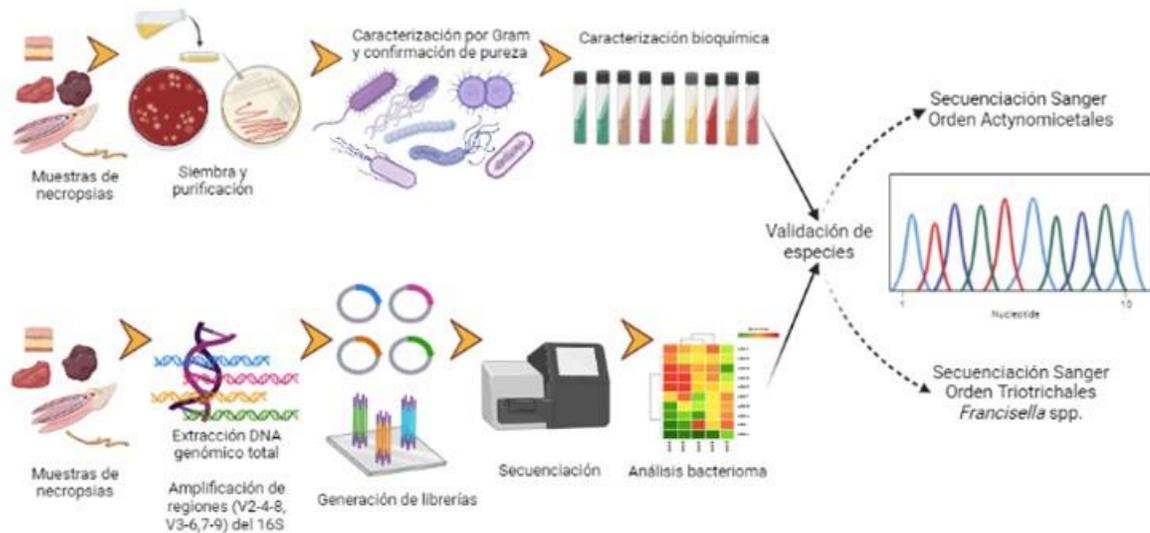


Figura 7 Flujo de trabajo del aislamiento e identificación por método tradicional y método de preparación de muestras y secuenciación masiva (NGS), del gen 16S bacteriano. ©Biorender.

Para el análisis de acercamiento al microbioma por sistema de cultivo se eligieron las granjas G1, G2, G3 y G4 siendo las granjas uno y cuatro sistemas intensivos de geomembrana y concreto respectivamente y las granjas dos y tres sistemas semi intensivos de geomembrana y concreto.

Aislamiento e Identificación por Bacteriología Clásica

Cada órgano fue macerado con solución salina fisiológica estéril (NaCl 0.9%), en bolsas estériles de manera individual, para obtener un homogenizado. Se sembró de forma masiva con hisopos estériles por duplicado a 37°C y a temperatura ambiente (25-29°C) por 10 días en agar sangre al 5%, agar MacConkey y medio Eugon enriquecido con 1% de suplemento B y Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%. Las placas fueron incubadas, haciendo revisiones diarias y registrando el crecimiento de colonias. Transcurrido el tiempo de incubación se hizo la selección de colonias por su forma, tamaño, elevación, estructura, color, opacidad y se resembraron por estría en agar sangre al 5% con resiembras subsecuentes hasta obtener cultivos puros. La identificación presuntiva de los aislados se realizó con diferentes pruebas las cuales incluyeron pruebas de identificación bacteriana por pruebas bioquímicas primarias y secundarias.

Identificación Primaria de Aislados

La identificación primaria de los cultivos puros se basó en la reacción de Gram, motilidad, catalasa y oxidasa.

Reacción de Gram: La tinción de Gram fue realizada de acuerdo con el procedimiento descrito por Rowland *et al* (1994), se consideraron los aislados con morfología de bacilo o coco positivo con arreglo de tétrada.

Prueba de catalasa: Dicha prueba detectó la presencia de la enzima catalasa que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba se realizó en placas de vidrio, se tomaron como positivas las cepas que presentaron la formación de burbujas (Anexo II).

Prueba de oxidasa: Esta prueba se realizó en papel filtro estéril para cada cepa analizada y se detectó la presencia de la enzima citocromo oxidasa, lo cual fue visible con la formación

de una tonalidad morada dentro de los 10 minutos de entrar en contacto con la solución de dihidrocloruro de tetrametil-p.fenilendiamina al 1% (Anexo II)

Prueba de Motilidad: en cubreobjetos se colocó una gota de agua y sobre ella la azada de la cepa a analizar. Posteriormente se colocaron pequeñas porciones de plastilina en las esquinas del cristal y se invirtió procurando mantener la muestra en el centro del cubreobjetos. Se colocó el cubreobjetos sobre el portaobjetos sin tocarse entre ellos con la ayuda de la plastilina y se observó en microscopio óptico.

Prueba de oxidación-fermentación (O/F) (Hugh y Leifson): Se utilizó un agar semisólido que permite que los ácidos formados en la superficie difundan por todo el medio, facilitando la visualización del indicador de pH, se realizó la siembra por picadura en dos tubos cerrando uno de ellos al contacto con el aire con el uso de aceite mineral. Se determinó como oxidativo cuando el tubo abierto viró a color amarillo y fermentativo cuando hubo un vire a color amarillo tanto en el sistema cerrado como en el abierto.

Pruebas Bioquímicas Secundarias

Se realizaron pruebas bioquímicas secundarias de identificación basadas en las características de las bacterias para utilizar los diferentes compuestos orgánicos como glucosa o una fuente de carbón en el medio, y productos que fueron detectados con los indicadores incorporados en los medios.

Prueba Triple azúcar hierro (TSI): Se detectó la producción de ácido sulfhídrico, fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa. La siembra se realizó por punción y por estriado sobre el agar.

Prueba descarboxilación de lisina: Se utilizó medio de lisina, se determinó como positivo a la ausencia de vire de color del medio, negativo cuando había la formación de pigmentación

morada que indica el uso de la lisina y producción de pH alcalino en el medio. La siembra se realizó por estría sobre el medio de cultivo.

Prueba de Citrato de Simmon's: Se utilizó para determinar si las cepas utilizaban el citrato como fuente de carbono. Se determinó positiva cuando la enzima citrasa hidroliza el citrato a ácido oxalacético y ácido acético, posteriormente hidrolizado en Ácido pirúvico y CO₂ lo que produce compuestos alcalinos y producen un vire de color azul en el medio por el indicador azul de bromotimol. La siembra se realizó por estría sobre el medio de cultivo.

Prueba de reducción de nitratos: Se realizó para determinar si los aislados utilizan como aceptor final de electrones al oxígeno, en ausencia, los nitratos son reducidos a nitritos, óxidos de nitrógeno o a nitrógeno molecular. Las cepas fueron sembradas en estría sobre el agar, posterior a la incubación se reveló con el uso de α naftilamina y ácido sulfanílico reactivo de Greiss (Anexo II).

Prueba de ureasa: Se identificó la presencia de la enzima ureasa que cataliza la hidrólisis de urea a CO₂ y amoníaco, realizando un vire de color a rosado. Se realizó la siembra estriando el inóculo en la superficie del medio.

Prueba de indol: Se utilizó medio SIM para determinar la producción de indol inoculando por punción, para demostrar su producción se adicionó el reactivo Kovac's (Anexo II) al medio posterior a la incubación por 24 hras, se determinó como positiva la prueba al presentar un anillo color rojo.

Prueba de rojo de metilo: Se utilizó para identificar si los aislados producen ácido láctico, acético o fórmico a partir de glucosa por fermentación mixta, realizando la lectura con indicador rojo de metilo.

La lectura de las pruebas fue a las 24 hras de incubación, en caso de no observar cambios evidentes y crecimiento bacteriano en los medios se incubó por dos días más, completando un total de 3 días de incubación.

Se determinó la clasificación con el uso de claves taxonómicas de Cowan y Steel, 1985, y se corroboró la clasificación obtenida hasta especie con el uso de microsistemas de api®Coryne y Satph de BioMérieux, Inc., siguiendo las instrucciones del protocolo del proveedor, analizando los datos en la plataforma electrónica apiweb™ versión: 1.3.1.

Una vez identificados los aislados, se realizó la comparación de aislados determinando normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y posteriormente Kruskal-Wallis con una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Dunn's para buscar diferencias entre temporadas.

Análisis Metagenómico

Con la finalidad de hacer más eficiente la corrida de secuenciación se trabajó con *pools* de los órganos de las necropsias por granja, teniendo un total de tres *pools* por muestreo.

Extracción de ADN Genómico

Se realizó la extracción de ADN genómico por columna en gabinete de bioseguridad utilizando el kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, No. de catálogo K182002) (Ciezarek *et al.*, 2022) con la adición de proteinasa K del kit PureLink™ y la unión selectiva del ácido nucleico a una matriz de sílice bajo condiciones desnaturalizantes (Kovacs *et al.*, 2019). Para comprobar la calidad y cantidad del ADN genómico se realizó una lectura con 2µL de muestra en NanoDrop 2000™ (Thermo Scientific). Las muestras fueron conservadas en ultra congelación a -60 C y transportadas en hielo seco para su procesamiento.

Obtención de Regiones Hipervariables del Gen 16S

El ADN genómico fue utilizado como molde para la amplificación de las regiones hipervariables (V2-4-8 y V3-6, 7-9) por PCR punto final, se incluyó una referencia, utilizando el kit Metagenomics Ion 16S™ (Thermo Fisher revisión C.0 junio de 2015). Las condiciones de PCR se muestran en el cuadro 2:

Cuadro 2 Parámetros de amplificación de regiones hipervariables del gen 16S para secuenciación masiva (NGS) de microbioma de *Oreochromis niloticus*.

Ciclo	Temperatura C	Tiempo
Hold	95	10 min
25 ciclos	95	30 seg
	58	30 seg
Hold	72	20 seg
	72	7min
Hold	4	∞

Se realizó la purificación y limpieza de los productos con perlas magnéticas Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Indianapolis United States, No catálogo A63881) (ver anexo III), corroborando la calidad y tamaño de los amplicones por electroforesis capilar con el kit Agilent High Sensitivity DNA (Agilent Technologies, Alemania, No. catálogo 5067-4626) en Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) (ver anexo II). Se generaron las librerías acoplando las secuencias preestablecidas como adaptadores y códigos de barras a las muestras con base en el protocolo del proveedor (ver anexo II). Posteriormente se determinó la concentración de la librería con el kit Agilent High Sensitivity DNA en Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) analizado en el programa 2100 Expert Software (ver anexo III), con base en ello se determinó la concentración de muestra necesaria para realizar el templado mediante PCR de emulsión, siguiendo las indicaciones del manual Ion

PGMTM Hi-QTM OT2 (ver anexo II) (Thermo Fisher revisión A.O marzo de 2015). Para conocer la calidad del producto de templado se realizó el análisis con el kit Ion Sphere™ Quality Control analizado en Qubit® Easy Calculator Microsoft® Excel® Spreadsheet, posteriormente el templado fue enriquecido con el uso de las partículas Ion PGM™ Hi-QTM Ion Sphere™ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, No. de catálogo A29900) (anexo II).

Se realizó la secuenciación con base en el manual Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit (Thermo Fisher revisión B.0 septiembre de 2014) con chip Ion 318™ V2 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, No. de catálogo 4488146).

Para el análisis de datos se utilizó la plataforma Ion Reporter versión 5.10 y 5.18 (Thermo Fisher) con el flujo de trabajo personalizado de metagenómica 16S. Las bases de datos de referencia utilizadas fueron Curated MicroSEQ© 16S Reference Library v2013.1 y Curated Greengenes v13.5. Se tomaron los siguientes parámetros para las lecturas obtenidas: filtro de abundancia de lecturas 1 copia, lectura de un sentido, tamaño de lecturas mínimo de 50pb, valor de porcentaje de cobertura del 90%, porcentaje de identidad para género de 97% y valor de porcentaje de identidad para especie de 99%. En caso de registrarse una diferencia del 0.2% en una especie y un género dentro del mismo rango, cada una de ellas se informó cómo no identificada en dicho nivel taxonómico. Posteriormente se realizaron los análisis de composición y estimaciones poblacionales mediante el paquete programático Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QUIME) y representación jerárquica en gráfica de pastel con enfoque, elaborado con Krona (Ondov *et al.*, 2011). Se determinó la riqueza de biodiversidad por riqueza específica por rarefacción, no paramétricos por método de Chao (1984), e índices de dominancia y abundancia proporcional de Simpson (1960) y Shannon (Shannon y Weaver, 1949) para determinar la abundancia proporcional de cada especie. Para probar si las diversidades beta generadas a partir de los conjuntos de datos de los sistemas de cultivo son similares, se hizo un análisis de *Clusters* o diversidad β por

análisis de coordenadas principales (PCoA), la distancia más corta es la que denota una mayor concordancia y la más larga menor concordancia.

Posteriormente se realizaron gráficos de agrupamiento o mapas de calor en diferentes niveles taxonómicos para expresar los datos cuantitativos de composición poblacional. Se realizó el análisis de composición poblacional de las 50 Familias, Género y Especies con mayor representatividad bajo un sistema de distancias Eucladiano y tipo de enlace por promedio de aparición utilizando la herramienta Clustergammer (Ma'ayan Laboratory, Computational Systems Biology, New York, E.U.A.) Los datos de los muestreos con secuencias mapeables se unieron y se graficaron para describir el microbioma bacteriano de *O. niloticus* con Geneious Prime® 2022.1.1 16S Biodiversity Tool (Biomatters Ltd.) con la finalidad de asignar una taxonomía y una estimación de confianza de *bootstrap* a cada secuencia. Estas se compararon con una base de datos de ARNr 16S bacteriano y arqueal expresado de forma gráfica con el uso de Krona (Wang et al., 2007; Ondov et al., 2011). Como un segundo de análisis los datos no mapeados fueron corridos en Geneious Prime® 2022.1.1 16S Biodiversity Tool (Biomatters Ltd.).

Como una primera aproximación y con el fin de observar algún cambio que permita hacer análisis más profundos en un futuro, se utilizó información obtenida por NGS para buscar cambios en el microbioma bacteriano de acuerdo con los materiales de fabricación y sistemas de producción, tales como concreto en sistema intensivo CSI (G3) e intensivo CI (G4) así como, geomembrana en ambos sistemas semi intensivo GSI (G2) e intensivo GI (G1). Se realizó el corrimiento de pruebas de comparación poblacional de las muestras que contaban con los diferentes tipos de materiales de cultivo mencionados anteriormente.

Validación de Especies de Interés

Caracterización Molecular por PCR y Secuenciación Sanger

Para la validación de los microorganismos bacterianos se tomaron en cuenta las bacterias del Phylum Actinobacteria, en su mayoría bacterias comensales y ambientales, abundantes en ambientes acuáticos, así como *Francisella noatunensis* del Phylum Proteobacteria, la cual es un microorganismo intracelular que se ha descrito en los últimos años como un problema sanitario en los cultivos de tilapia en diversas regiones del país, incluido el Estado de Morelos.

Caracterización Molecular de Actinomycetales

Una vez identificadas las bacterias Actinomycetales por cultivo bacteriológico y pruebas bioquímicas primarias y secundarias, se tomó una colonia del cultivo axénico en medio Eugon enriquecido con 1 % de suplemento B y 10 % de SFB a las 48 horas de incubación y se realizó la extracción de DNA total por el método de CTAB (Anexo II y III).

El ADN genómico se detectó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %. Se mezclaron 10 μ L del ADN resuspendido con 1 μ L de colorantes de carga 5X (xilencianol y azul de bromofenol en Ficoll). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kb (Ladder II GENE CHOICE CLP) a una concentración de 1 μ g/ μ L. A la cámara de electroforesis se le agregó suficiente amortiguador TBE 1X para cubrir el gel y se aplicaron 100 v por una hora. Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel con una solución de Gel Red™ por 10 minutos. Después de ese tiempo, se detectó el ADN con transiluminación de luz ultravioleta (Gel Red™: $\lambda_{\text{excitación}} = 302 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 600 \text{ nm}$). La concentración de ADN se determinó usando Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 con 2 μ L de la extracción de ADN total.

Se realizó la amplificación del gen 16S bacteriano con los *primers* genéricos (referencia): sentido 8F: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' y anti sentido 1492R: 5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3' con un fragmento esperado de 1,500 pb.

El volumen final de la PCR fue de 50µL, se utilizaron todos los componentes de Thermofisher. Las concentraciones de los componentes para los oligonucleótidos fueron: amortiguador estándar de reacción "PCR Buffer 1X" (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X-100), dNTP 200 µM, 1 µM de cada iniciador y 1 U de *Taq* DNA polimerasa. Para las reacciones se utilizaron 100 ng de ADN molde.

Las condiciones de amplificación para el gen 16S fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos de 94°C por 15 seg, 52°C por 15 seg y 72°C por 1 min 30 seg; extensión final a 72°C por 5 min. En todas las reacciones se incluyó un control negativo consistente en la mezcla de reacción de la PCR sustituyendo el templado por agua estéril.

Los productos de PCR se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. Se aplicó una carga de 100 volts por 1 h y el gel fue teñido con una solución de Gel Red™ por 10 min. Después de ese tiempo, se detectó el ADN con transiluminación de luz ultravioleta (Gel Red™: $\lambda_{excitación} = 302 \text{ nm}$, $\lambda_{emisión} = 600 \text{ nm}$).

Las muestras fueron purificadas a partir del gel de agarosa utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit, se midió la concentración de ADN usando Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 con 2 µL del producto purificado y se realizó la secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA), UNAM. Se realizaron análisis filogenéticos y evolutivos moleculares utilizando el programa MEGA versión X (Kumar *et al.*, 2018; Stecher *et al.*, 2020).

Caracterización Molecular de *Francisella*

Para la detección de *Francisella* se diseñó un gen sintético de 262 pb de una región conservada del 16S. Utilizando las secuencias reportadas en Genbank se realizó un BLAST de las secuencias y se detectó la región génica conservada para las cinco regiones del mundo donde ha sido reportada, Asia, Europa oriental, Sur América, Centro América y México. Posteriormente se realizó la síntesis de la siguiente secuencia (Cuadro 3):

Cuadro 3 Secuencia del gen sintético utilizado como control positivo para la prueba de detección de *Francisella noatunensis* por PCR punto final.

Gen sintético para control positivo de *Francisella noatunensis* 262 pb

```
GGGAGGAAAGCCTGTGAGTTAATAGCTTGCAGGAAGGACGTTGCCAAAGAATAAGGACC  
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTCCGAGCGTTAATCGGAATTAC  
TGGGCGTAAAGGGTCTGTAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACC  
TTGGAAGTGCATTTGATACTGACAACTAGAGTATGGTAGAGGAATAGGGAAGTCTGGT  
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
```

Se realizó la extracción de DNA total a partir de *pools*, uno por granja, de órganos (tejido branquial, intestino, bazo e hígado) de *O. niloticus* muestreadas. El tejido proveniente de animales grandes fueron fragmentos de aproximadamente 1 cm² de tejido y en peces menores de 5cm en talla, se tomó una tercera parte del total del volumen del órgano. Se colocó en un tubo de microcentrifuga estéril de 1.6 mL y se adicionaron 500 µL de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril, 100 µg de proteinasa K (100 mg/mL) (BIOLINE, Memphis-Tennessee E.U.A., No. de catálogo BIO-37037) y 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sodio) 10 % y se incubó por 3 h a 56°C. Después de ese tiempo, se agregaron 500 µL del reactivo comercial DNAzol® (Research Molecular Center). El tubo se incubó 3 h a 56°C. Después se centrifugó 6 min a 16,862 x g a temperatura ambiente en microcentrifuga, para precipitar el tejido degradado. Se transfirieron 800 µL del sobrenadante a un tubo estéril y

se agregaron 200 μL de cloroformo 99 %, se mezcló por 20 seg y se centrifugó por 6 min a 16,000 x g. Se transfirieron 600 μL del sobrenadante a otro tubo estéril y se agregaron 800 μL de isopropanol 99.9 % (-20 C) que se mezcló por inversión y se dejó en el congelador toda la noche para precipitar el ADN. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 10 min a 20,817 x g. El sobrenadante se eliminó por decantación y el ADN precipitado se lavó con 750 μL de etanol al 70 %. Después se centrifugó por 10 min a 20,817 x g y de nueva cuenta el sobrenadante se eliminó por decantación. El ADN precipitado se secó en una estufa a 56 C para eliminar los restos de etanol, por 30 min. Posteriormente, el ADN se resuspendió en 300 μL de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril.

El ADN genómico se detectó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %. Se mezclaron 10 μL del ADN resuspendido con 1 μL de colorantes de carga 5X (xilencianol y azul de bromofenol en Ficol). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kb (Ladder II Gene Choice CLP) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A la cámara de electroforesis se le agregó suficiente amortiguador TBE 1X para cubrir el gel y se aplicaron 100 v por una hora. Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel con solución de Gel Red™ por 10 min. Después de ese tiempo, se detectó el ADN con transiluminación de luz ultravioleta (Gel Red™: $\lambda_{\text{excitación}} = 302 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 600 \text{ nm}$). La concentración de ADN se determinó usando Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 con 2 μL de la extracción de ADN total.

Para la amplificación se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes los cuales fueron analizados utilizando el programa OligoAnalyzer versión 3.1 (Cuadro 4).

Cuadro 4 Oligonucleótidos diseñados para amplificar una fracción del gen 16S de *Francisella noatunensis*.

FWD Fran Sint	REV Fran Sint
Longitud: 22	Longitud: 22
5' GGA AAG CCT GTG AGT TAA TAG C 3'	5' CTA CAC CAG AAG TTC CCT ATT C 3'

Se trabajó con un protocolo estándar de concentración de reactivos para la PCR punto final con base en el cuadro 5. El volumen final de la PCR fue de 50µL utilizando todos los componentes de Thermofisher. Las concentraciones de los componentes para los oligonucleótidos fueron: Amortiguador estándar de reacción “PCR Buffer 1X” (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X-100), dNTP 200 µM, 1 µM de cada iniciador y 1 U de *Taq* DNA polimerasa. Para las reacciones se utilizaron 100 ng de ADN molde (Cuadro 5).

Cuadro 5 Reactivos y concentración para la reacción de PCR de *Francisella noatunensis* en muestras de tejido de *Oreochromis niloticus*.

	Concentración inicial	Concentración final en la reacción	Cantidad para un tubo
dNTPs	10 mM (todos)	200 µM	1 µL
Magnesio	25 mM	1.5 Mm	3 µL
Oligo forward	10 µM	1 µM	5 µL
Oligo reverse	10 µM	1 µM	5 µL
Enzima	5 U/µL	1 U	0.2 µL
Buffer	10X	1 X	5 µL
Agua	-	-	19.8 µL
ADN molde	0.1 mg/mL genómico 0.1-1 ng plásmido	0.1 mg/mL genómico 0.1-1 ng plásmido	11 µL

* Reacciones de 50 µL

Con el gen sintético como control positivo, se estandarizó la amplificación de la PCR punto final con gradiente de temperatura en el rango de 46 a 56°C, una vez establecida la

temperatura de alineamiento se realizó el amplificado con las siguientes condiciones (Cuadro 6).

Cuadro 6 Condiciones de amplificación para PCR punto final para la detección de *Francisella noatunensis* en muestras de tejido de *Oreochromis niloticus*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	
Alineamiento	54	30 seg	35
Extensión	72	20 seg	
Extensión Final	72	5 min	1
	4	∞	∞

Los productos de PCR se detectaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Se mezclaron 10 µL del ADN resuspendido con 1 µL de colorantes de carga 5X (xilencianol y azul de bromofenol en Ficoll). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 50pb (GeneRuler DNA Ladders, Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 1 µg/µL. A la cámara de electroforesis se le agregó suficiente amortiguador TBE 1X para cubrir el gel y se aplicaron 100 v por una hora. Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel utilizando una solución de Gel Red™ por 10 minutos. Después de ese tiempo, se detectó el ADN con transiluminación de luz ultravioleta (Gel Red™: $\lambda_{\text{excitación}} = 302 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 600 \text{ nm}$).

Las muestras positivas, fueron purificadas a partir del gel de agarosa utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit, se midió la concentración de ADN usando Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 con 2µL del producto purificado y se realizó la secuenciación en la USSDNA, UNAM. Posteriormente se editaron los electroferogramas y se analizaron con el programa MEGAX 0.1v. Para determinar la certeza de las muestras como *Francisella noatunensis* se usó la herramienta BLAST haciendo la comparación con secuencias reportadas en el banco de genes. Posteriormente se hizo un alineamiento con la herramienta MUSCLE (Edgar, 2004) y se identificó una secuencia consenso para el análisis

filogenético. La historia evolutiva se infirió con el método de máxima verosimilitud y el modelo Jukes-Cantor,1969. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbour-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo Jukes-Cantor y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad logarítmico superior utilizando el programa MEGA versión X (Kumar *et al.*, 2018; Stecher *et al.*, 2020).

RESULTADOS

Organismos y Sitio de Estudio

Durante los muestreos realizados se obtuvieron el peso y la talla de los organismos. Tuvieron un promedio de peso de 73.64g y 16.48 cm de longitud total (LT). Los resultados biométricos presentaron diferencias, los menores se observaron en el último muestreo (G7, G8 y G9), estos datos pudieran estar relacionados con las temporadas del año. Durante el verano (G4, 5 y 6), las altas temperaturas favorecen el desarrollo de *O. niloticus* y muchas granjas completan, en dicho periodo, el ciclo productivo y vuelven a sembrar organismos en los sistemas. A pesar de la diferencia de datos, todos los organismos se encontraban en la etapa de juvenil, de acuerdo con el rango de tallas de la especie (Anexo I).

De los estanques muestreados se obtuvieron datos fisicoquímicos del agua, estos no presentaron cambio en pH (potencial de hidrógeno); sin embargo, la temperatura se mantuvo constante en los muestreos uno y dos con una disminución de ± 5 C en la temperatura del tercer muestreo.

Caracterización de Microbioma de *O. niloticus* por Métodos de Taxonomía Clásica

Aislamiento e Identificación Bacteriológica Clásica

Con los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de la microbiota cultivable, se observaron mayor número de aislados en agar Eugon enriquecido predominaron las Actinomicetales y Pseudomonadales; en el medio base agar sangre Aeromonadales, Pseudomonadales y Pasteurellales y en el agar McConkey, Pseudomonadales y Aeromonadales (Figura 8).

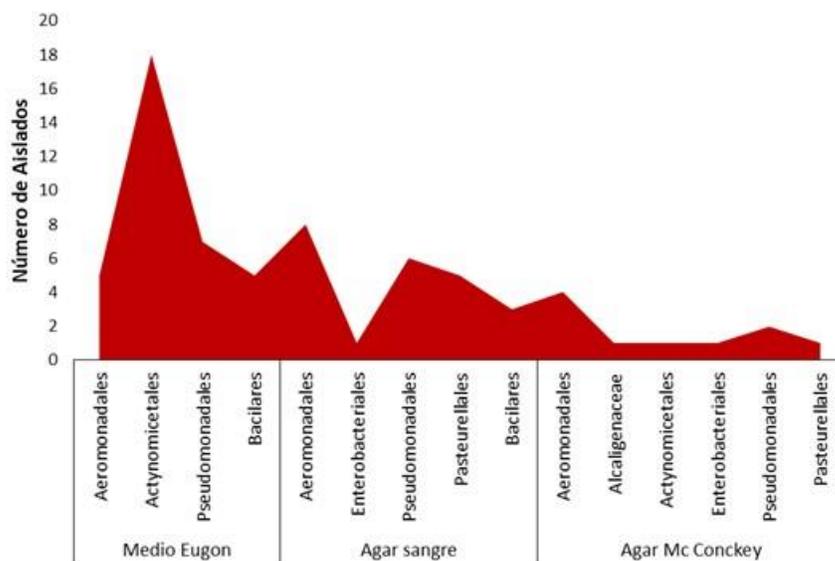


Figura 8 Relación de aislados bacterianos de *Oreochromis niloticus*, con relación al medio de cultivo y familia taxonómica.

*Mc: Agar MacConkey, AS: agar base sangre, EU: agar Eugon enriquecido con 1% suplemento B y 10% suero fetal bovino.

En el análisis poblacional de los aislados obtenidos, para el primer muestreo hubo una dominancia del Phylum Proteobacteria (2/3), seguido del Phylum Firmicutes (2/3) en el segundo una dominancia de Proteobacteria en otoño con 3/3 granjas. De la población total se obtuvo una abundancia de la microbiota cultivable de *O. niloticus* dada por el Phylum Proteobacteria con porcentajes desde 46 hasta 68% cuando presentaban dominancia en la población y tuvo una prevalencia de 6/9 del total de granjas analizadas. El Phylum Firmicutes fue segundo en abundancia con 33 al 76 % y una prevalencia de 2/9 granjas al igual que el Phylum Actinobacteria con porcentajes de abundancia de 35 a 55% en las granjas donde dominó. El Phylum Bacteroidetes presentó porcentajes de dominancia poblacional de 2.3 y 9% y se detectó en 3/9 granjas. Proteobacteria tuvo una representatividad de 46% (163/353), Firmicutes 36% (129/353), Actinobacteria 16% (55/353) y Bacteroidetes 2% (6/353) (Figura 9).

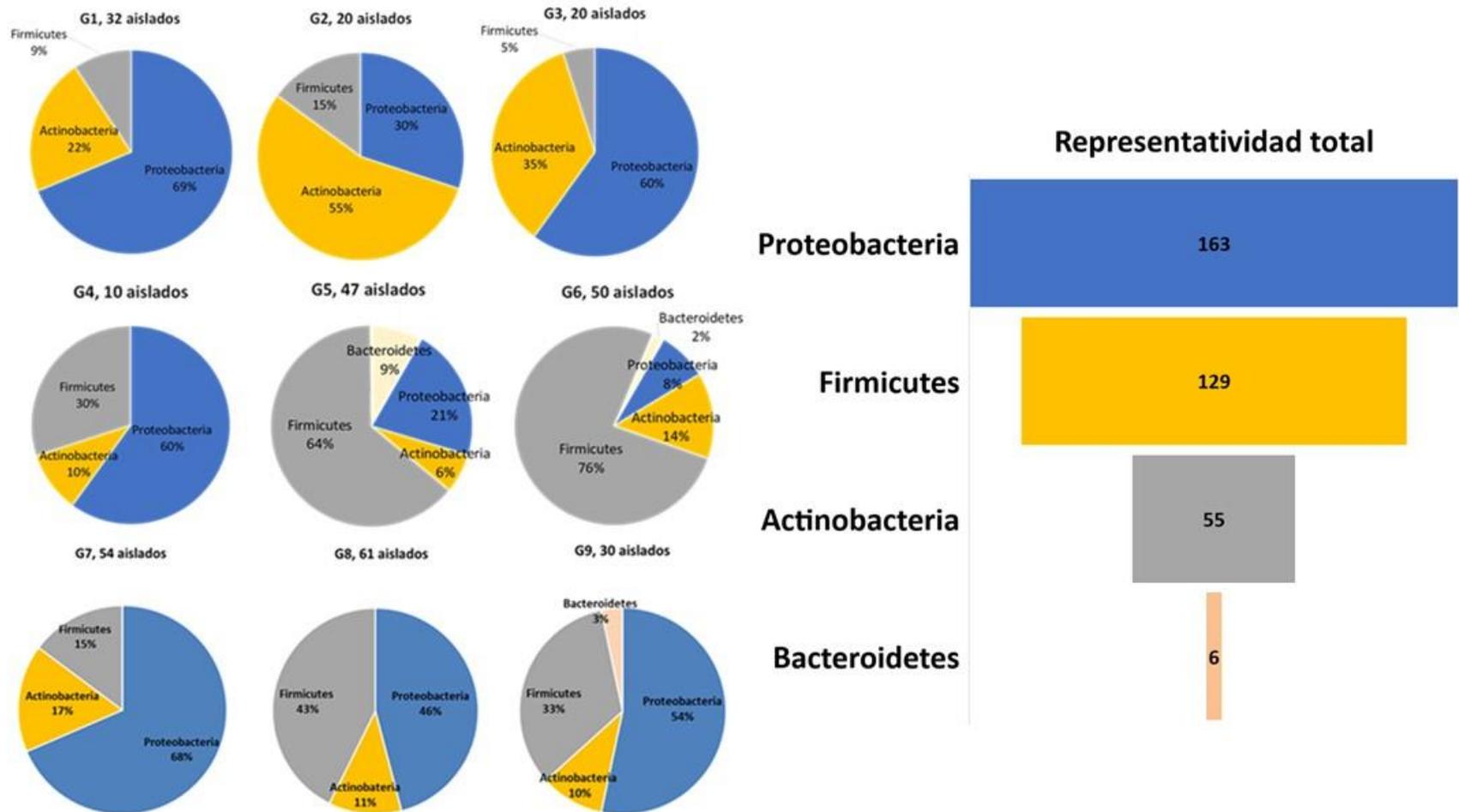


Figura 9 Proporciones poblacionales a nivel de Phylum de la microbiota bacteriana cultivable por métodos bacteriológicos clásicos a partir de muestras de tejido de *Oreochromis niloticus* aparentemente sanas.

La microbiota obtenida por métodos clásicos de bacteriología presentan una proporción heterogénea de acuerdo con las familias, dentro de esa heterogeneidad comparten familias en diferentes proporciones principalmente representadas por: Staphylococcaceae, Micrococcaceae, y Microbacteriaceae (Figura 10).

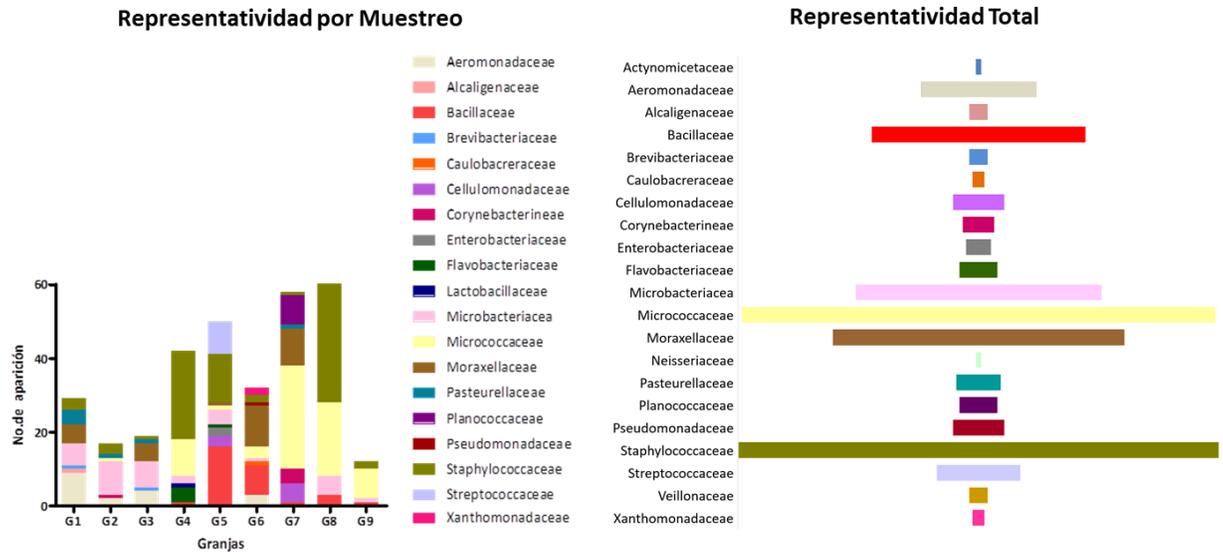


Figura 10 Proporción poblacional a nivel de familia del microbioma bacteriano de *Oreochromis niloticus* por muestreo y representatividad total, por aislamiento e identificación bacteriológica clásica.

Al comparar estadísticamente los promedios de aparición de las diferentes especies de bacterias de tilapia *O. niloticus* en los tres muestreos realizados, estas presentan diferencia significativa ($p= 0.0016$) entre el número de apariciones por especie de bacterias del muestreo uno y tres ($p < 0.05^{**}$) y sin diferencia significativa entre uno y dos y dos y tres (Figura 11). Lo cual puede indicar que la diversidad bacteriana de la tilapia sana pudiera variar con la edad de los ejemplares, ya que en el muestreo tres es donde se colectaron organismos de menor talla; sin embargo, se requieren estudios posteriores para confirmar esta idea.

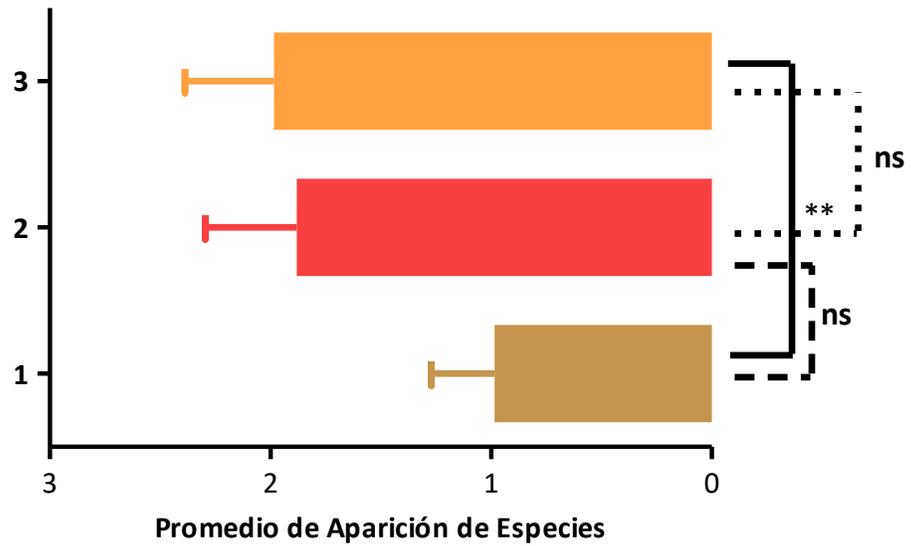


Figura 11 Comparación de aparición de especies de bacterias propias de microbioma de *Oreochromis niloticus* obtenidas por bacteriología clásica.

*Kruskal-Wallis *post hoc* múltiple de Dunn's $p < 0.05^{**}$ entre el primer y tercer muestreo; ns= sin diferencia significativa

De acuerdo con el análisis del número de aislados obtenidos por órgano analizado, la branquia es el tejido con presencia bacteriana con 66% en el primer muestreo, 28% en el segundo y 87% en el tercero, seguido por intestino con 15%, 25% y 11% respectivamente. Se encontraron valores con baja proporción porcentual del total poblacional bacteriano en el hígado y bazo. Únicamente se obtuvieron aislados de gónada en el primer muestreo con un 16% (Figura 12).

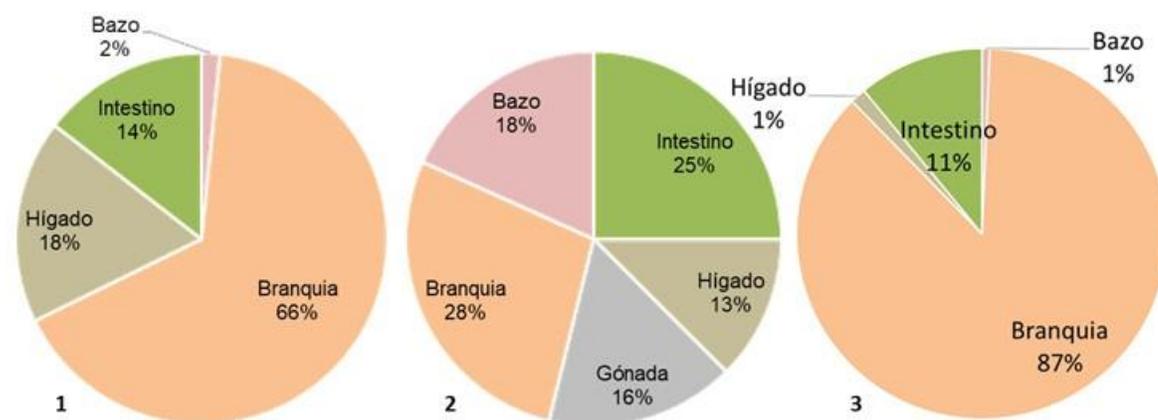


Figura 12 Proporciones poblacionales de la microbiota bacteriana cultivable en los órganos analizados por métodos bacteriológicos clásicos de *Oreochromis niloticus* sanas de cultivo.

La composición poblacional bacteriana de *O. niloticus* corresponde a la riqueza cultivable en la cual es más abundante el actinomicetal *Kocuria varians* (12%) seguida de *Aeromonas hydrophila* y *Bacillus firmus* con 5% respectivamente seguida de una población con representaciones relativamente homogéneas de 3 a 1% con organismos como: *Microbacterium dextranolyticum*, *M. lacticum*, *Micrococcus luteus*, *M. luteus*, *Lactococcus* sp., *Manheimia haemolytica*, *Cellulomonas* sp., entre otros; el 23.85% está conformado por especies del género *Staphylococcus* spp. (Figura 13).

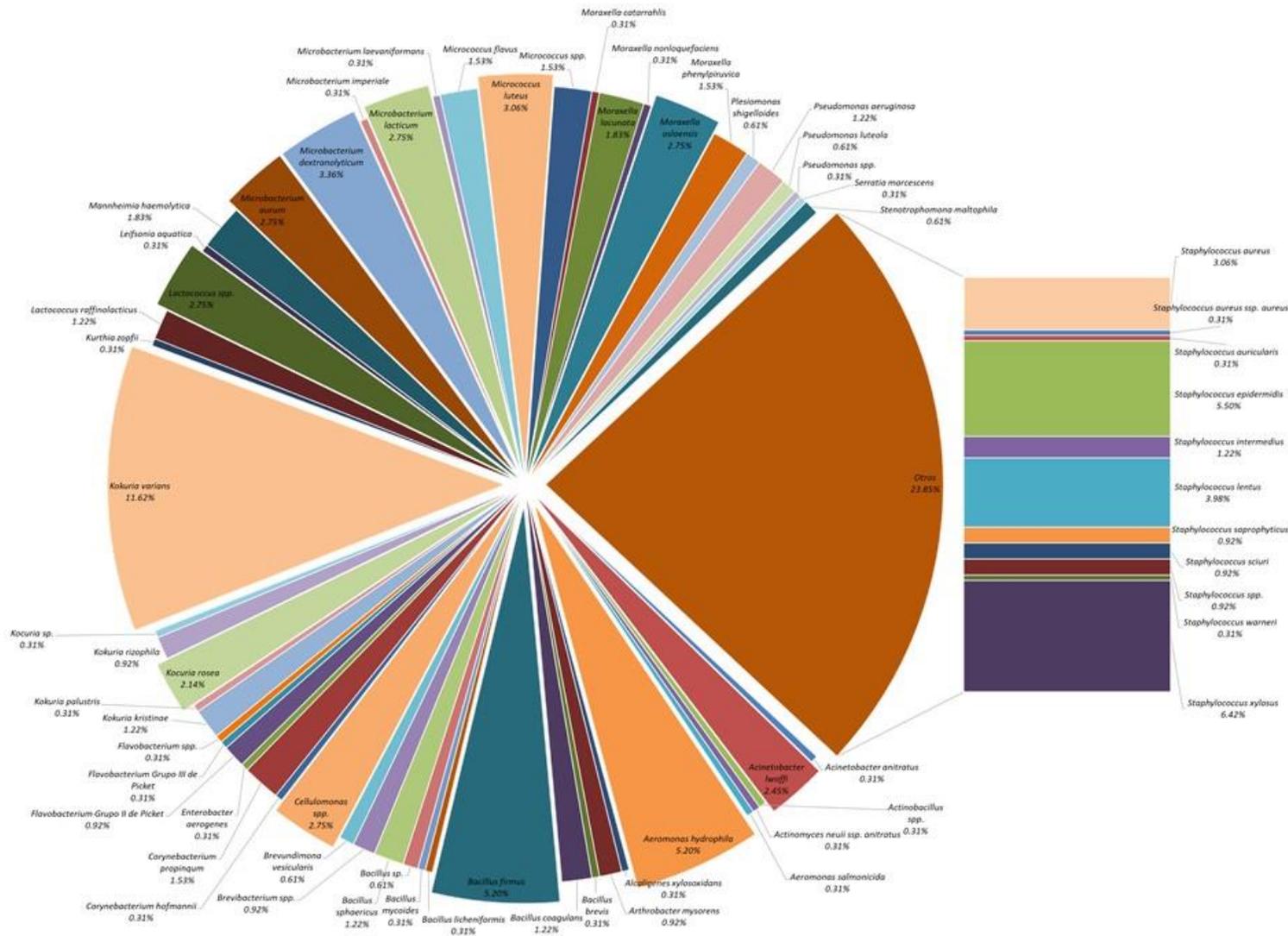


Figura 13 Composición poblacional del microbioma bacteriano de *Oreochromis niloticus* obtenida por taxonomía clásica.

Caracterización de Microbioma de *O. niloticus* por Secuenciación Masiva (NGS)

Análisis Metagenómico

Al analizar el microbioma de tilapias aparentemente sanas por NGS, se obtuvieron resultados promedio de 48% a 98% de secuencias consenso mapeadas del total de lecturas obtenidas, a excepción de la granja 8 (Cuadro 7).

Cuadro 7 Relación de lecturas obtenidas en Ion Reporter del microbioma por muestreo de *Oreochromis niloticus* en diferentes granjas de cultivo.

	G1*	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
Lecturas totales	112,979	64,934	94,274	66,274	12,646	53,933	74,662	267	96,797
Lecturas válidas totales	56,632	32,342	46,348	32,495	12,005	26,581	37,375	128	48,013
Lecturas mapeadas	36,456	19,284	28,342	20,553	11,783	15,683	24,188	59	31,552
Lecturas no mapeadas	20,176	13,058	18,006	11,942	222	10,898	13,187	69	16,461

*G1-G9: número de granja muestreada.

En cuanto a los datos de riqueza específica se tuvo una representatividad de 353 familias, 910 géneros y 889 especies. Con los datos de abundancia por el estimador de Chao 1 se observa que G7 presenta mayor riqueza en los niveles taxonómicos de familia y género seguida de los organismos de G3, esta última es la que presenta mayor riqueza de especies. Los organismos de los muestreos G2 y G5 son los que presentan menores valores en los tres niveles taxonómicos (Figura 14).

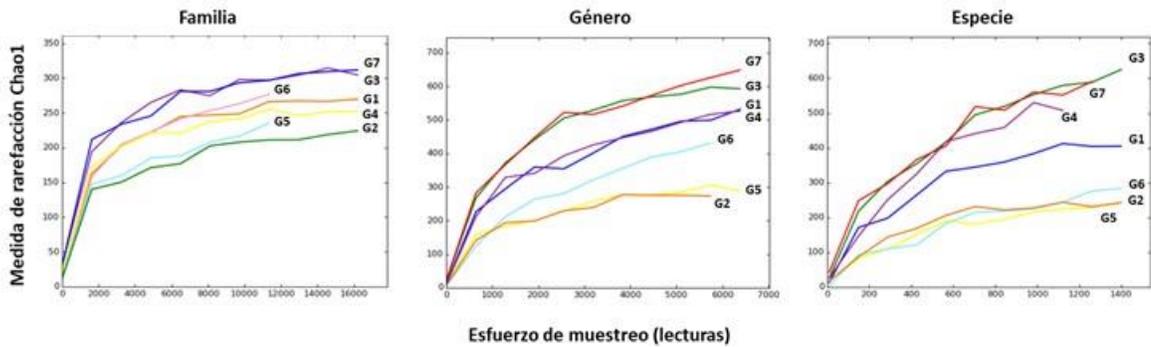


Figura 14 Curva de acumulación de la riqueza observada de Chao 1 del microbioma bacteriano de *Oreochromis niloticus*, tomando en cuenta las especies representadas con un solo individuo y taxones con 2 individuos.

De acuerdo con el índice de Shannon-Weaver (1949) los muestreos cuentan con una diversidad alta, <3.0 a nivel de familia, género y especie a excepción del muestreo G6. Se observa una tendencia general con aumento de diversidad a nivel taxonómico menor (Figura 15).

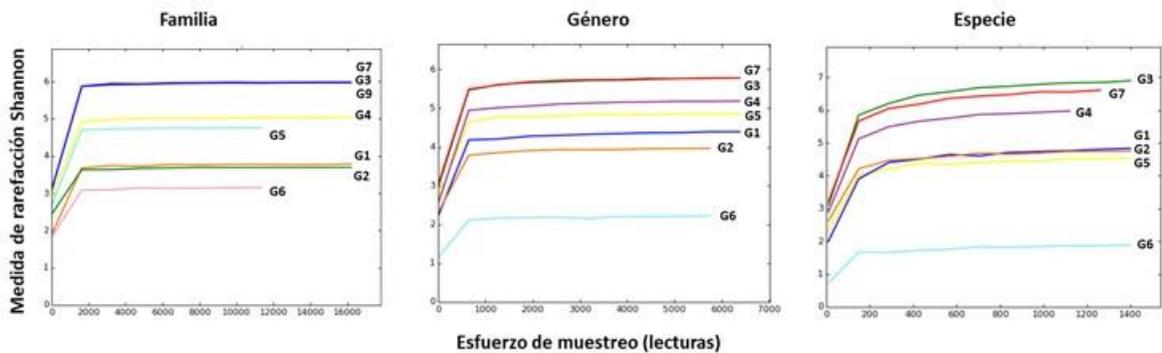


Figura 15 Curva de acumulación de la abundancia observada de Shannon-Weaver (1949), del microbioma bacteriano *O. niloticus*.

*Valores <2 baja diversidad, >3 alta diversidad.

A mayor diversidad de especies los valores de dominancia son menores, lo que se comprueba en el microbioma bacteriano de *O. niloticus* el cual presenta valores inferiores

a 1.0 de dominancia en los tres niveles taxonómicos. Esta dominancia es relativamente homogénea en los tres niveles taxonómicos evaluados, a excepción de G6, debido a la menor cantidad de lecturas obtenidas (Figura 16).

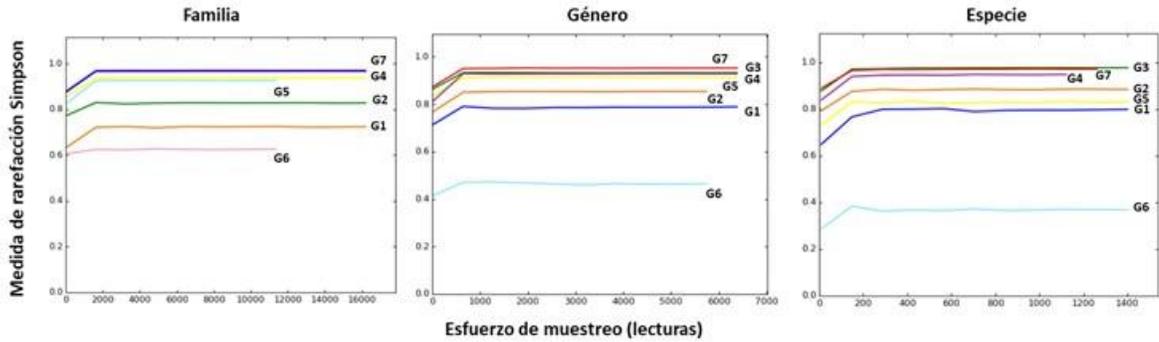


Figura 16 Curva de acumulación de dominancia de Simpson, del microbioma bacteriano de *Oreochromis niloticus*, teniendo en cuenta la probabilidad de que dos microorganismos, dentro de un hábitat, seleccionados al azar, pertenezcan a la misma especie.

La composición poblacional del gen 16S obtenida por NGS de *O. niloticus*, dentro de las 50 familias con mayor número de lectura, cuenta con una mayor representatividad de las familias Rhodobacteraceae en G1, G3, G4, G7 y G9, Fusobacteraceae en G2, G4, G6, G7 y G9, mientras que en tercera posición de abundancia se encuentra Enterobacteraceae primordialmente en G1, G2, G3, G4, G7 y G9 con menor representatividad en G6. Se obtuvieron pocos datos de representación en G8 (Figura 17).

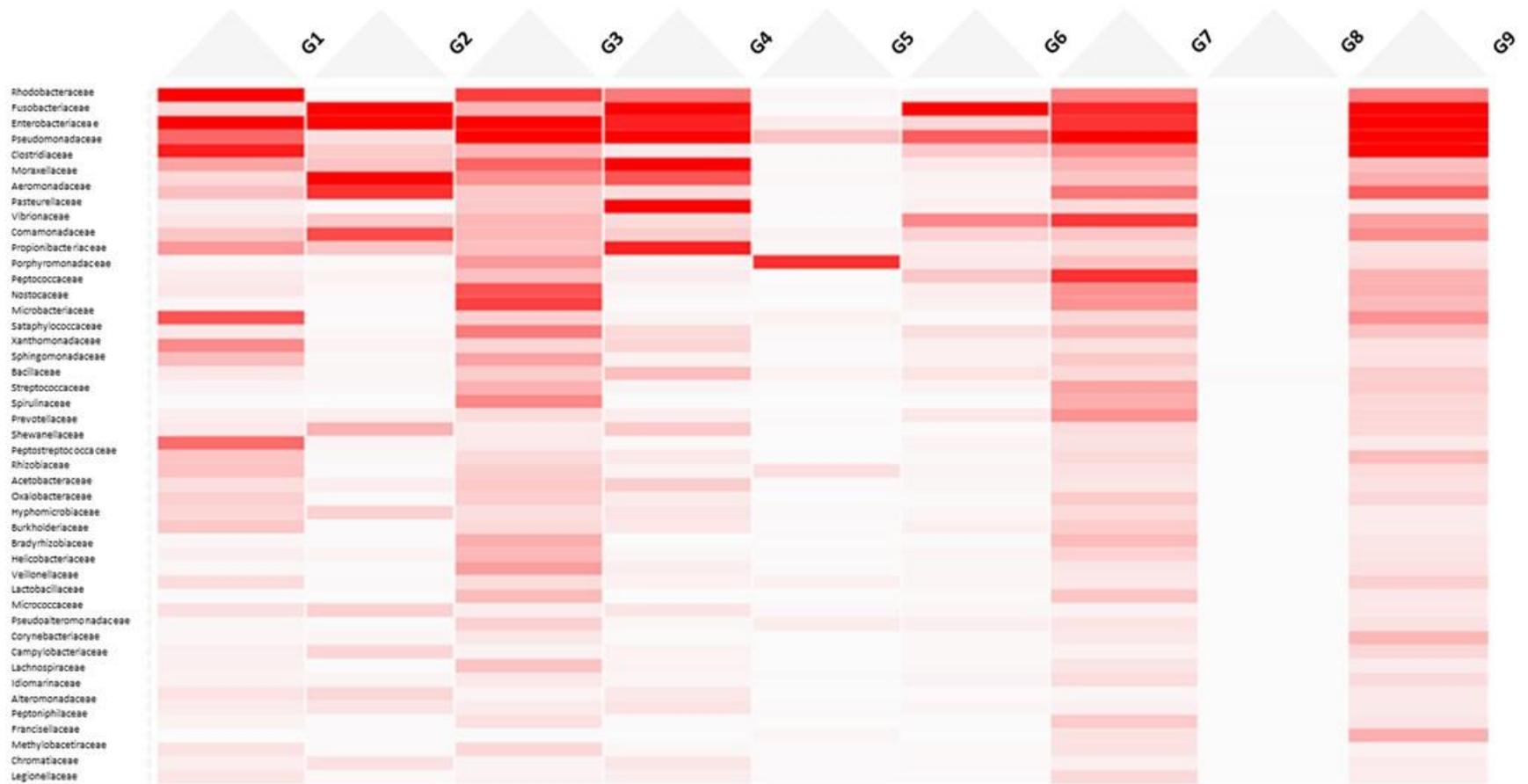


Figura 17 Abundancia poblacional bacteriana por muestreos de *Oreochromis niloticus* a nivel de Familia.

En el nivel de Género se observa una dominancia de *Cetrobacterium* en los muestreos G2, G4, G6, G7 y G9, seguida de *Pseudomonas* en la mayoría de las granjas, pero con menor presencia en G1 y G7, y ausente en G8. *Clostridium* se encuentra representado con abundancia en G1 y G9, *Plesiomonas* con abundancia en G1 y G2, y *Acinetobacter* presenta mayor abundancia en G3 y G4 (Figura 18).

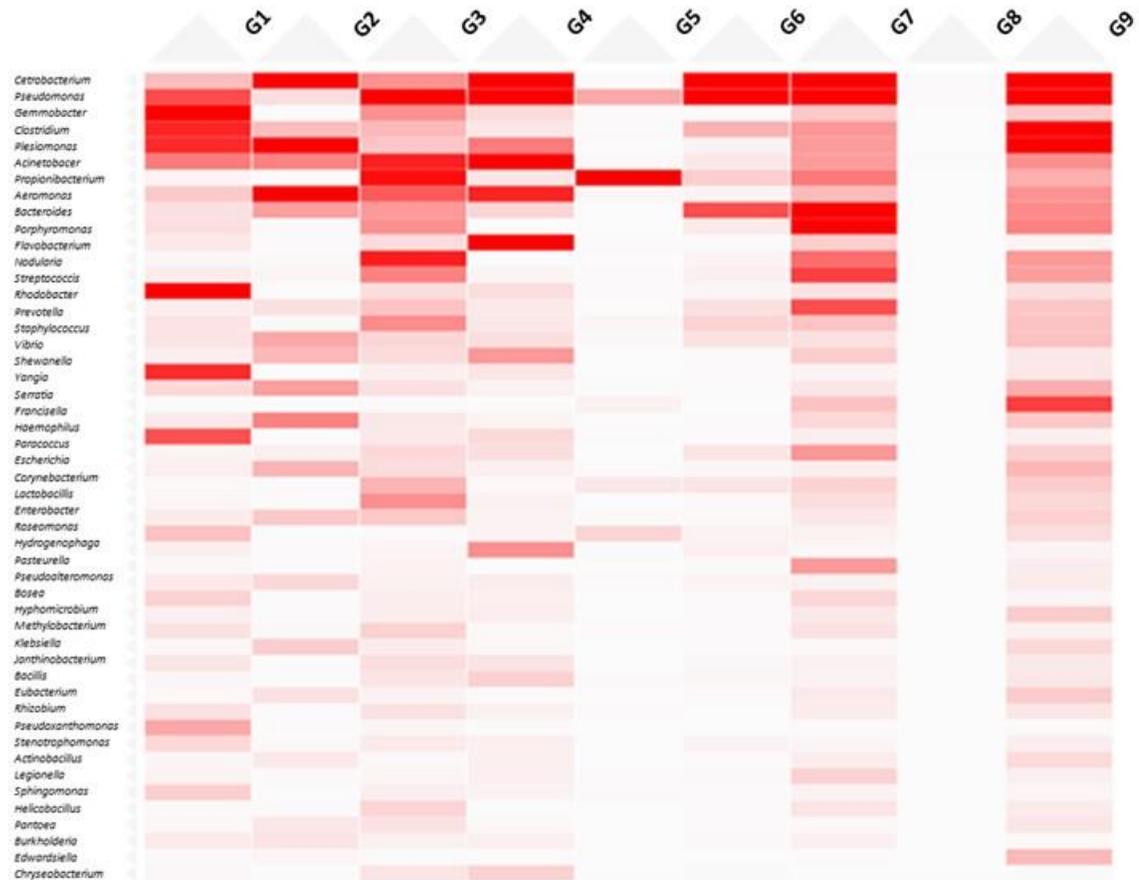


Figura 18 Abundancia poblacional bacteriana por muestreo de *Oreochromis niloticus* a nivel de género.

Al nivel de especie tiene dominancia *Cetrobacterium somerae* en G2, G4,G5,G6,G7 y G9 ausente en G5 y con abundancia media en G1 y G3. *Plesiomonas shigelloides* se encontró constante, pero con mayor variación entre granjas, seguida de *Gemmobacter aquaticus*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas hydrophila* y *Acinetobacter lwoffii* (Figura 19).



Figura 19 Abundancia poblacional bacteriana por muestreo de *Oreochromis niloticus* a nivel de especie.

La composición poblacional del microbioma bacteriano del 16s de *O. niloticus* obtenido, se encontró representado en un 99.998 % por organismos del Reino Bacteria y 0.002% del Reino Archaea. El Phylum Proteobacteria predominó con 52%, seguido de Fusobacteria (16%), Firmicutes (12%), Actinobacteria (9%), Bacteroidetes (8%), 2% de Cyanobacteria y 32 Phyla más que conforman el 1% restante los cuales son predominantemente organismos extremófilos de los Phyla Deinococci, Thermosulfobacteria, Thermotogae, Hydrogenedentes y Aquificae entre otras, y algunas de importancia ambiental como Planctomycetes, Nitrospirae, Chlorobi y otros (Figura 20).

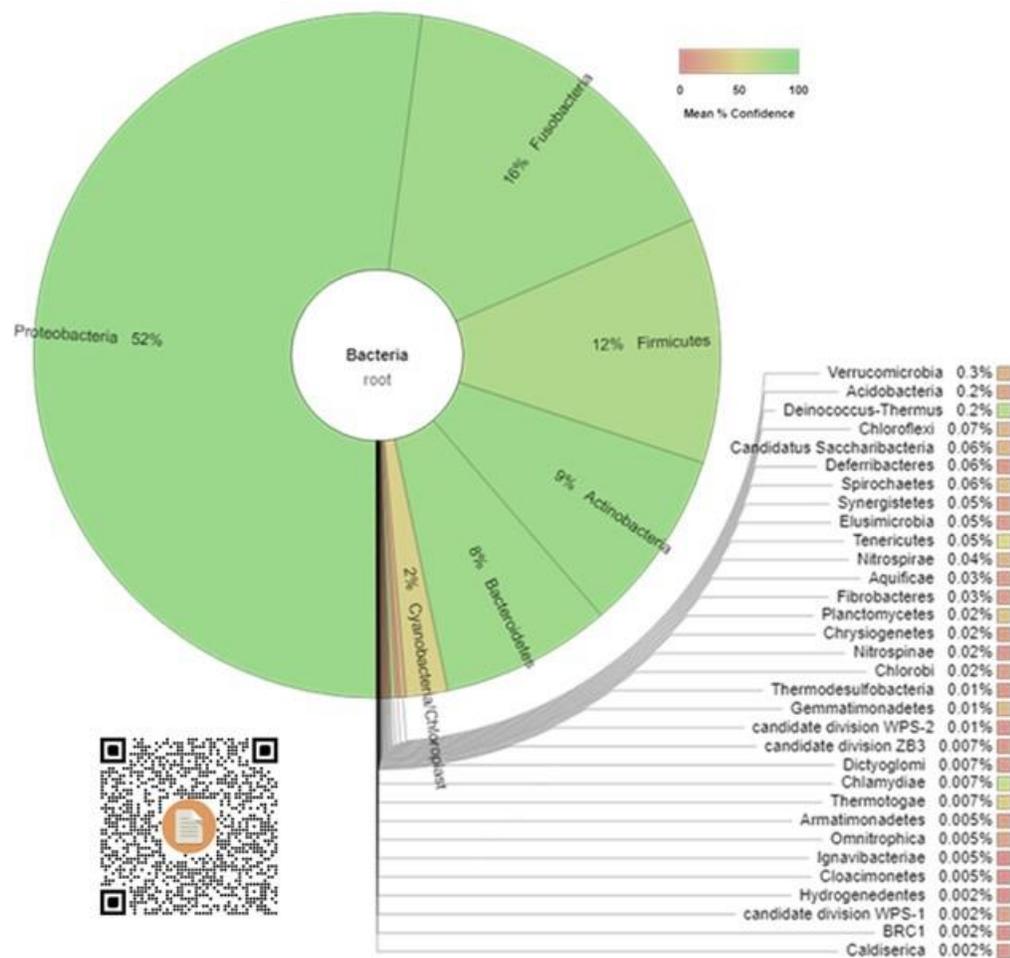


Figura 20 Composición poblacional de Reino y Phyla bacterianos de *Oreochromis niloticus* por secuenciación masiva (NGS) del 16S.

*Referencia detalla en código QR anexo a imagen.

Dentro de estos Phyla las Clases predominantes son Gammaproteobacteria con 32%, Fusobacteria con 16%, Alphaproteobacteria con 13%, Actinobacteria (9%), Clostridia (8%), Betaproteobacteria 6%, Bacteroidia (5%), Bacilli (3%), Flavobacteria (2%) y Chloroplast (2%) (Figura 21).

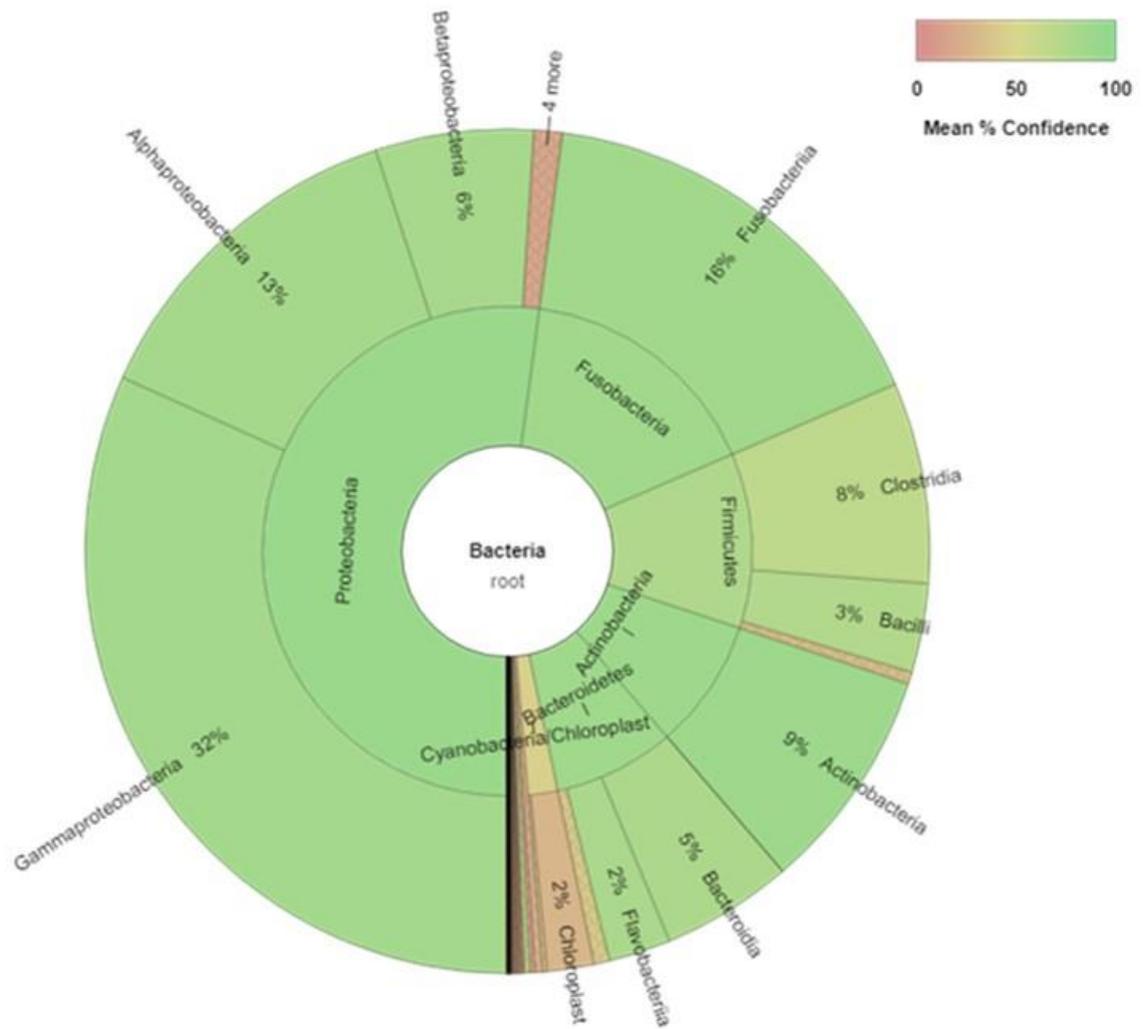


Figura 21 Composición poblacional de Clases bacterianos de *Oreochromis niloticus* por secuenciación masiva (NGS) del 16S.

Los géneros más representativos de las bacterias que fue posible determinar su taxonomía hasta este nivel son *Cetobacterium* con 16%, *Gemmobacter* y *Plesiomonas* 5% respectivamente, *Pseudomonas* 4% y *Francisella* 3%. El resto se encuentra conformado por representatividad de los Géneros bacterianos de 2% o menor. De las 1,302 especies se hizo una selección de las 50 más representadas de ellas *Cetobacterium somerae* es la especie más abundante con 47%, seguida de *Plesiomonas shigelloides* con 9%, *Propionibacterium acnes* con 7%, *Pseudomonas* sp. 3%, *Acinetobacter lwoffii* y *Nodularia sphaerocarpa* 2% respectivamente, el 30% restante compuesto por una población heterogénea con porcentajes poblacionales de $\pm 1\%$ (Figura 22).

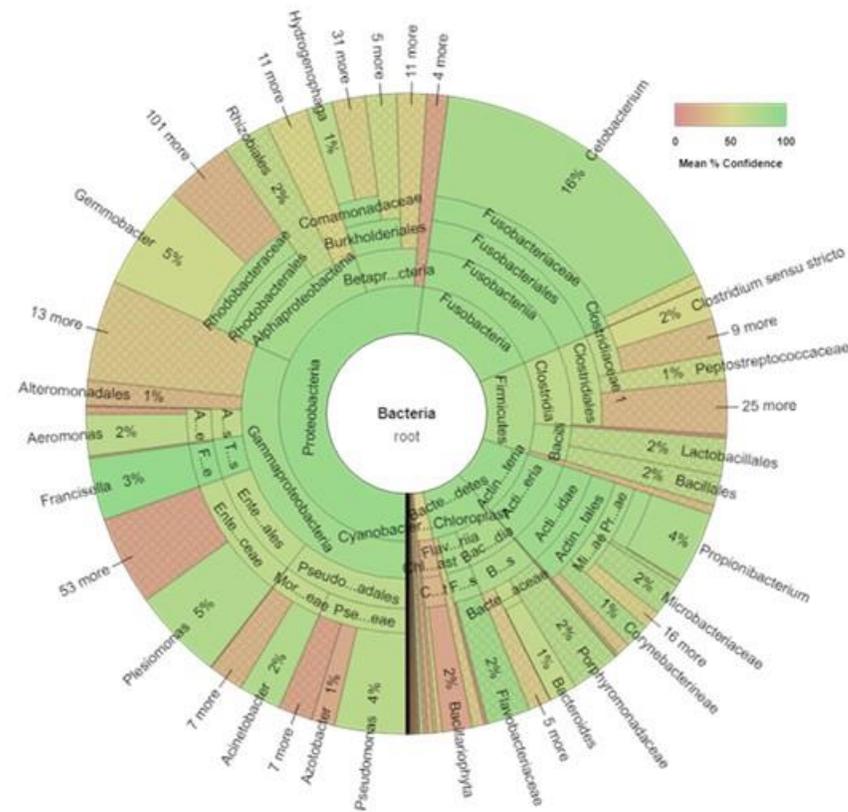


Figura 22 Composición poblacional con los niveles taxonómicos de Phyla, Familias, Ordenes, Clases, Géneros y Especies bacterianos de *Oreochromis niloticus* por secuenciación masiva (NGS) del 16S.

El análisis al nivel de especie muestra una dominancia de *Cetrobacterium somerae* con un 30.61%, la cual es abundante en el sistema digestivo de peces dulceacuícolas, seguida de *Gemmobacter aquaticus* con 12.22%, *Propionibacterium acne* con 9.72%, *Plesiomonas shigelloides* con 4.92% (reportada como patógeno facultativo de *Oreochromis* spp., Sierralta et al., 2016) y *Pseudomonas* sp. 4.75%, seguidas de especies ambientales, comensales y saprófitas como *Acinetobacter johnsonii*, *Nodularia spaerocarpa*, *Acinetobacter lwoffii*, *Shewanella* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas veronii*, *Vibrio* sp., *Rhodobacter*, *Fusobacterium necrophorum* entre otras de 2.28 a <1% (Figura 23).

El 13.48% está representado por bacterias patógenas o potencialmente patogénicas de importancia en inocuidad, representadas por *Haemophilus parainfluenzae* 2.28%, *Bacteroides* sp. 1.68%, *Escherichia coli* 1.50%, *Serratia marcescens* 0.95%, *Pseudomonas putida* 0.72%, *Pseudomonas aeruginosa* 0.6%, *Salmonella entérica* 0.66% y *Shigella flexneri* 0.44 %, entre otras (Figura 23).

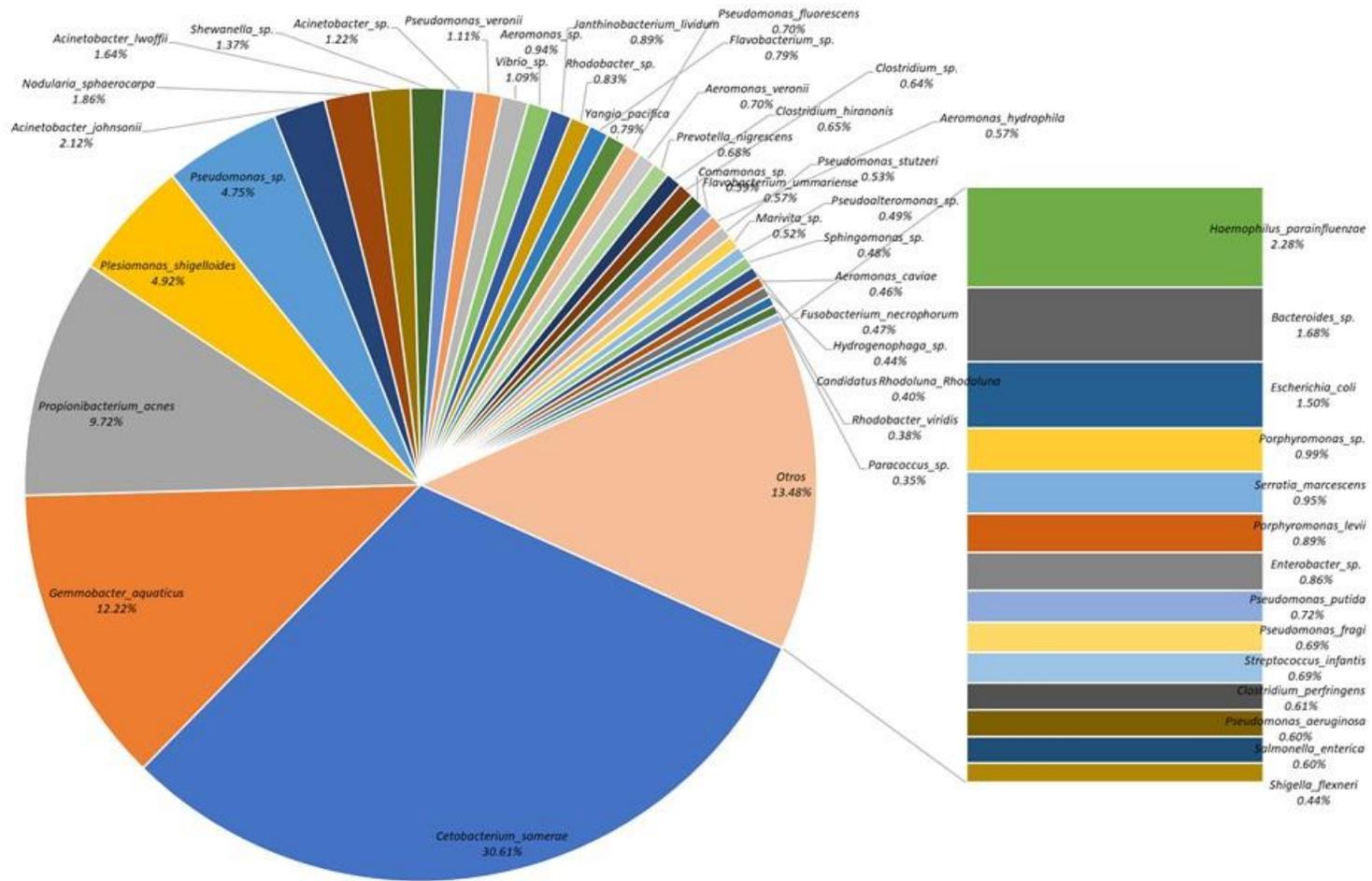


Figura 23 Composición poblacional bacteriana de especies del microbioma bacteriano de *Oreochromis niloticus*, obtenida por secuenciación masiva (NGS) del 16S.

En los análisis metagenómicos, las secuencias no mapeadas en las bases de referencia se desechan; sin embargo, estas secuencias pueden mapear en regiones que no están incluidas en las bases de datos utilizadas, por lo que se realizó un ejercicio utilizando las secuencias no mapeadas obtenidas por el software del secuenciador con el paquete programático Geneious. Se obtuvo un conteo de 159, 553 bacterias identificadas al utilizar secuencias no mapeadas contra 41,569 bacterias identificadas al usar secuencias mapeadas. Se observa un cambio en la proporción poblacional con una distribución más homogénea, con cierta dominancia del género *Abiotrophia* con 16 % (Consultar el código QR de la figura 24) comparado con el análisis de las mapeadas donde domina *Cetobacterium* con 16% (Figura 24). De igual forma se amplía la diversidad del Phylum Archaea. Las Archaea identificadas fueron: Pyrodictiaceae (género *Pyrolobus*), Desulfurococcaceae, Acidibaceae (género *Acidilobus*), Thermoproteaceae, Methanopyraceae (género *Methanopyrus*), Ferroplasmaceae (género *Ferroplasma*), Thermoplasmatales (género *Thermogymnomonas*), Methanomassiliicoccaceae (género *Methanomassiliicoccus*), Methermicoccaceae (género *Methermicoccus*), Methanosarcinaceae (géneros *Methanimicrococcus* y *Methanosalsum*), Methanoregulaceae (géneros *Methanomicrobium*, *Methanoregula* y *Methanosphaerula*), Methanomicrobiaceae, Halobacteriaceae (géneros *Salarchaeum*, *Halocalculus*, *Halapricum*, *Salinirubrum*, *Halomarina*, *Halorubellus*, y *Salinarchaeum*) y Archeoglobaceae (Figura 24).

Al comparar el microbioma bacteriano por sistema y materiales de cultivo de las granjas analizadas, como una primera aproximación, se observó que en los sistemas CSI se presentó mayor abundancia de especies de la microbiota bacteriana en los tres niveles taxonómicos evaluados: familia, género y especie de acuerdo con el índice de abundancia de Chao, mientras que los sistemas CI y GI presentaron índices semejantes seguido por el sistema GSI con menor abundancia en los tres niveles taxonómicos.

De acuerdo al índice de diversidad de Shannon, los sistemas producidos en sistemas CSI tienen mayor diversidad de la microbiota asociada, en los tres niveles taxonómicos. Por otro lado, el sistema CI tiene una diversidad menor a nivel de familia seguida por GI y GSI. Sin embargo, se observa un aumento en el índice de diversidad a nivel de género y especie para el sistema GI.

De acuerdo con el índice de dominancia en el sistema CSI este es mayor en los tres niveles taxonómicos evaluados, seguido por los sistemas CI, GSI Y GI respecto a las familias y géneros detectados. Sin embargo, a nivel de especie hay un aumento de dominancia con respecto a las familias y los géneros presentes en el sistema GI (Figura 25).

En los tres índices de estimaciones poblacionales se observa un notable comportamiento al alza en la microbiota asociada a *O. niloticus* del sistema CSI en los niveles taxonómicos de familia, género y especie.

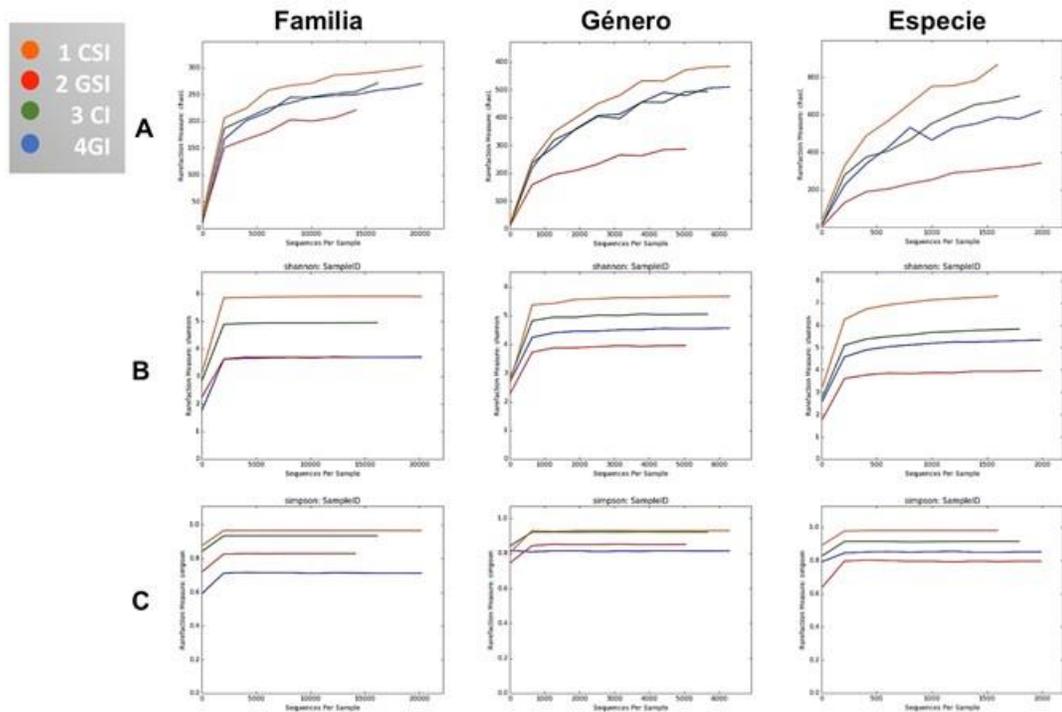


Figura 25 Índices de biodiversidad de la microbiota bacteriana de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en diferentes niveles taxonómicos.

***A)** Abundancia de Chao, **B)** Diversidad de Shannon, **C)** Dominancia de Simpson. CSI: concreto semi intensivo, GSI: geomembrana semi intensivo, CI: concreto intensivo, GI: geomembrana intensivo.

Cada sistema de cultivo se comporta de forma independiente y único tanto a nivel de familia como de género y especie. Hay una mayor concordancia de la microbiota en los sistemas CSI y CI formando un “clúster” que tiene menor concordancia con los sistemas GSI y GI (Figura 26).

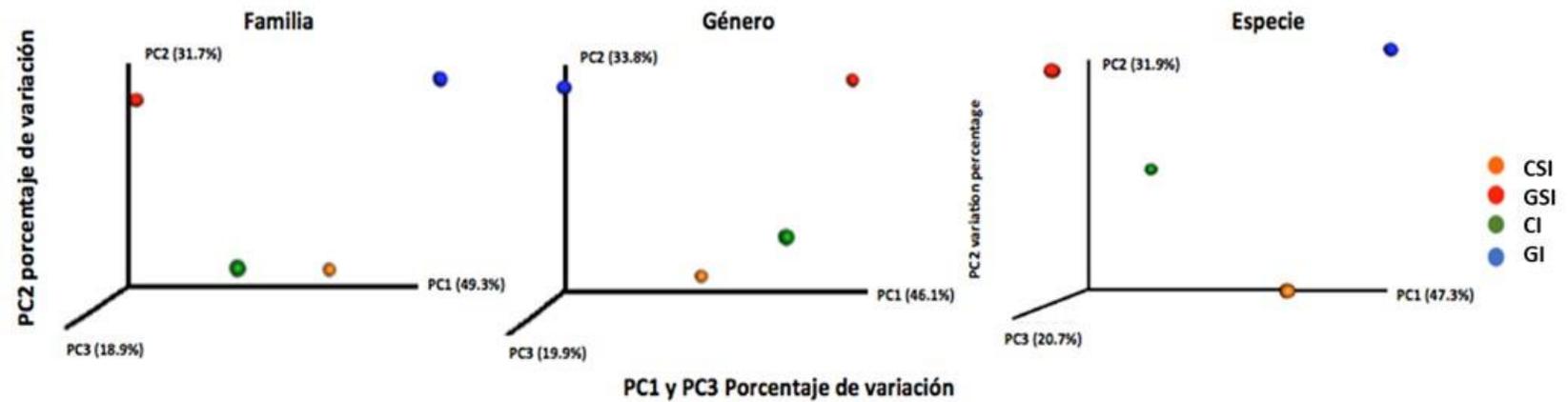


Figura 26 Análisis de diversidad beta de Bray Curtis (Clúster de similitud) por coordenadas principales (PCoA) para visualizar la disimilitud de comunidades microbianas entre diferentes sistemas de cultivo de *Oreochromis niloticus*.

*CSI: concreto semi intensivo. CSI: concreto semi intensivo, GSI: geomembrana semi intensivo, CI: concreto intensivo, GI: geomembrana intensivo.

Se observó la dominancia del Phylum Proteobacteria en 75% de las granjas analizadas (3/4) y de Fusobacteria en el 25% (1/4). En el caso de los sistemas semi intensivo e intensivo con recubrimiento de concreto se observa la presencia de Fusobacteria con mayor abundancia en CSI con un 63% y 19% para CI. En los sistemas de geomembrana tanto semi intensivo como intensivo hay una dominancia del Phylum Proteobacteria con 83% y 54% respectivamente. En las cuatro categorías se detectó la presencia de Firmicutes Seguido de Bacteroidetes y Actinobacteria.

Se detectaron bacterias por NGS con pocos o nulos reportes anteriores en *O. niloticus*. Muchas de estas son bacterias cuyas condiciones de cultivo son complejas o no se cuenta actualmente con la biotecnología de cultivo de las mismas, teniendo como consecuencia poco conocimiento al respecto de estas. De las bacterias antes mencionadas detectadas por NGS son de los Phyla: Aquificae, Chlorobi, Thermosulfobacteria, Chloroflexi y Deferribacteres (Figura 27).

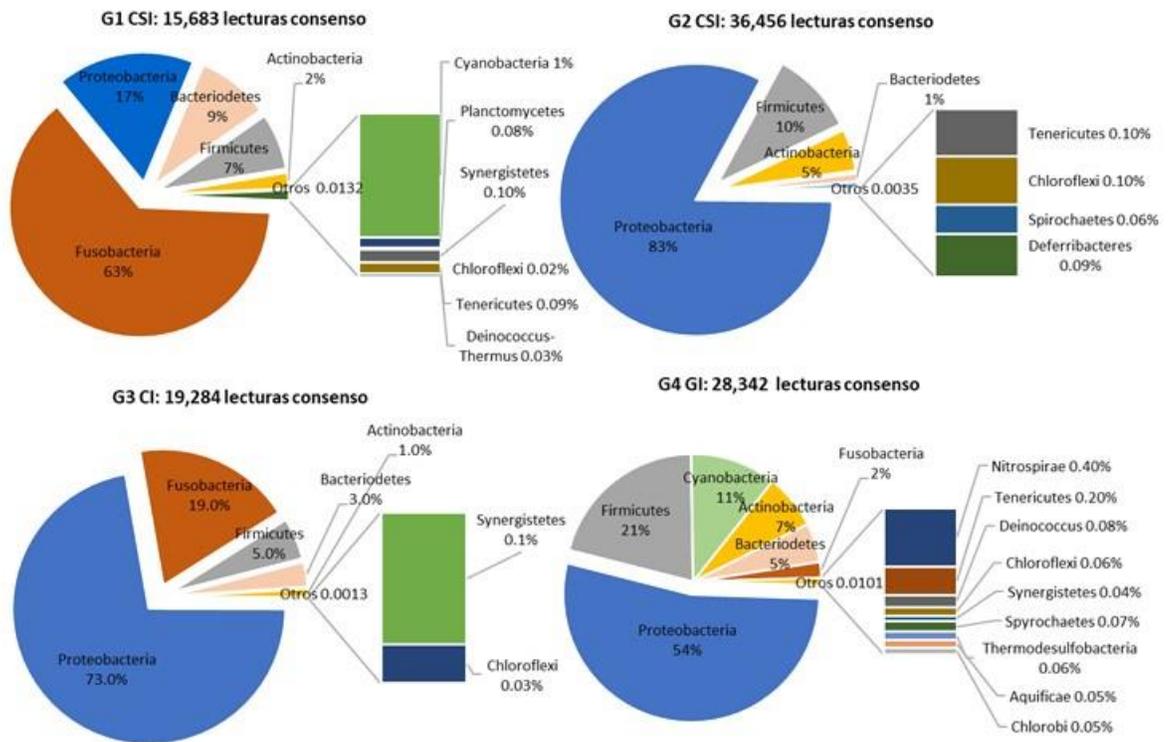


Figura 27 Composición proporcional de la microbiota bacteriana de tilapia (*Oreochromis niloticus*) agrupados por nivel taxonómico de Phylum en diferentes sistemas de producción.

*CSI: concreto semi intensivo. CSI: concreto semi intensivo, GSI: geomembrana semi intensivo, CI: concreto intensivo, GI: geomembrana intensivo.

Se observó mayor diversidad a nivel de familia del microbioma de *O. niloticus* en los sistemas de producción CSI, 20% representado por Pseudomonadaceae (14%), Aeromonadaceae (3%) y Staphylococcaceae (3%) y en el 80% restante se encuentra la representación de 9% Enterobacteriaceae, 5% Nostocaceae, 4% Peptococcaceae y Moraxellaceae) seguido de CI (27% representado por Pseudomonadaceae (10%), Aeromonadaceae (6%) y Fusobacteriaceae (11%). GI y GSI son los que presentaron mayor representatividad de ciertas familias como Enterobacteriaceae (36%) y Rhodobacteraceae (57%) (Figura 28).

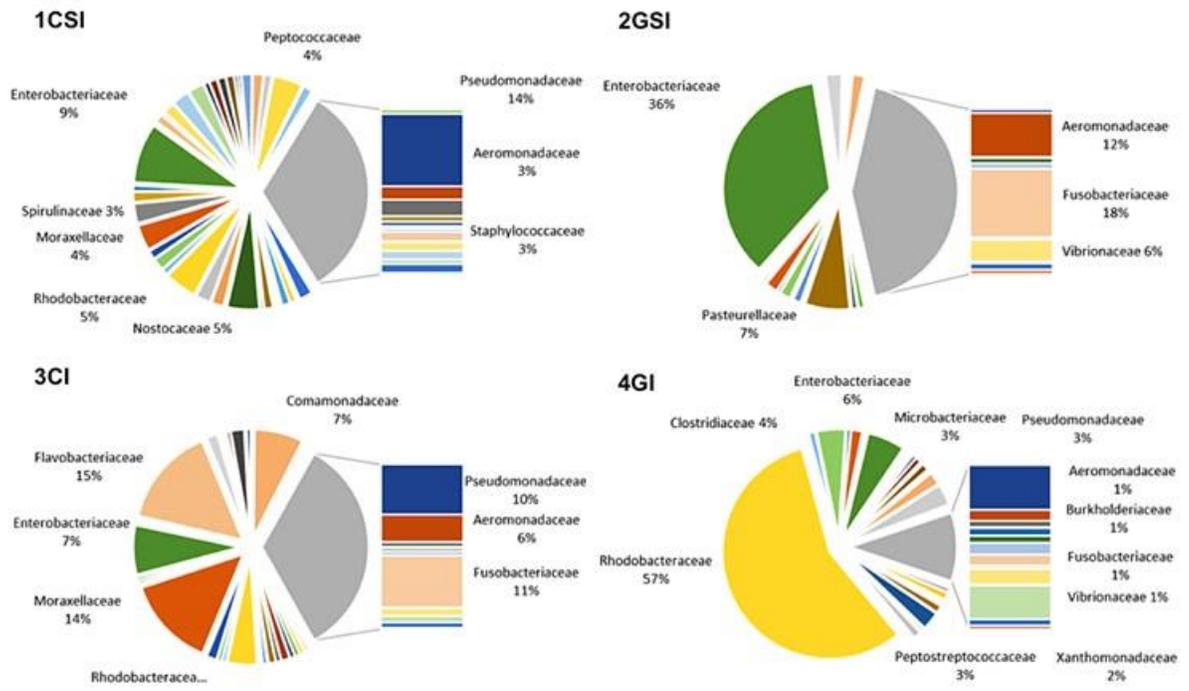


Figura 28 Composición proporcional de la microbiota bacteriana de tilapia (*Oreochromis niloticus*) agrupados por nivel taxonómico de Familia en diferentes sistemas de producción.

***CSI:** concreto semi intensivo. **CSI:** concreto semi intensivo, **GSI:** geomembrana semi intensivo, **CI:** concreto intensivo, **GI:** geomembrana intensivo.

En el mapa de calor de las familias más representativas, se observa una similitud de la microbiota presente en los sistemas SI diferentes a los intensivos independientemente del tipo de recubrimiento de los sistemas de producción. Sin embargo, se observa un patrón de abundancia de lecturas particular para cada sistema de cultivo. En el sistema GSI predominan las familias Acetobacteraceae, Micrococcaceae, Hyphomicrobiaceae, Rhodocyclaceae, Oxalobacteraceae, Pseudomonadaceae, Methylococcaceae, Bacillaceae, Legionellaceae, Rhizobiaceae, Bradyrhizobiaceae. En el sistema CI: Lachnospiraceae y Burkholderiaceae, en GI Aeromonadaceae y Bacteroidaceae y para CSI Idiomarinaceae, Pseudoalteromonadaceae y Chromatiaceae. Las familias con más de 100 lecturas fueron seleccionadas con un total de 56 familias representadas (Figura 29).

Nocardiaceae, Staphylococcaceae, Mycobacteriaceae, *Clostridium* Familia XVIII probablemente *sedis* y Xanthomonadaceae en GI Shewanellaceae, Aeromonadaceae, *Clostridium* Familia XIII y CSI Alcaligenaceae y Shewanellaceae. En el mapa de calor se incorporan los OTUs de los géneros bacterianos de acuerdo a su asociación ecológica.

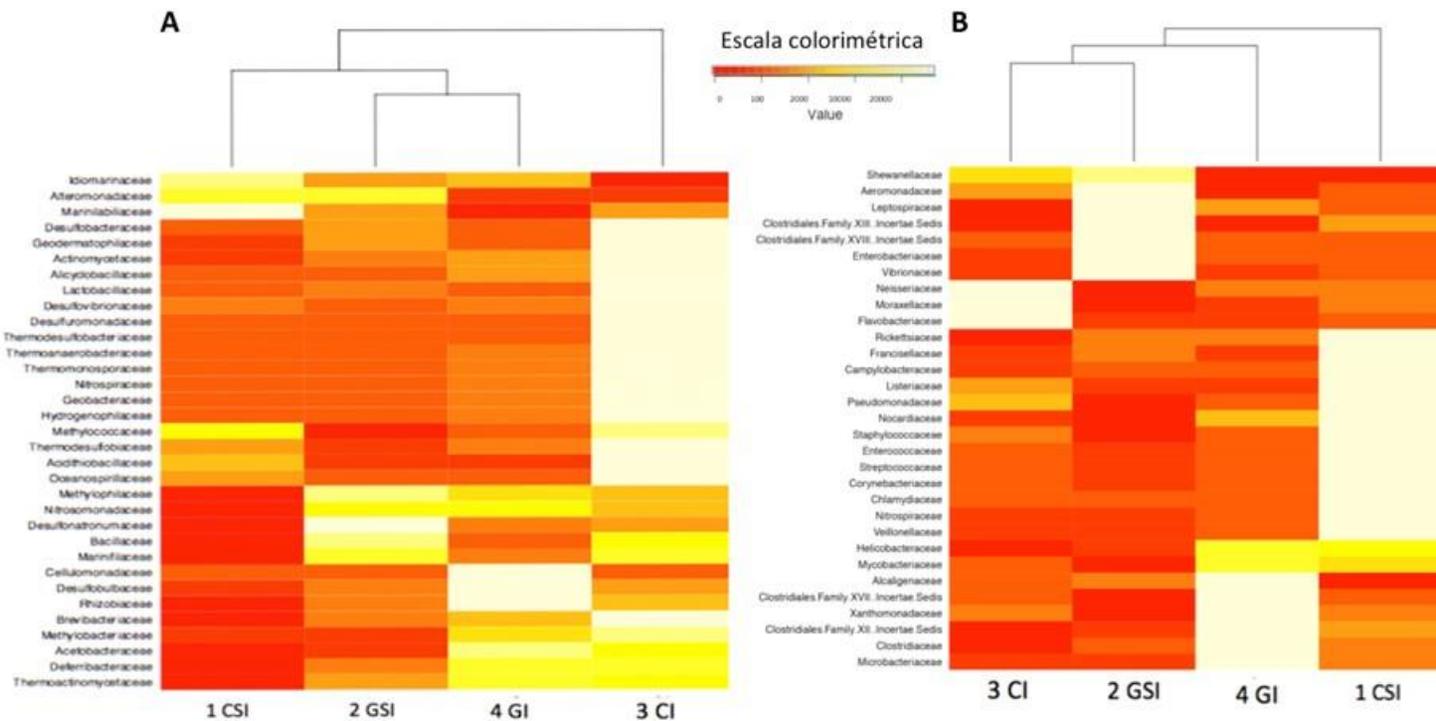


Figura 30 Comparación de la abundancia relativa de microbiota de *Oreochromis niloticus* en diferentes sistemas de producción representada en mapa de calor. Se incorporan los OTUs de los géneros bacterianos de acuerdo con su asociación ecológica.

* **A)** Bacterias ambientales más representativas, **B)** Bacterias patógenas más representativas. GSI: geomembrana semi intensivo, CI: concreto intensivo, GI: geomembrana intensivo y CSI: concreto semi intensivo.

Se analizaron las 40 especies con potencial patogénico del microbioma de *O. niloticus*, de las cuales *Aeromonas hydrophila* es la que mayor representatividad tiene, seguida de *Streptococcus infantis*, *Vibrio*, *Aeromonas venornii* y *Pseudomonas aeruginosa*. El sistema de cultivo con mayor representatividad de estas es CSI seguido de GI, CI y GSI respectivamente (Figura 31).

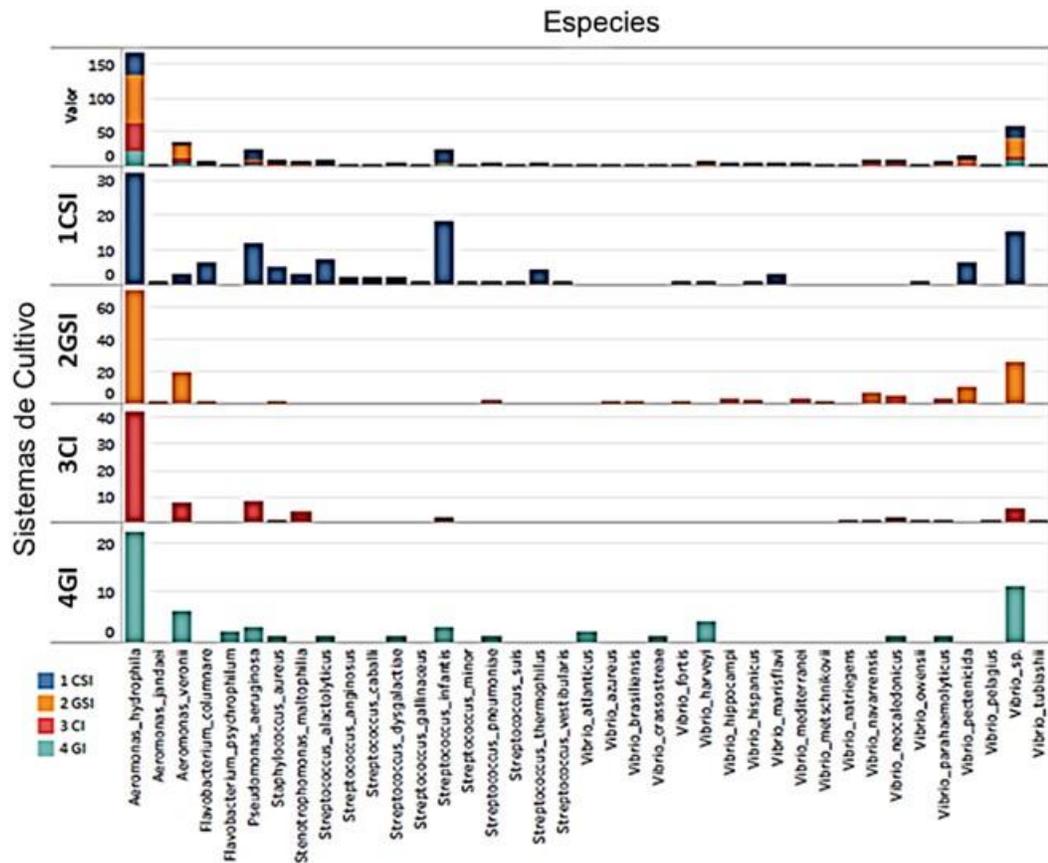


Figura 31 Bacterias con potencial patógeno mayormente representadas en tilapias sanas *Oreochromis niloticus* en diferentes sistemas de producción.

***CSI:** concreto semi intensivo. **CSI:** concreto semi intensivo, **GSI:** geomembrana semi intensivo, **CI:** concreto intensivo, **GI:** geomembrana intensivo.

Validación de Actinomycetales

Identificación de Actinomycetales por Bacteriología Clásica y Análisis Molecular por Secuenciación Sanger

Se obtuvieron las secuencias del gen 16S de los microorganismos pertenecientes al orden de los Actinomycetales que presentaron abundancia dentro de los aislados totales de la microbiota analizada de *O. niloticus*. Al comparar la clasificación taxonómica obtenida por bacteriología clásica y por secuenciación del gen 16S se observa una diferencia tanto a nivel de especie, como en el caso de *Microbacterium dextranoliticum*, como a nivel de género como *Microbacterium lacticum*/*Agromyces*, *Microbacterium imperiale*/*Rhodococcus*, *Corynebacterium propinquum*/*Arthrobacter*, *Brevibacterium*/*Arthrobacter*, *Actinomyces neuii*/*Kocuria* y *Cellulomonas*/*Arthrobacter* (Cuadro 8).

Cuadro 8 Clasificación por bacteriología clásica y análisis de 16S de aislados del grupo de los Actinomycetales de la microbiota bacteriana de *Oreochromis niloticus* cultivada.

API/Bioquímica	API ID	Número de acceso	ID	Cobertura
<i>Microbacterium dextranolicum</i> *	99.9%	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> KY936459.1	99%	99%
<i>Microbacterium aurum</i> *	99.9%	<i>Microbacterium</i> sp. KU560421.1	98%	96%
<i>Microbacterium lacticum</i> *	99.9 %	<i>Agromyces</i> sp. KF774201.1	99%	99%
<i>Microbacterium imperial</i>	99.7%	<i>Rhodococcus</i> sp. HQ652549.1	93%	91%
<i>Corynebacterium propinquum</i>	96.9%	<i>Arthrobacter</i> sp. HE662641.2	99%	96%
<i>Brevibacterium</i> sp.	99.2%	<i>Arthrobacter</i> sp. FN397658.1	99%	99%
<i>Actinomyces neuuii ssp. anitratus</i>	97.5%	<i>Kocuria</i> sp. MF188118.1	100%	99%
<i>Micrococcus luteus</i> *	99.9%	<i>Micrococcus luteus</i> AM237388.1	99%	99%
<i>Kocuria varians</i>	99.9%	<i>Kocuria</i> sp. MF188118.1	99%	99%
<i>Cellulomonas</i> sp.	99.9%	<i>Arthrobacter</i> sp. KT424987.1	99%	93%

*Para la clasificación se utilizó el sistema API con resultados a nivel de géneros y especies establecido según (Funke *et al.*, 1995).

Con los datos moleculares obtenidos se realizó el análisis filogenético por el método de máxima verosimilitud y la filogenia de la prueba *bootstrap*, comparando el gen de la bacteria 16S del presente estudio y las primeras 5 consultas de cada uno en el banco de datos. El análisis involucró 55 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 1135 posiciones en el conjunto final de datos (Figura 32).

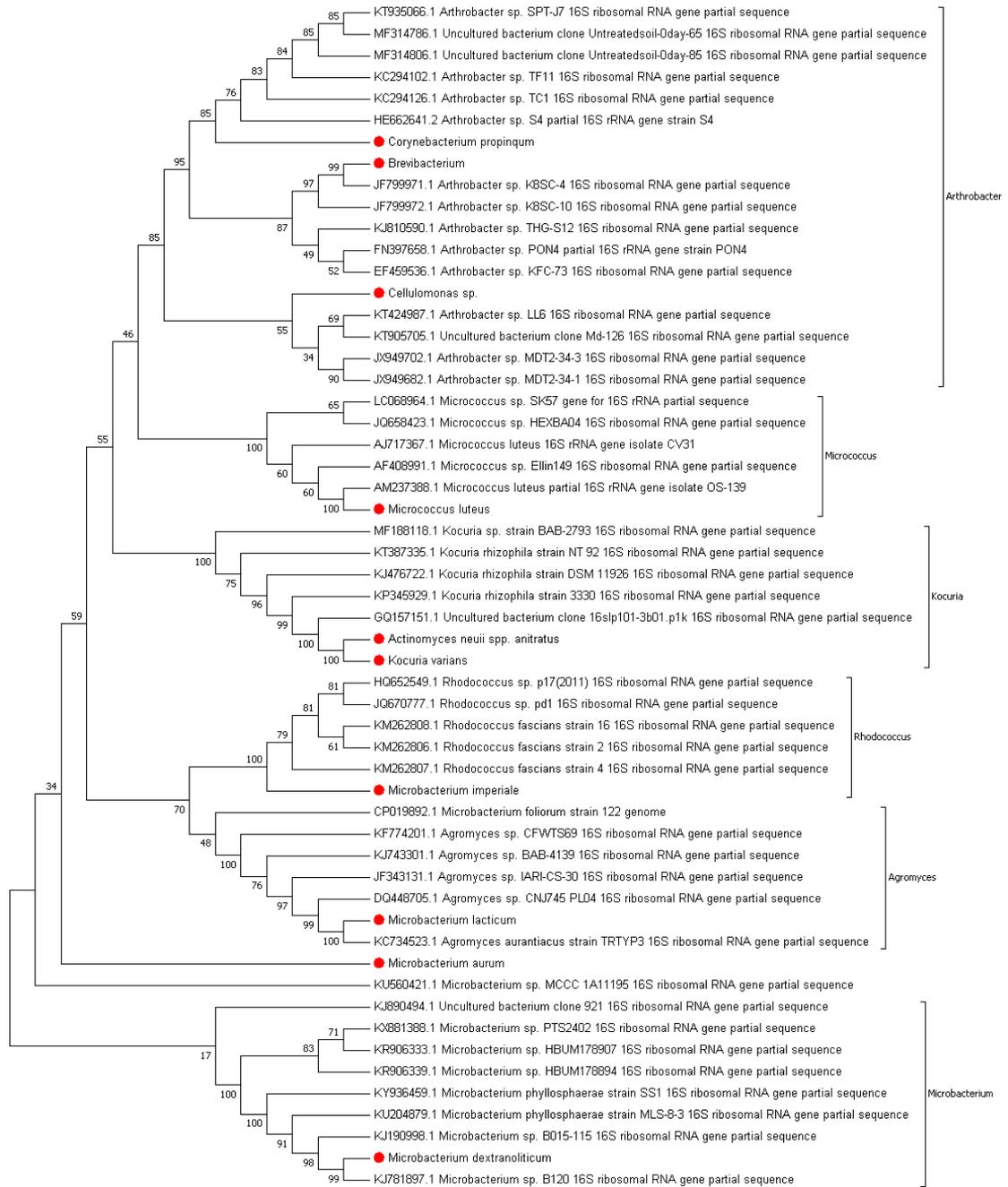


Figura 32 Árbol filogenético de máxima verosimilitud del 16S de microorganismos del orden de los Actinomycetales aislados por bacteriología clásica de la microbiota de *Oreochromis niloticus* cultivada y comparación filogenética con especies de mayor parentesco dentro del orden con el modelo Jukes-Cantor,1969.

*Muestras propias del presente estudio marcadas con el siguiente símbolo: ●

Detección de *Francisella* por Secuenciación Sanger y Secuenciación Masiva (NGS)

De la búsqueda bioinformática se obtuvieron reportes de *Francisella* para teleósteos de: Taiwán, Tailandia, Brasil, Costa Rica y México, con estas secuencias se realizó el alineamiento múltiple de secuencias CLUSTALW obteniendo una secuencia consenso para el gen sintético y el diseño de los oligos (Fig. 33A). Con los oligos **FWD Fran Sint 5'** GGA AAG CCT GTG AGT TAA TAG C 3' y **REV Fran Sint 5'** CTA CAC CAG AAG TTC CCT ATT C 3' se tuvo un amplificado de 262 pb (Fig. 33B).

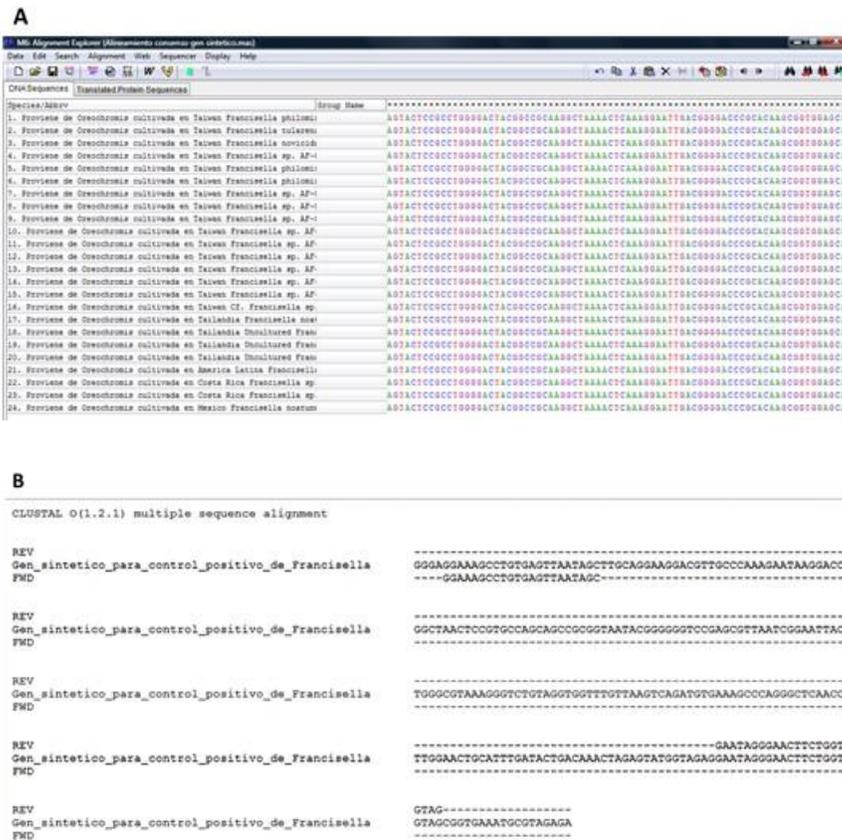


Figura 33 A) Alineamiento múltiple de secuencias CLUSTALW de *Francisella* spp. reportada para *Oreochromis niloticus* es Taiwán, Tailandia, Brasil, Costa Rica y México. B) ClustalO del gen sintético de *Francisella* con los oligos diseñados para 16S con un producto esperado de 262pb.

Por medio de PCR punto final con gradiente de temperatura se determinó 54 C de alineamiento como la óptima para el amplificado esperado (Figura 34A). Se detectó la presencia de fracciones moleculares (16S) de *Francisella* en el 55% de las granjas analizadas, 33.3% no se obtuvieron corregidas con calidad para análisis y 11.11% negativo a *Francisella* (Cuadro 9).

Se corroboró por medio de cultivo bacteriano sin lograr el aislamiento, por lo que se realizó PCR punto final a partir de la muestra origen utilizada para NGS y se obtuvo 100% de muestras positivas (Figura 34B).

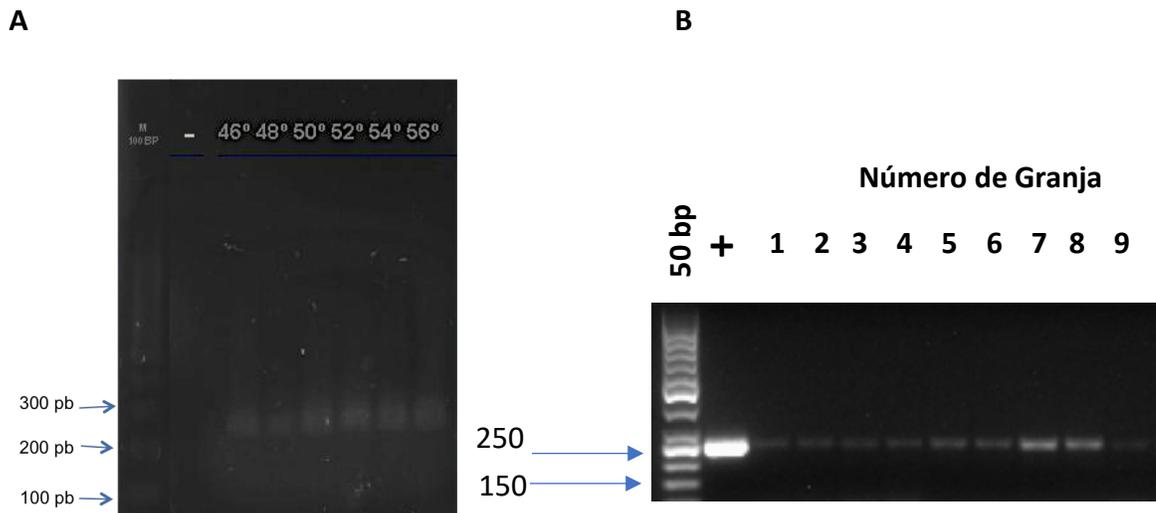


Figura 34 A) Estandarización de PCR punto final por gradiente de temperatura de una región conservada del gen 16s de *Francisella noatunensis*. Gel de agarosa al 1.5%, corrida de 60min a 100 v. B) Amplificado 16S *F. noatunensis*, fragmento esperado de 262 pb. Gel de agarosa al 1.5%, corrida de 60min a 100 v.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-206,46). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbour-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima probabilidad compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad logarítmico superior. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 67 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 93 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). La cepa detectada en los cultivos analizados del Estado de Morelos tiene una proximidad filogenética del 100% con las cepas de *Francisella noatunensis* sub especie *orientalis* aislados de Sudamérica (Figura 35).



Figura 35 Árbol filogenético de máxima verosimilitud de cepas de *Francisella* spp. de *Oreochromis niloticus* de cultivo y diferentes especies y subespecies del género reportadas en el banco de genes, con el modelo Jukes-Cantor, 1969.

* Muestras del presente estudio indicadas con: *.

Los resultados de comparación génica obtenida con el 16S por secuenciación Sanger y NGS concuerdan en la presencia de *Francisella* en tilapia nilótica cultivada en el Estado de Morelos y pertenecen a la especie *noatunensis* subespecie *orientalis*. A excepción de las granjas 6 y 9. En G6 se detectó *Francisella* únicamente por Sanger y en la granja G9 no se tuvieron datos de calidad para su análisis por ambas técnicas (Cuadro 9).

Cuadro 9 Comparación de técnicas de detección de *Francisella* spp., aislamiento bacteriológico, secuenciación masiva (NGS) y secuenciación Sanger.

Granja	MÉTODO DE DETECCIÓN			CLASIFICACIÓN	
	Aislamiento	Microbioma NGS	Sanger	Especie Microbioma	Especie secuenciación Sanger
1	-	+	+	<i>Francisella</i> sp.	<i>F. noatunensis</i> subs <i>orientalis</i>
2	-	+	+	<i>F. noatunensis</i>	<i>F. noatunensis</i> subs <i>orientalis</i>
3	-	+	+	<i>F. noatunensis</i>	<i>F. noatunensis</i> subs <i>orientalis</i>
4	-	+	+	Francisellacea	<i>F. noatunensis</i> subs <i>orientalis</i>
5	-	+	+	Francisellacea	<i>F. noatunensis</i> subs <i>orientalis</i>
6	-	-	+	No aplica	<i>F. noatunensis</i> subs <i>orientalis</i>
7	-	Sin datos	+	No aplica	<i>F. noatunensis</i> subs <i>orientalis</i>
8	-	Sin datos	+	No aplica	<i>F. noatunensis</i> subs <i>orientalis</i>
9	-	Sin datos	+	No aplica	Resultado secuenciación sin definición suficiente para análisis

DISCUSIÓN

El manejo sanitario de los organismos acuáticos debe considerarse como un sistema integral en el que estos están inmersos en un medio líquido que comparten entre poblaciones, por ello, no se debe perder de vista que es un medio que facilita el desarrollo, supervivencia y movimiento de los microorganismos entre medios inertes o abióticos, pero también entre los organismos vivos que habitan o tienen relación con los sistemas acuáticos. Tal es el caso de las bacterias que se encuentran en los sistemas de producción de peces, formando asociaciones ecológicas entre microorganismos y con los organismos de cultivo, como: comensalismo, saprofitismo, mutualismo y parasitismo. Por ello, es de crucial importancia que al estudiar los sistemas de producción acuícolas se tenga una visión integral y un enfoque ecológico para comprender la función biológica del microbioma ambiental y del hospedero en el sistema, así como los posibles cambios positivos o negativos reflejados en desequilibrios poblacionales que afectan a los organismos de cultivo.

La acuicultura es una actividad que se desarrolló desde la época de los egipcios y se ha hecho cada vez más popular y extensiva a nivel mundial, con un gran desarrollo en los últimos 20 años. Es indispensable proyectar las actividades acuícolas como producciones sustentables para que su desarrollo continúe y sea una actividad que aporte proteína animal y vegetal de alta calidad a todas las poblaciones a nivel mundial, disminuyendo la explotación de organismos del medio y permitiendo la recuperación de las poblaciones naturales. Uno de los factores indispensables para desarrollar una acuicultura sustentable es la tecnificación, eficiencia de procesos y el manejo de los cultivos con énfasis en la prevención de la transmisión y establecimiento de enfermedades propias de los organismos de cultivo. Para ello se requiere manejar los cultivos como unidades ecológicas en las cuales, conviven diferentes actores bióticos, en este caso particular bacterias (microbioma bacteriano) y peces (tilapia). Existen diferentes estudios enfocados al microbioma bacteriano de tilapia, principalmente en bacterias patógenas, así como probióticas y

prebióticas en el sistema digestivo (Perry *et al.*, 2020; Yukgehnash *et al.*, 2020; Butt y Volkoff, 2019; Givens *et al.*, 2015; Sullam *et al.*, 2012). Estas se estudian de forma individual a pesar de que en el medio natural tienen un sin fin de relaciones con otros microorganismos, inclusive factores del hospedador como: la edad, condición nutricional, densidad poblacional, sistema inmunitario, entre otras. Para entender mejor el papel de dichos organismos y el impacto del desequilibrio del sistema, es indispensable conocer la microbiota base de los organismos de cultivo. Por medio de este estudio ha sido posible sentar las primeras bases del microbioma bacteriano de *O. niloticus* aparentemente sana, cultivada en el Estado de Morelos, México.

De acuerdo con los datos obtenidos del microbioma bacteriano, los Phyla presentes en todos los muestreos, con diferente proporcionalidad, fueron: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, y Bacteroidetes. Zhu y *col.* (2020) reportaron que la aparición o aumento de Bacteroidetes está dado por un aporte de alimento bajo en proteína, lo cual pudiera explicar la aparición de estos en algunos de los muestreos y no en toda la población evaluada, con porcentajes de aparición bajos de 9, 3 y 2%. De acuerdo con Zheng y *col.* (2020), los tres Phyla bacterianos intestinal de *O. niloticus* más abundantes son Fusobacteria, Proteobacteria y Bacteroidetes, y ellos determinaron una variación al suministrar resveratrol como suplemento en la alimentación, con la aparición de Actinobacteria, Firmicutes y Chlamydiae a los 45 días de suplementación. Ming y *col.* (2020) reportan como dominantes los Phyla Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes en el sistema digestivo de *O. niloticus* utilizados como grupos control, lo cual coincide con lo encontrado en muestras de diferentes órganos de *O. niloticus* del presente estudio. Hossain *et al.* (2021) y Ming y *col.* (2020) observaron un cambio en la dominancia de los Phyla más representados, con el uso de antibióticos (sulfamonomethoxine), predominando Firmicutes, Proteobacteria y Chloroflexi con mayor abundancia de las familias Bacillaceae, Streptococcaceae y Pseudomonadaceae. De acuerdo con Ming y colaboradores (2020) las familias más abundantes encontradas en tracto digestivo fueron Bacillaceae, Streptococcaceae y Pseudomonadaceae; sin embargo, en el presente estudio se encontró

abundancia de Micrococcaceae y Staphylococcaceae seguida de Moraxellaceae, Microbacteriaceae, Bacillaceae y Aeromonadaceae las cuales, presentan un patrón de aparición relativamente heterogéneo en los diferentes muestreos. Esta heterogeneidad entre muestreos, así como lo encontrado por Ming y col. (2020) y Zheng y col. (2020) hace suponer que la microbiota bacteriana cultivable presente en *O. niloticus* de cultivo, presenta variabilidad por diversos factores externos, uno de ellos puede ser la alimentación. De acuerdo con Perry y col. (2020), la microbiota en tilapia es variable dependiente de varios factores: dieta (porcentajes de harina de pescado, origen vegetal o proteína de insecto), inmunidad, uso de antibióticos en las granjas, uso de suplementos pro y prebióticos y la selección genética mendeliana. Se conoce que varios de estos factores se utilizan en la producción de *O. niloticus* en México, por lo que el análisis de estas variaciones y la microbiota, serían datos complementarios para dar un manejo integral a los organismos de cultivo.

Con el aislamiento bacteriano a partir de diferentes órganos se observó que los tejidos con mayor número de bacterias fueron: branquias en el 1er (66%) y 3er muestreo (87%), seguido del intestino con 15, 25 y 11%, respectivamente. La mayor presencia de bacterias en órganos tales como las branquias y el sistema digestivo, pudiese estar favorecido por su contacto con el medio externo lo que permite así la colonización de estos (Pratte *et al.*, 2018), y son vías de acceso a patógenos que pueden comprometer la vida de los organismos (Gjessing *et al.*, 2019). Los ejemplares de *O. niloticus* examinados en fresco no presentaron signos aparentes de enfermedad lo cual indica que pudiese haber un equilibrio de estas comunidades bacterianas sin generar una enfermedad aparente.

Los métodos bacteriológicos clásicos tienen grandes ventajas, tales como el aislamiento de las colonias, descripción morfológica y metabólica, así como la posibilidad de conservar los organismos para otros estudios. Sin embargo, no todas las bacterias son fáciles de aislar, lo que muchas veces imposibilita su cultivo y estudio por estas técnicas; es aquí, donde las técnicas de biología molecular como NGS de genomas bacterianos y secuenciación Sanger,

permiten ampliar la visión de los organismos que conforman esta microbiota o que se encuentran asociados a *O. niloticus*.

Los resultados obtenidos del estudio metagenómico por NGS de *O. niloticus* cultivada en el Estado de Morelos, detalla la diversidad de Phyla bacterianos presentes cuya relación con la tilapia se desconocía y se confirmó la presencia de otros Phyla y géneros bacterianos comunes en estos organismos, así como la diversidad de organismos ambientales, comensales y parásitos que están presentes y su densidad poblacional en cada uno de los sistemas. Como resultado del análisis global (microbioma bacteriano cultivable de las 9 granjas) se obtuvo la composición estructural del microbioma bacteriano a nivel de especie de *O. niloticus* cultivada aparentemente sana el cual está conformado por: 23.85% organismos del género *Staphylococcus*, 11.62% *Kokuria varians*, 5.20% *Bacillus firmus*, 5.20% *Aeromonas hydrophila*, 3.06% *Microbacterium dextranliticum* seguidos de especies con valores abajo del 3% de representatividad.

Con el análisis NGS de la composición de la comunidad microbiana por métricas de diversidad ecológica alfa - α - (Chao1, Shannon y Simpson), se observan valores de Chao1 heterogéneos en los muestreos de *O. niloticus*, las granjas G7 y G3 son las que presentan mayor riqueza bacterias seguida de G1, G4 y G6, las que presentan menor riqueza son G2 y G5. La riqueza tiene una relación directa con la abundancia de bacterias, por lo que los datos obtenidos de Shannon demuestran una diversidad alta en las granjas G7, G3, G4 y G5, una diversidad media en G1 y G2, y diversidad baja en G6, con una fluctuación mínima entre granjas en los niveles taxonómicos de familia, género y especie. En cuanto a la dominancia obtenida, esta se encuentra en valores por debajo a la riqueza y diversidad o abundancia, se comporta de acuerdo con lo esperado ya que la dominancia es inversa a la riqueza de especies e indica que las comunidades bacterianos presentes en *O. niloticus* bajo esquema de cultivo, son ricas y diversas con dominancia baja de especies bacterianos, por lo que con la comparación de estos datos contra un análisis realizado en episodios de enfermedad o

mortalidad, se esperaría una disminución de riqueza y diversidad con aumento de dominancia de especies bacterianas.

Al comparar las 50 familias con mayor representatividad dentro del microbioma bacteriano de *O. niloticus*, se observa que no hay homogeneidad en dicha estructura bacteriana y es posible identificar una mayor representatividad de al menos siete familias: Rhodobacteraceae, Fusobacteraceae, Enterobacteraceae, Pseudomonadaceae, Clostridiaceae, Moraxellaceae y Aeromonadaceae y una estructura similar entre las granjas G1 y G3, y la G4 y G7. Al comparar los 50 géneros más representativos se observa mayor heterogeneidad, lo cual corrobora los datos de riqueza y abundancia obtenidos, sin una clara similitud de proporción estructural del microbioma bacteriano entre granjas. Los géneros con mayor representación son: *Cetrobacterium*, *Pseudomonas*, *Gemmobacter*, *Clostridium*, *Plesiomonas* y *Acinetobacter*. Dentro de las 50 especies más representadas, las 7 con mayor presencia son: *Cetrobacterium somerae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Gemmobacter aquaticus*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas* sp., *Aeromonas hydrophila* y *Acinetobacter lwoffii*.

De acuerdo con Sullam y col. (2012), actualmente, las comunidades de bacterias intestinales se han evaluado en más de 145 especies de teleosteos de 111 géneros, a menudo con similitudes en la composición de Phyla bacterianos entre especies de peces, dominadas por Bacteroidetes y Firmicutes (Givens *et al.*, 2015). En el análisis por NGS total, donde se analizó la sumatoria de lecturas obtenidas de todas las granjas de este estudio, se observó la presencia de un microbioma bacteriano dominado por los Phyla Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria y una diversidad de bacterias extremófilas con representatividad baja lo cual concuerda con lo publicado por Bereded *et al.*, 2020 en cuyo análisis hay una dominancia de la microbiota intestinal de *O. niloticus* de Proteobacteria, Firmicutes, Cyanobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria con la única diferencia de la ausencia de Bacteroidetes, lo cual pudiera explicarse a que estos fueron organismos colectados del Lago Awassa y Lago Chamo en Etiopia en donde de forma

natural hay una ingesta de proteína de calidad, disponible en el sistema silvestre comparado con la proteína de los alimentos procesados que se ofrecen a los peces en cautiverio, como se comentó anteriormente y corroborado por Zhu *et al.*, (2020).

Al analizar los datos obtenidos por NGS, el microbioma bacteriano está dominado por *Cetobacterium somerae*, *Gemmobacter aquaticus*, *Propionibacterium acnes*, *Plesiomonas shigelloides* y *Pseudomonas*. *Cetobacterium somerae* es considerada una bacteria ambiental que diversos autores han reportado en el sistema digestivo de tilapia como comensal y en sedimentos de sistemas acuáticos por lo que tienen potencial probiótico (Zohu *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2022). De *P. shigelloides* existen reportes como patógeno oportunista en *Oreochromis* spp. (Sierralta *et al.*, 2016). Otras especies patógenas para los peces detectadas son: *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas* sp., *Aeromonas caviae* y *Flavobacterium* sp. El 62.22% está representado por bacterias comensales, ambientales o saprofitas tales como *Acinetobacter johnsonii*, *Nodularia sphaerocarpa*, *Rhodobacter viridis*, *Paracoccus* sp. que tiene un papel importante en el ciclo del nitrógeno dentro de los sistemas naturales (Olaya-Abril *et al.*, 2018), *Sphingomonas* sp., *Yangia pacifica*, *Janthinobacterium lividum*, *Rhodomonas*, *Pseudomonas veronii*, *Shewanella*, *Marivitas*, *Hydrogenophaga* sp. la cual tiene potencial para biorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Ilker and Dogan, 2015), entre otras. El 13.48% de dicha población está conformada por organismos patógenos o con potencial patogénico con importancia en inocuidad tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus infantis*, *Pseudomonas fragi* entre otras. Por otro lado, se encontraron bacterias que forman parte de la microbiota como *Prevotella nigrescens*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudoalteromonas* con potencial probiótico en peces y crustáceos principalmente marinos, (Wang *et al.*, 2018; Sayes *et al.*, 2017), *Clostridium hiranonis* y *Propionibacterium acnes*. La comunidad bacteriana en *O. niloticus* aparentemente sana en esquema de cultivo está compuesta mayoritariamente, por bacterias medioambientales y

una menor proporción de organismos patógenos lo cual puede indicar un equilibrio de la microbiota de *O. niloticus* que permite un estado de salud de los organismos.

Al incluir las secuencias no mapeadas el resultado es enriquecedor ya que la composición base del microbioma bacteriano de *O. niloticus* no presentó grandes diferencias dentro del Phylum Bacteria, pero se complementa de forma importante con los representantes del Phylum Archaea de los cuales, al ser principalmente extremófilos sin relevancia en salud humana o veterinaria, la mayoría de las bases de datos disponibles no cuentan con mucha información. Estas bacterias pudieran tener roles importante en el equilibrio de los sistemas de cultivo como bacterias nitrificantes (Urakawa and Sipos, 2020), suplementos para cultivos secundarios como *Artemia salina* (Liyang *et al.*, 2020) así como potencial para desarrollo de probióticos (Chuphal *et al.*, 2021), por lo que reconocer la presencia de estos en los sistemas de producción de *O. niloticus* apertura las opciones de estudio de bacterias con fines de mejora de los cultivos o la generación de productos biotecnológicos para otras aplicaciones.

En el ensayo realizado para tener una primera aproximación a la microbiota de acuerdo con el material de la estructura del sistema de cultivo, se puede observar un mayor diversidad y abundancia de microbioma en los sistemas con concreto lo cual pudiera estar relacionado con el material de construcción de los tanques que facilitan el establecimiento de microorganismos. De acuerdo con la Organización Mundial de Sanidad Animal (World Organization for Animal Health) los sistemas con tanques de cemento son porosos y se complica garantizar la desinfección en comparación con los tanques de plástico, los cuales son más fáciles de desinfectar puesto que disponen de superficies lisas y no porosas, fáciles de limpiar por completo y resistentes a la mayoría de los productos químicos. Los sistemas con geomembrana, al ser una superficie lisa poco porosa pudieran disminuir la formación de biofilm y permitir mayor eliminación de bacterias durante los procesos de limpieza y desinfección entre periodos de cultivo (World Organization for Animal Health, 2017). Con los resultados obtenidos se puede inferir que los sistemas de cultivo, semi intensivo seguido

de intensivo con recubrimiento de cemento, pudieran tener relación con un mayor establecimiento de organismos bacterianos, por lo que es necesario realizar mayor investigación al respecto.

Es importante considerar que los índices de diversidad altos no implican que sean sistemas con mayor riesgo de enfermedades, una mayor diversidad genera mayores relaciones intra e interespecíficas, las cuales pueden favorecer el crecimiento de bacterias comensales que inhiban o controlen poblaciones de bacterias patógenas, imitando así el comportamiento de un sistema natural en equilibrio (Bartelme *et al.*, 2019). Con menos diversidad presente puede disminuir la competencia y aumenta la posibilidad de que las bacterias patógenas encuentren los recursos para desarrollarse, además, no solo genera un equilibrio poblacional microbiano, sino que disminuye el estrés de los organismos de cultivo lo que ayuda a un mejor desarrollo. Ambos enfoques, de acuerdo con Bartelme y *col.* (2019), se basan en un consorcio diverso de microorganismos que participan en ciclos químico-biológicos en el sistema, pero también rigen las interacciones de la microbiota de los organismos de producción (patógenos y comensales). La microbiota tiene un rol importante en la salud, no solo disminuyendo organismos patógenos u oportunistas, sino que participan en la liberación de componentes funcionales importantes como la producción de vitamina B12 la cual tiene una correlación positiva con la abundancia de bacterias anaerobias pertenecientes a los géneros *Bacteroides* y *Clostridium*, en la tilapia del Nilo -*O. niloticus*- (Sugita *et al.*, 1990), además de variar de acuerdo con la alimentación aportada a los organismo de cultivo (Zhu *et al.*, 2020). Por otro lado, el microbioma ha sido identificado como otro potencial biomarcador (Llewellyn *et al.*, 2014) debido a su interacción con el sistema inmunológico del huésped y su naturaleza de respuesta a los factores estresantes (Boutin *et al.*, 2013); debido a ello, identificar desequilibrios en el microbioma intestinal, o disbiosis, podría ser una herramienta eficiente para detectar síndromes relacionados con el estrés, que en última instancia podrían conducir a la muerte. Con base en el índice de diversidad de Shannon, los sistemas con concreto permiten el establecimiento de una comunidad bacteriana más diversa que el uso de geomembrana. Se sabe que existe una

relación de la microbiota del sistema con la microbiota propia de los organismos cultivados con una influencia importante en la salud de estos, por ejemplo, los peces son sensibles a microbiomas externos (De Schryver y Vadstein, 2014). En sistemas de recirculación, la composición de la microbiota del agua del tanque se correlacionó con una mejor supervivencia de las larvas de los peces (Attramadal *et al.*, 2014) y la microbiota intestinal de los peces tuvo altos niveles de superposición taxonómica con la rizosfera de la raíz de la planta en sistemas de acuaponia (Hacquard *et al.*, 2015).

Por otro lado, con el análisis de diversidad β de Bray Curtis es posible confirmar el patrón de comportamiento individual, similar a lo observado con los porcentajes de aparición obtenidos por métodos bacteriológicos clásicos, donde cada estanque de cultivo se comporta como un sistema independiente con patrones de diversidad diferentes a pesar de tratarse del mismo hospedero: *O. niloticus*. La composición proporcional de la microbioma de acuerdo con el nivel taxonómico de familia es mayor en los sistemas CSI y CI comparado con los sistemas GSI y GI. Esto soporta la idea que la geomembrana pudiese no permitir el establecimiento de una comunidad bacteriana heterogénea

La técnica de NGS cuenta con una gran eficacia para la identificación de organismos que por bacteriología clásica es complicada o no se cuenta con los medios para su aislamiento e identificación, tales como: Cyanobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Spirochetes, Deferribacteres, Tenericutes, Deinococcus-Thermus, Synergistetes, Nitrospirae, Thermodesulfobacteria y Chlorobi.

La naturaleza manipulada de un sistema artificial de cultivo puede alterar las relaciones típicas entre los huéspedes y su microbiota, ya que anteriormente se han observado diferencias significativas en la composición microbiana intestinal entre peces criados en granjas y peces silvestres (Dehler *et al.*, 2017). Aunque se han logrado avances, la comprensión de las comunidades microbianas y las actividades en los sistemas de acuicultura está muy por detrás de las industrias que emplean procesos microbianos

diseñados de manera similar, como la ingeniería de aguas residuales municipales y la agricultura tradicional de cultivos de suelo (Bartelme *et al.*, 2018).

Como resultado del análisis de datos en mapas de calor se observó una mayor similitud entre las granjas de CSI y GSI comparado con los sistemas intensivos; sin embargo, en los clados de conexión se observa una relación de mayor o menor grado entre todas. Con los resultados de la aparición de lecturas de acuerdo con la escala colorimétrica en los mapas de calor a nivel de familia, así como de las bacterias ambientales y patógenas con mayor representatividad, se puede observar que cada sistemas y cada granja a pesar de presentar similitudes nuevamente parecen comportarse como ecosistemas independientes, pero es necesario mayor investigación al respecto.

Los sistemas artificiales de cultivo de organismos acuáticos parecieran ensamblar una comunidad bacteriana que permite un equilibrio y el estado de salud de los organismos (Bartelme *et al.*, 2019). No hay que descartar y explorar la hipótesis de que el agua de origen, guía el ensamblaje de la comunidad microbiana, ya que esto podría ser un factor crítico y poco explorado en los estudios de microbiota de organismos de cultivo. Es importante corroborar de forma experimental y en campo el establecimiento de las bacterias con potencial patogénico, detectadas en el presente estudio como parte del microbioma de *O. niloticus*, en una comunidad microbiana heterogénea que asemeje a lo encontrado en el presente análisis metagenómico, y relacionarlo con el sistema de cultivo trabajado y las medidas de manejo y prevención de cada granja (Rurangwa E. y Verdegem, 2015). De acuerdo con Blancheton y *col.* (2013), el manejo de sólidos es fundamental para controlar las poblaciones de bacterias heterótrofas, algunas de las cuales pueden ser patógenos oportunistas. Estas especies bacterianas, a pesar de no ser abundantes en la proporción poblacional total del microbioma de *O. niloticus*, están presentes en el análisis realizado y si las condiciones son favorables para su crecimiento, hay la posibilidad de cuadros infecciosos activos o que *O. niloticus* sea portador o reservorio de la enfermedad debido a una baja carga bacteriana; por ello, es necesaria una mayor comprensión del

microbioma intestinal en relación con los alimentos a base de insectos, vacunación, mecanismo de pro y prebióticos, selección artificial en el hologenoma, bacteriófagos en el agua de sistemas de recirculación y biofloc, propiedades fisicoquímicas del agua y disbiosis como biomarcador (Perry *et al.*, 2020).

Por otra parte, las técnicas de aislamiento bacteriológico clásicas son útiles para la identificación de organismos del microbioma bacteriano ambiental y asociado a *O. niloticus*; sin embargo, de acuerdo con la validación molecular de los resultados obtenidos por aislamiento bacteriológico realizada con el Orden Actinobacteria, existe una disparidad en la identificación del género de algunos aislados, lo cual puede deberse a que las bases de datos de los microsistemas API y las claves taxonómicas (Cowan y Steel, 1985), están enfocadas a bacterias de interés en salud humana y veterinaria de organismos terrestres y no a organismos ambientales o asociados a organismos acuáticos como *O. niloticus*. El análisis filogenético de los aislados refleja una correcta diferenciación de los géneros bacterianos agrupándolos en clados independientes. Por ello es importante el uso de pruebas diagnósticas (aislamiento bacteriológico) y confirmativas (pruebas moleculares) para la identificación de estos microorganismos.

En la validación de la técnica de NGS con secuenciación Sanger, como *Francisella* spp. modelo de estudio el género patogénico, fue posible la identificación de familia, género y especie por medio de análisis filogenético de un fragmento del gen 16S del microbioma. Se identificó *F. noatunensis* subsp *orientalis*, sin éxito en su aislamiento por métodos bacteriológicos clásicos. Esto concuerda con la literatura en la cual se reporta la presencia de *F. noatunensis* subsp *orientalis* y *F. asiatica* en especies de aguas templadas, como *O. niloticus*, ya que *F. philomiragia* y *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. se ha reportado en especies de peces de agua fría principalmente salmónidos (Colquhoun y Duodu, 2011). Las técnicas de secuenciación Sanger y NGS permitieron la detección del agente patógeno, sin embargo, la detección de su presencia no es indicativo de enfermedad. Estos métodos de

diagnóstico permiten realizar el seguimiento de esas bacterias de difícil aislamiento y cultivo, para conocer el dinamismo poblacional y periodos de presencia en los cultivos.

El procesamiento de las muestras para análisis metagenómico es crucial para la detección y clasificación de los organismos hasta el nivel de género y especie. En el caso de la granja 6 no se obtuvieron datos para el género *Francisella* por NGS, pero si fue detectada mediante la amplificación del fragmento del gen 16S y categorizada como *F. noatunensis* sbs *orientalis* por secuenciación Sanger. Con los resultados obtenidos, es posible formular la hipótesis de que *F. noatunensis* subsp *orientalis* pudiera estar en el hospedero y este tener un rol de portador de la enfermedad (asintomático). La franciselosis es una enfermedad relativamente nueva y hace falta conocer más sobre su epidemiología en organismos acuáticos.

El acceso y aplicación de las herramientas moleculares como NGS para el manejo de los cultivos de *O. niloticus* permitirían generar una visión integral de los sistemas de producción y los organismos, con ello sería posible tener una visión integral del comportamiento y transiciones biológicas del sistema, visto como un modelo ecológico donde se relacionan factores abióticos y bióticos, lo cual, de acuerdo con los resultados del presente estudio, generan una microbiota propia de cada unidad de cultivo. Si dichas herramientas son accesibles para su aplicación en el campo para estudios rutinarios en la acuicultura, permitirán generar un seguimiento sanitario personalizado, y con las bases del conocimiento de la microbiota en *O. niloticus* sanas, facilitar el diagnóstico de enfermedades en sus primeras etapas de desarrollo dentro de las unidades de cultivo. Esto se lograría al observar el cambio en el equilibrio de la composición poblacional de la microbiota propia de cada unidad de cultivo, teniendo en cuenta que la presencia de bacterias patógenas en la comunidad no implica organismos enfermos, pero es indicativo de que la enfermedad podría presentarse.

El uso de herramientas de diagnóstico presuntivo y confirmativo es crucial en las unidades de producción acuícola, sin ser la excepción el cultivo de *O. niloticus*. De forma rutinaria las

unidades de producción acuícola en el país llevan a cabo un seguimiento sanitario a través de los comités estatales de sanidad acuícola que realiza evaluaciones de inocuidad y sanitarias *in situ*, y pruebas de PCR para la detección de agentes patógenos en caso de haber indicios de estos en las unidades de cultivo. Este tipo de pruebas moleculares solo se realizan cuando la enfermedad es evidente en los organismos a través de la presencia de signos. Por ello, el uso de NGS como herramienta de seguimiento donde se observen anomalías poblacionales de microorganismos patógenos o la introducción de organismos no detectados anteriormente que puedan tener potencial patogénico permitirá tomar a tiempo medidas preventivas de control y el aislamiento de organismos para evitar la dispersión de enfermedades entre las unidades de cultivo dentro de la granja y entre unidades acuícolas de la zona. Durante dichos escenarios, los análisis NGS y moleculares deben ser complementados con pruebas confirmativas como el aislamiento y caracterización bacteriana, pruebas de patogenicidad e histopatología en caso de ser necesario.

La biotecnología de herramientas moleculares se desarrolla a pasos agigantados y ello permite la reducción de costos en el procesamiento y tratamiento de muestras para la obtención de resultados. Con este escenario, se puede concluir que las unidades de producción acuícola de *O. niloticus* deben de tener un manejo y prevención de enfermedades con herramientas de seguimiento y diagnóstico personalizado que permita evaluar dichas unidades como ambientes complejos, teniendo en cuenta que mientras mayor diversidad se presente en la composición del microbiota, ésta permitirá una mayor estabilidad del sistema con producciones sanas y menores gastos económicos por tratamiento de episodios de enfermedad o mortalidad.

CONCLUSIONES

Durante esta investigación se aisló e identificó la microbiota bacteriana y se obtuvo el microbioma bacteriano de *Oreochromis niloticus* aparentemente sana en esquema de cultivo.

Fue posible generar una primera visión del esquema poblacional bacteriano de organismos sanos de *O. niloticus*.

Los Phyla más representativos del microbioma cultivable de *O. niloticus* son Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria.

Los Phyla más representativos obtenidos por análisis de microbioma bacteriano de *O. niloticus* son, en orden de aparición porcentual poblacional: Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes y Cyanobacteria.

El Phylum Proteobacteria es el dominante dentro del microbioma de *O. niloticus* cultivada.

Se realizó una primera aproximación a las diferencias del microbioma bacteriano que pudiera haber, de acuerdo con el material de fabricación de los sistemas de cultivo.

Se corroboró la detección de la Proteobacteria patógena especie *Francisella noatunensis* por NGS de la Proteobacteria patógena especie *Francisella noatunensis* se corroboró por medio de PCR de punto final sin cultivo positivo.

Se corroboró la detección de Actinobacteria obtenidas por aislamiento, NGS y PCR punto final de diversas especies del Phylum.

PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas del presente trabajo, se propone lo siguiente:

Realizar un experimento en campo y laboratorio que permita evaluar con réplicas el cambio de la microbiota bacteriana a lo largo del ciclo de cultivo de *O. niloticus*.

Utilizar las cepas aisladas para pruebas de antagonismo entre cepas comensales o saprofitas contra patógenas, con miras en la generación de estrategias preventivas de enfermedades.

Realizar un experimento en campo y laboratorio de la relación entre los materiales de construcción de los sistemas de cultivo y el microbioma bacteriano de *O. niloticus*.

Realizar un estudio de microbioma bacteriano entre tilapias aparentemente sanas y enfermas para buscar cambios en la composición bacteriana, con los resultados del presente estudio como base.

REFERENCIAS

1. Abdl El-Rhman A. M., Yassir A. E. K. and Adel M. E. S. (2009) *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology. 27(2):175–180. doi: 10.1016/j.fsi.2009.03.020.
2. Addis M. F., Cappuccinelli R., Tedde V., Pagnozzi D., Viale, I., Meloni M. and Uzzau S. (2010) Influence of *Moraxella* sp. colonization on the kidney proteome of farmed gilthead sea breams (*Sparus aurata*, L.). Proteome Science, 8, 50. <http://doi.org/10.1186/1477-5956-8-50>.
3. Aly S. M., Abdel-Galil Ahmed Y., Abdel-Aziz Ghareeb A. and Mohamed M. F. (2008) Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish and Shellfish Immunology. 25(1-2):128–136. doi: 10.1016/j.fsi.2008.03.013.
4. Arredondo F.J.L. (1983) Especies animales acuáticas de importancia nutricional introducidas en México. Biótica. 8(2): 175–199p.
5. Arredondo F.J.L. y Guzmán, A.M. (1986) Actual situación taxonómica de las especies de la tribu Tilapiini (pisces: cichlidae) introducidas en México. An. Inst. Biól. Univ. Nal. Autón. Mex. 56, Ser. Zool (2): 555–572pp.
6. Attramadal K., Truong T.M.H., Bakke I., Skjermo J., Olsen Y. and Vadstein O. (2014) RAS and microbial maturation as tools for K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. Aquaculture 432:483–490. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.052>.
7. Azzam-Sayuti M., Ina-Salwany M. Y., Zamri-Saad M., Annas S., Yusof M. T., Monir M. S., Mohamad A., Muhamad-Sofie M., Lee J. Y., Chin Y. K., Amir-Danial Z., Asyiqin A., Lukman B., Liles M. R., and Amal M. (2021) Comparative Pathogenicity of *Aeromonas*

- spp. in Cultured Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*). *Biology*, 10(11), 1192. <https://doi.org/10.3390/biology10111192>
8. Bartelme R.P., Oyserman B.O., Blom J.E., Sepulveda-Villet O.J. and Newton R.J. (2018) Stripping away the soil: plant growth promoting microbiology opportunities in aquaponics. *Front Microbiol* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00008>.
 9. Bartelme R.P., Smith M.C., Sepulveda V.O.J. and Newton R.J. (2019) Component microenvironments and system biogeography structure microorganism distributions in recirculating aquaculture and aquaponic systems. *mSphere* 4: e00143-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00143-19>.
 10. Bereded N. K., Curto M., Domig K. J., Abebe G. B., Fanta S. W., Waidbacher H., and Meimberg H. (2020) Metabarcoding Analyses of Gut Microbiota of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Awassa and Lake Chamo, Ethiopia. *Microorganisms*, 8(7), 1040. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071040>.
 11. Blancheton J.P., Attramadal K.J.K., Michaud L., d'Orbcastel E.R. and Vadstein O. (2013) Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquat Eng* 53:30–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.009>.
 12. Bondad-Reantaso M.G., Subasinghe R.P., Arthur J.R., Ogawa K., Chinabut S., *et al.* (2005) Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet Parasitol* 132: 249-272.
 13. Boutin S., Bernatchez L., Audet C. and Derôme N. (2013) Network analysis highlights complex interactions between pathogen, host and commensal microbiota. *PLoS ONE* 8, e84772. (doi:10.1371/journal.pone.0084772).
 14. Butt R.L. and Volkoff H. (2019) Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Front. Endocrinol.* 10, 9. (doi:10.3389/fendo.2019.00009).
 15. Chao A. (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11: 256.270.

16. Chuphal N., Singha K.P., Sardar P., Sahu N. P., Shamma N. and Kumar V. (2021) Scope of Archaea in Fish Feed: A New Chapter in Aquafeed Probiotics? *Probiotics and Antimicro. Prot.* 13, 1668–1695. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09778-4>
17. Ciezarek A., Ford A., Etherington G. J., Kasozi N., Malinsky M., Mehta T. K., Pensoldolf L., Ngatunga B. P., Shechonge A., Tamatamah R., Haerty W., Di Palma F., Genner M. J., and Turner G. F. (2022) Whole genome resequencing data enables a targeted SNP panel for conservation and aquaculture of *Oreochromis* cichlid fishes. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands), 548, 737637. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737637>.
18. Colquhoun D. J., and Duodu S. (2011) *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary research*, 42(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-47>.
19. CONAPESCA (2020). Comisión nacional de acuicultura y pesca – Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2018 – Database. Consulted online 3 April 2020. www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca
20. Cowan S.T. and Steel K.J. (1982) Caracteres y caracterizaciones. En: Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Continental S.A. de C.V., México.47-52.
21. De Schryver P. and Vadstein O. (2014) Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *ISME J* 8:2360–2368. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.84>.
22. Dehler C.E., Secombes C.J. and Martin S.A.M. (2017) Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 467:149–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.017>.
23. Donald L. Neiffer, M. Andrew Stamper (2009) Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs, *ILAR Journal*, Volume 50, Issue 4(2), 343–360, <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.343>

24. Edgar R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.
25. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. (1996) Parasites, infections and diseases of fishes in Africa - An update CIFA Technical Paper. No.31. Rome, 220p.
26. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome. 223 pp.
27. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. (2021). Aquaculture. <https://www.Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO.org/fishery/en/aquaculture/es>.
28. Funke G., Falsen, E. and Barreau, C. (1995) Primary identification of *Microbacterium* spp. encountered in clinical specimens as CDC Coryneform Group A-4 and A-5 bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 33(1):188-92.
29. Givens C., Ransom B., Bano N. and Hollibaugh J. (2015) Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 518, 209–223. (doi:10.3354/meps11034).
30. Gjessing M.C., Steinum T., Olsen A.B., Lie K.I., Tavoranpanich S., Colquhoun D.J., *et al.* (2019) Histopathological investigation of complex gill disease in sea farmed Atlantic salmon. *PLoS ONE* 14(10): e0222926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222926>.
31. Gram L and Huss H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol*; 33:121-137.
32. Hacquard S, Garrido-Oter R, González A, Spaepen S, Ackermann G, Lebeis S, McHardy AC, Dangl JL, Knight R, Ley R, Schulze-Lefert P. (2015) Review microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host Microbe* 17:603–616. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>.
33. Hernández-Barraza C., Loredó J., Adame J. y Fitzsimmons K. (2012) Effect of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the growth performance of Pacific white shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*) in a sequential polyculture system. Latin American Journal of Aquatic Research, 40, 4: 936-942.
34. Holtz Ha, Lavery Dp, Kapila R. (1985) Actinomycetales Infection in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. Ann Intern Med. 102:203-205. doi: 10.7326/0003-4819-102-2-203.
 35. Hossain T. J., Das M., Ali F., Chowdhury S. I., and Zedny S.A. (2021) Substrate preferences, phylogenetic and biochemical properties of proteolytic bacteria present in the digestive tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). AIMS microbiology, 7(4), 528–545. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021032>
 36. Huang S.L.C., Shei M.C. and Chen S.N. (1999) Studies on Epizootiology and Pathogenicity of Staphylococcus epidermidis in Tilapia (*Oreochromis* spp.) Cultured in Taiwan. Zoological Studies, p.38, p.178-188.
 37. Ilker O. I. and Dogan I. (2015) Chapter 9 - Plant–Microbe Interactions in Phytoremediation, Editor(s): Khalid Rehman Hakeem, Muhammad Sabir, Münir Öztürk, Ahmet Ruhi Mermut, Soil Remediation and Plants, Academic Press, Pages 255-285, ISBN 9780127999371, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799937-1.00009-7>.
 38. Jukes T.H. and Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, Mammalian Protein Metabolism, pp. 21-132, Academic Press, New York.
 39. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
 40. Li Q., Zhang Z., Fan W., Huang Y., Niu J., Luo G., Liu X., Huang Y., and Jian J. (2021) LECT2 Protects Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Against *Streptococcus agalatae* Infection. Frontiers in immunology, 12, 667781. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667781>
 41. Liying S., Beini R., Shanyue W., Meirong G. and Gilbert V. S. (2020) Archaea *Haloferax* supplementation improves Artemia biomass production in hypersaline conditions,

Aquaculture, Volume 528, 735540, ISSN 0044-8486,
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735540>.

42. Llewellyn M.S., Boutin S., Hoseinifar S.H., Derome N. (2014) Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front. Microbiol.* 5, 207. (doi:10.3389/fmicb.2014.00207)
43. Marathe N. P., Gaikwad S. S., Vaishampayan A. A., Rasane M. H., Shouche Y. S., and Gade W. N. (2016). *Mossambicus tilapia (Oreochromis mossambicus)* collected from water bodies impacted by urban waste carries extended-spectrum beta-lactamases and integron-bearing gut bacteria. *Journal of biosciences*, 41(3), 341–346. <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9620-2>
44. Martínez-Cordero F.J., Delgadillo T.S., Sanchez-Zazueta, E. y Cai J. (2021) *Tilapia aquaculture in Mexico: assessment with a focus on social and economic performance*. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1219. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cb3290en>.
45. Ming J., Fu, Z., Ma Z., Zhou L., Zhang Z., Song C., Yuan X., and Wu Q. (2020) The effect of sulfamonomethoxine treatment on the gut microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Microbiology Open*, 9(11), e1116. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1116>
46. Monrás M., Quinteros V. y Enríquez R. (2003) Furunculosis atípica en salmonídeos de cultivo en Chile. *Vetermas*, 22-24.
47. Morales D.R. (1974) El cultivo de la tilapia en México. Datos Biológicos. Instituto Nacional de Pesca, I.N.P./24:24 p.
48. MSD Animal Health (2011) Bacterial disease in warm water fish: New strategies for sustainable control. Natal, Brazil. Held in conjunction with the World Aquaculture Society Conference.
49. Odum P.E. (1971) *Ecología*. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. Tercera edición. México. 618 pp.

50. Olaya-Abril A., Hidalgo-Carrillo J., Luque-Almagro V. M., Fuentes-Almagro C., Urbano F. J., Moreno-Vivián C., Richardson D. J., and Roldán M. D. (2018) Exploring the Denitrification Proteome of *Paracoccus denitrificans* PD1222. *Frontiers in microbiology*, 9, 1137. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01137>
51. Ondov BD, Bergman NH, and Phillippy AM. (2011) Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*. Sep 30; 12(1):385
52. Perry W.B., Lindsay. E, Payne C.J., Brodie C. and Kazlauskaitė R. (2020) The role of the gut microbiome in sustainable teleost aquaculture. *Proc. R. Soc. B* 287: 20200184. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2020.0184>.
53. Pratte Z. A., Besson M., Hollman R. D., and Stewart F. J. (2018) The Gills of Reef Fish Support a Distinct Microbiome Influenced by Host-Specific Factors. *Applied and environmental microbiology*, 84(9), e00063-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00063-18>.
54. Rurangwa E. y Verdegem M. (2015) Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Rev Aquacult* 7:117–130. <https://doi.org/10.1111/raq.12057>.
55. SADER/INAPESCA (2021) Carta Nacional Acuícola. <https://www.gob.mx/inapesca/documentos/carta-nacional-acuicola-2021>.
56. Sakai M., Yoshida T., Atsuta S. and Kobayashi M. (1995) Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. *Journal of Fish Diseases*. 18(2):187–190. doi: 10.1111/j.1365-2761.1995.tb00276.x.
57. Sayes, C., Leyton, Y., and Riquelme, C. (2017) Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. potential probiotic for larval fish culture. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(1), 76-84. doi:<http://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue1-fulltext-8>
58. Shannon C.E. and Weaver W. (1949) *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press. Urbana, IL, EEUU. 144 pp.

59. Siddique A. B., Moniruzzaman M., Ali S., Dewan M. N., Islam M. R., Islam M. S., Amin M. B., Mondal D., Parvez A. K., and Mahmud Z. H. (2021) Characterization of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Fish Aquaculture of the Southwest Coastal Area of Bangladesh. *Frontiers in microbiology*, 12, 635539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635539>.
60. Sierralta Ch. V., Mayta H. E., and León Q. J. (2016) Primer Registro de Plesiomonas shigelloides como Patógeno Oportunista de Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en una Piscigranja de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(3), 565-572. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i3.11996>.
61. Simpson G.G. (1960) Notes on the measurement of faunal resemblance. *Amer. J. Sci.* 258A, 300–311.
62. Snieszko SF (1975) History and present status of fish diseases. *J Wild Dis* 11: 446-459.
63. Soto S. (2009) Calidad del agua y bacterias presentes en tilapia cultivada. *Fundación produce Tilapia, A.C.* pp.7-19.
64. Stecher G., Tamura K., and Kumar S. (2020) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution* 37:1237-1239.
65. Sugita H., Miyajima C. and Deguchi Y. (1990) The vitamin B12-producing ability of intestinal bacteria isolated from tilapia and channel catfish. *Nippon SUISAN GAKKAISHI* 56, 701. (doi:10.2331/suisan.56.701).
66. Sukapure R.S., Lechevalier M.P., Reber H., Higgins M.L., Lechevalier H.A. and Prauser H. (1970) Motile nocardoid Actinomycetales. *Appl Microbiol.* Mar;19(3):527–533.
67. Sullam K.E., Essinger S.D., Lozupone C.A., O’connor M.P., Rosen G.L., Knight R., Kilham S.S. and Russell J.A. (2012) Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Mol. Ecol.* 21, 3363–3378. (doi:10.1111/j.1365294X.2012.05552.x)

68. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
69. Urakawa H. and Sipos A.J. (2020) Application of the consortia of nitrifying archaea and bacteria for fish transportation may be beneficial for fish trading and aquaculture. *Aquac Res.* 51: 3429– 3442. <https://doi.org/10.1111/are.14678>
70. Víquez F, Aiello J, Amerling C. (2003) Características biométricas y químicas de la tilapia de agua dulce (*Oreochromis nilótica*) y uso del pH y de las características organolépticas para estimar su vida útil sensorial almacenada a 5°C. Tesis. Universidad de Costa Rica.
71. Wang H., Wang C., Tang Y., Sun B., Huang J. and Song X. (2018) *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*, *Aquaculture*, 494:30-36. ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.020>.
72. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., and Cole J.R. (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73(16):5261-7
73. World Organization for Animal Health. (2017). Desinfección de establecimientos y equipos de acuicultura. Código Sanitario para los Animales Acuáticos. [https://www.World Organization for Animal Health.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-acuatico/](https://www.WorldOrganizationforAnimalHealth.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-acuatico/)
74. Wu F., Chen B., Liu S., Xia X., Gao L., Zhang X., and Pan Q. (2020) Effects of woody forages on biodiversity and bioactivity of aerobic culturable gut bacteria of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PloS one*, 15(7), e0235560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235560>.
75. Xie M., Xie Y., Li Y., Zhou W., Zhang Z., Yang Y., Olsen R. E., Ringø E., Ran C., and Zhou Z. (2022) Stabilized fermentation product of *Cetobacterium somerae* improves gut

and liver health and antiviral immunity of zebrafish. *Fish and shellfish immunology*, 120, 56–66.

76. Yukgehnaish K., Kumar P., Sivachandran P., Marimuthu K., Arshad A., Paray B.A. and Arockiaraj J. (2020) Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. *Rev Aquacult*, 12: 1903-1927. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>.
77. Zheng Y., Hu G., Wu W., Qiu L., Bing X. and Chen J. (2020) Time-dependent gut microbiota analysis of juvenile *Oreochromis niloticus* by dietary supplementation of resveratrol. *Arch Microbiol* 202, 43–53 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01712-1>
78. Zhou W., Xie M., Xie Y., Liang H., Li M., Ran C., and Zhou Z. (2022) Effect of dietary supplementation of *Cetobacterium somerae* XMX-1 fermentation product on gut and liver health and resistance against bacterial infection of the genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). *Fish and shellfish immunology*, 124, 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.04.019>
79. Zhu H. J., Qiang J., Tao Y. F., Ngoepe T. K., Bao J. W., Chen D. J., and Xu P. (2020) Physiological and gut microbiome changes associated with low dietary protein level in genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) determined by 16S rRNA sequence analysis. *MicrobiologyOpen*, 9(5), e1000. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1000>

APÉNDICE

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Grados centígrados
CESAEM	Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Morelos
cm	centímetros
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
CU-UNAM	Ciudad Universitaria Universidad Nacional Autónoma de México
dNTP's	2'-deoxinucleosido 5'-trifosfato
EDTA	Ácido etilen-di-amino-tetra-acético
FAO	Food and Agriculture Organization
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
HCl	Ácido clorhídrico
KCl	Cloruro de potasio
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
µg	microgramos
mg	miligramos
MgCl₂	Cloruro de magnesio

min	minutos
NGS	Next Generation Sequencing
μL	microlitro
mL	mililitro
mM	milimoles
ng	nanogramos
nm	nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borate/EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) amino-metano
x g	Veces la fuerza de gravedad

Definiciones

Comensalismo: Las relaciones comensalistas resultan benéficas para alguno de los individuos involucrados en ella (y que pasa a denominarse comensal), sin que de dicho beneficio se derive ningún tipo de daño o beneficio para el otro individuo.

Microbiota: Grupo de microorganismos diferentes que viven en conjunto en un hábitat dado.

Mutualismo: relación entre especies o relación interespecífica, en el cual los dos individuos involucrados obtienen un beneficio mutuo, o sea, se benefician ambos de su asociación. Este tipo de vínculo no ocasiona daños a ninguno.

Parasitismo: En este tipo de relaciones un individuo se alimenta del cuerpo del otro o lo utiliza para perpetuar su ciclo biológico, causándole daño en el proceso. Este daño puede ser letal, pero no suele ser masivo y directo, sino lento y progresivo, por lo que el parásito puede cohabitar en el cuerpo del parasitado durante algún tiempo.

Probiótico: Dicho de un microorganismo: Que ayuda a mantener equilibrada la biota intestinal.

Saprófitos: Dicho de un tipo de alimentación: Basado en las materias orgánicas en descomposición.

Simbiosis: La simbiosis es un tipo de mutualismo, en el que se da un grado muy estrecho de asociación entre las dos especies. Tanto así, que llevan una vida conjunta y a menudo resultan indiscernibles una de otra. Obviamente, esta cooperación presenta beneficios significativos para ambas especies, conocidas en adelante como simbiosis.

ANEXO I

Desglose de talla y peso de los organismos muestreados por granja y temporada del año.

G1		G4		G7					
	PESO (g)	TALLA (cm)		PESO (g)	TALLA (cm)		PESO (g)	TALLA (cm)	
1		15	8	1	45.5	13.5	1	89.8	15
2		24.5	10.9	2	71	15.5	2	68.5	14.5
3		15.5	9	3	67.5	15	3	86	15.3
4		10.6	7.5	4	63.8	15.5	4	110.2	17.5
5		14.5	9	5	43.3	14	5	96.5	15.5
PROMEDIOS=		16.02	8.88		58.22	14.7		90.2	15.56
G2		G5		G8					
	PESO (g)	TALLA (cm)		PESO (g)	TALLA (cm)		PESO (g)	TALLA (cm)	
1		211	21	1	95.2	15.8	1	4.7	6.4
2		154	18	2	62	14.5	2	2	4.5
3		132.7	18.3	3	72	15	3	4	5.7
4		149	19	4	89	16.1	4	2.5	4.8
5		127	16	5	113.2	18	5	2.5	4.6
PROMEDIOS=		154.74	18.46		86.28	15.88		3.14	5.2
G3		G6		G9					
	PESO (g)	TALLA (cm)		PESO (g)	TALLA (cm)		PESO (g)	TALLA (cm)	
1		46.5	13	1	78	17.5	1	27.5	15
2		103	17.5	2	86.8	17	2	30	14.5
3		78.3	16.5	3	120	18.5	3	31.5	15.3
4		102	16	4	120	19	4	34.5	17.5
5		112	17	5	95	17.5	5	39.5	15.5
PROMEDIOS=		88.36	16		99.96	17.9		32.6	15.56

ANEXO II

Preparación de Reactivos para Aislamiento y Caracterización Bacteriana Clásica

- Solución fisiológica 0.85%

Pesar 8.5 g de Cloruro de sodio (NaCl) y adicionar a 1000mL de agua destilada estéril, almacenar la solución en un frasco estéril etiquetado con el nombre de la solución y fecha de preparación.

- Reactivo de oxidasa

Se prepara una solución de 10 mL al 1% de tetrametil p hidroclorofenilendiamina en 5 mL de agua destilada. Realizar alícuotas de 1 mL a partir de la solución stock y conservar en sin incidencia de luz y en congelación -20 C.

- Reactivo Catalasa

Preparar una solución stock de peróxido de hidrógeno al 3% y distribuir en goteros para su aplicación.

- Reactivo de Griess

Solución A

Agregar 8.0g de ácido sulfanílico en 1000 mL de una solución de ácido acético 5N.

Solución B

Agregar 5.0g de α -Naftilamina en 1000 mL de una solución de ácido acético 5N.

- Reactivo de Kovac

Disolver 10 g de para-dimetil-aminobenzaldehído en 150 mL de alcohol amílico o isoamílico, posteriormente se añaden 50 mL de ácido clorhídrico concentrado lentamente. Conservar en refrigeración y preparar alícuotas para su uso.

Preparación de Reactivos para Caracterización Bacteriana Molecular

- Extracción de ADN con CTAB
 - Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8

Utilizando la campana de extracción, disolver en 65 mL de agua desionizada, 0.605 g de Tris-HCl. Agregar HCl al 0.1 N, agitando constantemente hasta ajustar el pH a 8. Aforar a un volumen de 100 mL con agua desionizada, mantener a temperatura ambiente.

- Buffer de extracción CTAB 2X

Disolver 1.4 M de NaCl (8.181 g) 20 mM de EDTA (0.744 g), 2 % P/V de CTAB (2 g) en 75 mL de buffer Tris-HCl 100 mM pH 8 en un agitador termo magnético hasta que las sustancias se disuelvan completamente. Posteriormente agregar 300 µl de 2-β-mercaptoetanol en la campana de extracción ya que este compuesto es muy volátil y tóxico. Finalmente, aforar a un volumen de 100 mL con la solución de Tris-HCl previamente utilizada. Mantener a temperatura ambiente y antes de iniciar el proceso caliente a 55 °C.

- Solución Fenol: Cloroformo: isoamílico 25:24:1

Mezclar en la campana de extracción 50 mL de fenol, 48 mL de cloroformo y 2 mL de alcohol isoamílico. Mantener almacenado a -20°C.

- Acetato de amonio 10 M

Disolver en 5 mL de agua desionizada, 7.71 g de acetato de amonio y aforar a 10 mL con agua desionizada. Mantener a temperatura ambiente. Etanol al 70 % Por cada 70 mL de etanol absoluto, agregar 30 mL de agua desionizada y mezclar. Mantener la solución a -20°C.

- Proteinasa K

A 100 mg de liofilizado (48.40 μ /mg) se le agregan 10mL de agua grado biología molecular estéril.

- Etanol 70 %

Para 50 mL mezclar 35 mL de etanol absoluto con 15 mL de agua.

- Electroforesis

- TBE 1X

Para una solución con volumen final de 500 mL, se agregan 450 mL de agua destilada más 50 mL de buffer TBE 10X.

- Gel agarosa 1.5 %

Para preparar un gel de agarosa al 1.5 % se pesan 0.75 g de agarosa y se afora con amortiguador TBE 1X, a un volumen final de 50 mL. La agarosa se disuelve por calentamiento.

- Gel agarosa 2.0 %

Para preparar un gel de agarosa al 2.0 % se pesan 1 g de agarosa y se afora con amortiguador TBE 1X, a un volumen final de 50 mL. La agarosa se disuelve por calentamiento.

ANEXO III

Métodos Moleculares

- Método de extracción de ADN total con CTAB

Con un asa de níquel-cromo (Ni-Cr) tomar una colonia del cultivo axénico y disolver en 200µl de solución fisiológica 0.85%, agregar 1 mL de CTAB 2X, precalentado a 55 C, en un tubo para microcentrífuga de 2 mL. Mezclar por inversión e incubar 5 min a temperatura ambiente. Incubar 5 min en hielo y agregar 20 µl de RNAsa A, mezclar por inversión e incubar por 20 min a 37 C, durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces. Agregar 10 µl de proteinasa K, mezclar por inversión e incubar a 60 C por 20 min, durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces. Incubar 5 min en hielo y agregar 600 µl de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) y agitar por inversión. Centrifugar a 10,000 rpm a 8 C, por 12 min, recuperar con cuidado 200 µl del sobrenadante y ponerlo en un tubo para microcentrífuga nuevo de 1.5 mL. Agregar 50 µl de acetato de amonio 10 M y mezclar por inversión varias veces, agregar 500 µl de isopropanol frío (a -20 C) y mezclar por inversión varias veces. Mantener la mezcla a -20°C durante 2 hrs o por toda la noche, para favorecer la precipitación de ADN. Centrifugar a 10,500 rpm a 8 C, por 5 min.

Eliminar cuidadosamente el sobrenadante, agregar 1 mL de etanol al 70 % frío (a -20 C), mezclar por inversión hasta observar que el botón se desprende del micro tubo. Dejar reposar 5 min a temperatura ambiente, centrifugar a 10,000 rpm a 8 C, por 5 min. Eliminar el sobrenadante cuidando no desprender el botón de ADN y colocar los tubos para microcentrífuga de 1.5 mL boca abajo sobre papel absorbente limpio por 15 min para secar el ADN. Revisar que el botón de ADN se encuentra completamente seco; en caso de no estarlo repetir el paso anterior durante el tiempo que sea necesario. Rehidratar el ADN en 200 µl de buffer TE 1X o agua inyectable, si el botón de ADN es pequeño se puede hidratar con 50 o 100 µl.

Protocolos de Secuenciación

- Lectura de calidad de cDNA en Agilent 2100 Bioanalyzer

1.- Preparación del Gel Dye Mix

- Colocar los reactivos a T° ambiente por 30 min.

Colorante de alta sensibilidad (azul)

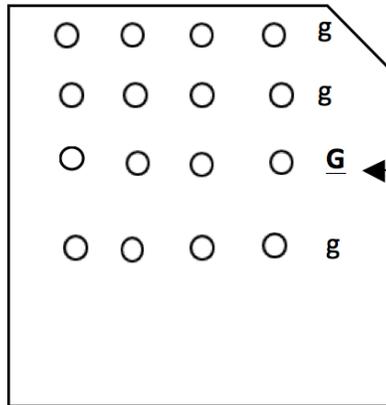
Matriz de alta sensibilidad (rojo) (proteger de la luz)

- Dar vortex al vial con tapa azul por 10seg y un pulso en la microcentrífuga para bajar el líquido de las paredes.
- Pipetear 15µl del vial con tapa azul y colocarlos en el vial que contiene la matriz de gel (tapa roja).
- Cerrar el tubo y dar vortex por 10 seg, inspeccionar visiblemente que el gel y el colorante estén bien mezclados.
- Transferir toda la mezcla al tubo con la columna para filtrado y centrifugar por 10 min a temperatura ambiente a 2240 g.
- Desechar el filtro, rotular el tubo e incluir la fecha de preparación (vida útil post preparación de 6 semanas). Almacenar a 4°C y proteger de la luz.

2.- Preparación del CHIP de lectura en Bioanalyzer

KIT HIGH SENSITIVITY DNA CHIP AGILENT

- Cargar el chip con el Gel Dye Mix, preparado en la descripción anterior, de la siguiente forma:

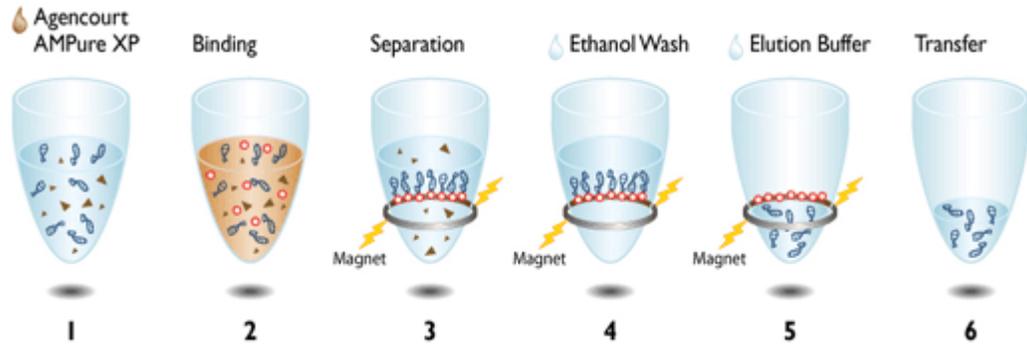


En el pozo G se agregan 9 μ l del Dye Mix y con la jeringa de presurización por 1 minuto para formar una matriz donde se cargarán las muestras en el CHIP.

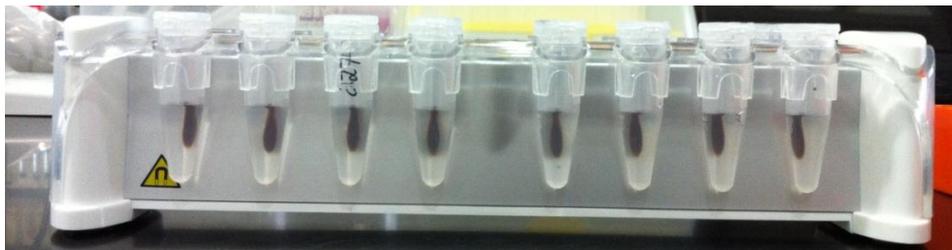
- Una vez presurizado el pozo G, se agregan 9 μ l de Dye Mix a los pozos con letra g, sin presurizar.
- En los pozos del 1 al 11 se agregan 5 μ l del marcador (tapa verde). No se debe dejar ningún pozo vacío pues el Bioanalyzer detectará error.
- Agregar 1 μ l de cada muestra en los pozos del 1 al 11.
- Si no se tienen suficientes muestras, no dejar los pozos vacíos, agregar 1 μ l de marcador (tapa verde).
- En el pozo 12 agregar 1 μ l de la escalera (tapa amarilla).
- Colocar el CHIP de manera horizontal en el vortex (especial para los CHIPS) y agitar por 1 min a 2400 rpm.
- Leer en el Bioanalyzer (de la preparación del CHIP a su lectura no dejar más de 5 minutos).

- Purificación y limpieza

KIT AGENCOURT AMPURE XP



- Agregar 100 μl de Agencourt AMPure en muestras con fragmentos de 400bp y 120 μl con fragmentos de 200-300 bp, y 150 μl con fragmentos de 100-150 bp. Pipetear 5 veces, dar un pulso e incubar por 5 min a T° ambiente.
- Poner los tubos en la gradilla magnética por 3 min o hasta que se clarifique la solución.



- Remover el sobrenadante sin tocar las perlas. Es importante no tomar las perlas ya que en ellas está adherida la muestra.
- Sin remover el tubo del magneto se agregan 500 μl de etanol al 70% recién preparado. Esperar 30 seg y girar, esperar 1 min para retirar el sobrenadante.
- Repetir una vez más el paso anterior.

- Dar un pulso a los tubos para retirar todo el etanol. Colocar nuevamente en la gradilla magnética, observar hasta que las perlas se peguen a la pared y retirar el exceso de etanol.
- Mantener los tubos destapados a T° ambiente ± 5 min para evaporar el etanol restante.
- Eluir la con 25mL de LowTE en el mismo tubo, pipetear ± 5 veces, vortex por 10 seg y posteriormente dar un pulso.
- Volver a colocar los tubos en la gradilla magnética por 1 min, cuando las perlas se encuentren pegadas a la pared del tubo transferir el sobrenadante con la muestra eluida a un tubo nuevo de 1.5mL sin acarrear perlas.
- Se realiza nuevamente lectura en Bioanalyzer con el CHIP para ver la calidad y tamaño de los fragmentos obtenidos.

- Ligación de adaptadores y barcode (librerías) (Nick translation ADN)

KIT XPRESS BARCODE ADAPTERS 1-16 KIT

- Para una concentración de ADN de 50-100 ng

DNA pool	~ 25 μ l
10X LIGASE BUFFER	10 μ l
Ion P1 adapter	2 μ l
Ion Xpress Barcode X+	2 μ l
dNTP Mix	2 μ l
Nuclease free water	49 μ l



DNA ligase (blue)	2 μ l
Nick Repair Polymerase (Clear)	8 μ l
Total	100 μ l

- Se utiliza el programa Ligación Ion Torrent en el termociclador PRIME 2

Stage	T°	Time
Hold	25 °C	15 min
Hold	72 °C	5 min
Hold	4 °C	Hold

- Preparación del templado para secuenciación en Ion Torrent

KIT ION PGM TEMPLATE OT2 REAGANTS 400

ION PGM TEMPLATE OT2 SOLUTIONS 400

- En un tubo de 1.5 mL preparar el siguiente mix.

Ion PGM template Reagent mix	500 μ l
Ion PGM template Reagent B	285 μ l
Ion PGM template Enzyme Mix	50 μ l
Ion PGM template Reagent X	40 μ l
Librería	25 μ l
Volumen final	900 μ l

- Agregar 100 μ l de ION PG, Template Ion Sphere Particles. Antes de usarlo hay que dar vortex.
 - Posteriormente hay que cargar la muestra en el Ion One Touch 2
 - Se colocan los 1000 μ l de la reacción preparada en el punto anterior en el conducto marcado para ingresar el líquido.
 - Después agregar 1000 μ l de aceite ION One Touch por la misma vía.
 - Después agregar 500 μ l más de aceite ION One Touch por la misma vía.
- **Obtención del templado**
- Una vez obtenido el templado se descarta el sobrenadante con micropipeta con cuidado de no tocar el pellet, dejando 100 μ l de sobrenadante.
 - Se da un pipeteo y vortex a baja velocidad y se pasa el contenido de los dos tubos a un tubo de baja retención de 1.5 mL.
 - Agregar 500 μ l de Ion One Touch Wash Solution a los tubos de colecta y dar pipeteo para lavar y colocar el líquido en el tubo de 1.5 mL.
 - Antes de enriquecer incubar a 50°C por 2min, centrifugar a 15,500 x g por 2.5 min. Remover el sobrenadante dejando 100 μ L.
 - Resuspender con una punta nueva.
- Quantificación con Qubit
- Calibrar con los fluoroforos 647 y 488. Primero se utiliza el 488 y posteriormente en 647.
 - Los valores obtenidos deben ser registrados.
 - Se transfieren 2 μ l de la muestra a un tubo de PCR más 19 μ l de annealing buffer y 1 μ l de Ion Sphere Quality Control Kit.
 - Pipetear perfectamente y poner en termociclador, bajo las siguientes condiciones.
95 °C-2 min

37 °C-2 min

- Hacer lavados de las sondas que no se adhirieron agregando 200 μ l de Quality control wash al tubo de la muestra y centrifugar por 1.30 min a 15,500g
- Retirar el sobrenadante, excepto 10 μ l sin tocar el pellet. Repetir el proceso dos veces mas
- Agregar 190 μ l de Quality control wash para tener un volumen final de 200 μ l. Pipetear y transferir al tubo Qubit.
- Realizar la lectura en el orden de 488 y luego 647. Al finalizar hacer una lectura con un control negativo con 200 μ l de Quality control wash.
- Anotar las lecturas obtenidas.
- Pasar los datos al archivo de Excel Qubit 2.0 Easy Calculator for use with Ion Sphere Quality Control Kit.

ANEXO IV

Relación de Cepas del Microbioma Bacteriano de Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
3	Mc	8	Branquia	+	Bacilo	<i>Brevibacterium</i> spp.	Brevibacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	6	Piel	+	Bacilo	<i>Microbacterium aurum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	9	Intestino	+	Bacilo	<i>Microbacterium aurum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	56	Hígado	+	Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	8b	Piel	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	Mc	7	Branquia	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	12	Intestino	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	11	Branquia	-	Bacilo	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Proteobacteria
	AS	10	Branquia	-	Bacilo	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Pasteurellaceae	Pasteurellales	Proteobacteria
	AS	14	Hígado	-	Cocobacilo	<i>Actinobacillus</i> spp.	Pasteurellaceae	Pasteurellales	Proteobacteria
	AS	9	Branquia	-	Bacilo	<i>Pseudomonas</i> spp.	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	1	Branquia	-	Coco	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	4	Piel	+	Bacilo	<i>Microbacterium lacticum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
2	EU	10	Bazo	+	Bacilo	<i>Microbacterium aurum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	11	Hígado	+	Bacilo	<i>Microbacterium aurum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	59	Aleta	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	36	Aleta	+	Bacilo	<i>Microbacterium aurum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	37	Aleta	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	29	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	32b	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium imperiale</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	32a	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium aurum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	60	Aleta	-	Bacilo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	58	Hígado	-	Bacilo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	30	Piel	-	Coco	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	Mc	5	Branquia	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	15	Aleta	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	20	Piel	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	16	Hígado	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	6	Branquia	-	Bacilo pequeño	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Pasteurellaceae	Pasteurellales	Proteobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	Mc	4	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	Mc	12	Aleta	-	Bacilo pequeño	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	38	Hígado	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	33	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actynomycetales	Actinobacteria
	EU	38	Branquia	+	Bacilo	<i>Corynebacterium propinquum</i>	Corynebacterineae	Actynomycetales	Actinobacteria
	EU	39	Branquia	+	Bacilo	<i>Actinomyces neuii</i> ssp. <i>Anitratus</i>	Microbacteriaceae	Actynomycetales	Actinobacteria
	EU	40	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium aurum</i>	Microbacteriaceae	Actynomycetales	Actinobacteria
	EU	42	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus warneri</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	43b	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus sciuri</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	16	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	33	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	43a	Branquia	-	Coco	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	3	Branquia	-	Bacilo pequeño	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	4	Branquia	-	Bacilo pequeño	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	32	Branquia	-	Coco	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	EU	27b	Hígado	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	24	Piel	+	Bacilo	<i>Microbacterium aurum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	20	Intestino	+	Bacilo	<i>Brevibacterium spp.</i>	Brevibacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	EU	18	Intestino	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actynomicetales	Actinobacteria
	Mc	9	Piel	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	EU	24	Hígado	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	EU	26	Hígado	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	20	Hígado	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	21	Hígado	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	31	Branquia	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	EU	19	Intestino	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	EU	13	Bazo	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	EU	25	Hígado	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	EU	50	Hígado	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	52	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	23	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
4	Mc	18	Intestino	-	Bacilo	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Alcaligenaceae	Burkholderiales	Proteobacteria
	Mc	20	Branquia	-	Bacilo	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Proteobacteria
	Mc	17	Hígado	-	Bacilo pequeño	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Pasteurellaceae	Pasteurellales	Proteobacteria
	AS	27	Branquia	-	Bacilo	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Pasteurellaceae	Pasteurellales	Proteobacteria
	AS	22	Intestino	-	Bacilo pequeño	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Pasteurellaceae	Pasteurellales	Proteobacteria
	AS	24	Intestino	-	Coco	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	21	Piel	-	Bacilo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	15	Branquia	-	Bacilo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	14b	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	16	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	3	Intestino	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	4	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	6	bazo	+	Coco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	7	Branquia	+	Bacilo	<i>Lactococcus raffinolacticus</i>	Lactobacillaceae	Streptococcaceae	Firmicutes
	AS	8	Hígado	+	Bacilo	<i>Lactococcus raffinolacticus</i>	Lactobacillaceae	Streptococcaceae	Firmicutes
	AS	9	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	AS	12	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	15	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus intermedius</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	19	Intestino	+	Bacilo	<i>Microbacterium aurum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	22	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	25	Hígado	+	Bacilo	<i>Lactococcus raffinolacticus</i>	Lactobacillaceae	Streptococcaceae	Firmicutes
	EU	28	Intestino	+	Bacilo	<i>Microbacterium lacticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	36	bazo	+	Coco	<i>Staphylococcus intermedius</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	37	Hígado	+	Bacilo	<i>Lactococcus raffinolacticus</i>	Lactobacillaceae	Streptococcaceae	Firmicutes
	AS	44a	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	44b	Intestino	-	Bacilo	<i>Flavobacterium</i> spp.	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
	AS	48	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	55	Intestino	-	Bacilo	<i>Flavobacterium</i> Grupo II de Picket	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
	EU	61	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	66	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	67	bazo	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	70	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus intermedius</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	EU	71	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	74	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus aureus ssp. Aureus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	87	Branquia	+	Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	88	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	96	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	98	bazo	+	Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	99	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	101	Hígado	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	104	bazo	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	106	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	107	Intestino	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	109	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	111	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	112	bazo	+	Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	115	Hígado	+	Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	116	Hígado	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	118	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
5	EU	119	Branquia	+	Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	120	Hígado	-	Bacilo	<i>Flavobacterium</i> <i>Grupo II de Picket</i>	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
	AS	122	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	125	Gónada	-	Bacilo	<i>Flavobacterium</i> <i>Grupo III de Picket</i>	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
	EU	126	bazo	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	127	bazo	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	132	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	133	bazo	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	5	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	6a	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	6b	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	7	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	8	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	9a	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	9b	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	EU	10	bazo	+	Bacilo	<i>Microbacterium lacticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	11	bazo	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	12	Gónada	+	Coco	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	13b	Hígado	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	14	Gónada	+	Coco	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	15	Gónada	+	Bacilo	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	16	Gónada	+	Bacilo	<i>Bacillus coagulans</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	17a	Branquia	-	Bacilo	<i>Serratia marcescens</i>	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Proteobacteria
	EU	17b	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	18	Branquia	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	19	Intestino		Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	20	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	22	Branquia	+	Bacilo	<i>Lactococcus spp.</i>	Streptococcaceae	Bacilli	Firmicutes
	AS	24	Hígado		Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	25	Gónada	+	Bacilo	<i>Lactococcus spp.</i>	Streptococcaceae	Bacilli	Firmicutes
	AS	27	bazo	+	Bacilo	<i>Lactococcus spp.</i>	Streptococcaceae	Bacilli	Firmicutes
	EU	28	bazo		Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	30	Gónada	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	31	Gónada	+	Bacilo	<i>Lactococcus spp.</i>	Streptococcaceae	Bacilli	Firmicutes
	AS	32	bazo	+	Bacilo	<i>Lactococcus spp.</i>	Streptococcaceae	Bacilli	Firmicutes
	EU	33	Hígado	-	Bacilo	<i>Acinetobacter anitratus</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	AS	34	bazo	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	37	Gónada	+	Coco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	38	Intestino	+	Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	39	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium lacticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	41	Gónada		Bacilo	<i>Cellulomonas</i> spp.	Cellulomonadaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	42	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	46	Intestino	+	Coco	<i>Staphylococcus intermedius</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	48	bazo	+	Bacilo	<i>Bacillus sphaericus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	50	Gónada	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	52	Gónada	+	Bacilo	<i>Bacillus sphaericus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	MC	-	Bazo	-	Bacilo	<i>Flavobacterium</i> <i>Grupo II de Picket</i>	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
	EU	53	Gónada		Bacilo	<i>Cellulomonas</i> spp.	Cellulomonadaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	54	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	55	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	56	Branquia	+	Bacilo	<i>Lactococcus</i> spp.	Streptococcaceae	Bacilli	Firmicutes
	EU	57	Hígado		Bacilo	<i>Cellulomonas</i> spp.	Cellulomonadaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	58	Branquia	+	Bacilo	<i>Lactococcus</i> spp.	Streptococcaceae	Bacilli	Firmicutes
	EU	59	Gónada	+	Bacilo	<i>Lactococcus</i> spp.	Streptococcaceae	Bacilli	Firmicutes

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
6	EU	63	bazo	+	Bacilo	<i>Lactococcus</i> spp.	Streptococcaceae	Bacilli	Firmicutes
	AS	65	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium lacticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	66	Branquia	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	69	Hígado	-	Bacilo	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	Proteobacteria
	EU	2	Intestino	-	Bacilo	<i>Brevundimona vesicularis</i>	Caulobacteraceae	Caulobacterales	Caulobacteriales
	EU	3	Intestino	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	5	Intestino	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	EU	6	Hígado	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	10	Intestino	-	Bacilo	<i>Moraxella phenylpiruvica</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	13	Hígado	+	Bacilo	<i>Bacillus coagulans</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	14	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	24	Intestino	-	Bacilo	<i>Moraxella phenylpiruvica</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	26	Intestino	-	Bacilo	<i>Brevundimona vesicularis</i>	Caulobacteraceae	Caulobacterales	Caulobacteriales
	AS	29	Intestino	-	Bacilo	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	31	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus brevis</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	35	Branquia	-	bacilo	<i>Moraxella phenylpiruvica</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	36	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium lacticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
EU	41	Intestino	-	Bacilo	<i>Moraxella lacunata</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria	

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	EU	45	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus coagulans</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	46	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	50	Branquia	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	51	Gónada	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	54	Hígado	-	Bacilo	<i>Moraxella nonloquefaciens</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	55	Intestino	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	56	Branquia	-	Bacilo	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	Proteobacteria
	AS	63	Hígado	+	Coco	<i>Micrococcus Luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	67	Gónada	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	69	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus sphaericus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	81	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus coagulans</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	83	Branquia	-	Bacilo	<i>Pseudomonas luteola</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	85	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella phenylpiruvica</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	86	Branquia	-	Bacilo	<i>Pseudomonas luteola</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	BHI	87	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella phenylpiruvica</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	BHI	107	Intestino	-	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	BHI	108	Intestino	-	Bacilo	<i>Strenotrophomona maltophila</i>	Xanthomonadaceae	Xanthomonadales	Proteobacteria
	BHI	109	Intestino	-	Bacilo	<i>Strenotrophomona maltophila</i>	Xanthomonadaceae	Xanthomonadales	Proteobacteria
	BHI	110	Intestino	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
7	BHI	111	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	1	Intestino	+	Bacilo	<i>Cellulomonas</i> spp.	Cellulomonadaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	3	Intestino	+	Bacilo	<i>Corynebacterium propinquum</i>	Corynebacterineae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU-AS	4=21	Branquia	+	Bacilo	<i>Kurthia zopfii</i>	Planococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	5	Branquia	+	Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	6	Branquia	+	Bacilo	<i>Corynebacterium propinquum</i>	Corynebacterineae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	7=22	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella lacunata</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	8	Branquia	+	Bacilo	<i>Kocuria rizophila</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	9	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella lacunata</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	10	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	11	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	12	Branquia	+	Bacilo	<i>Corynebacterium hofmannii</i>	Corynebacterineae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	13	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella lacunata</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	14	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria kristinae</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	16=17	Intestino	+	Bacilo	<i>Kurthia zopfii</i>	Planococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	18	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria rizophila</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	19	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria palustris</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	20	Branquia	-	Bacilo	<i>Mannheimia haemolytica</i>	Pasteurellaceae	Pasteurellales	Proteobacteria
	AS	23	Intestino	+	Bacilo	<i>Cellulomonas</i> spp.	Cellulomonadaceae	Actinomycetales	Actinobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	AS	24	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	25	Branquia	+	Bacilo	<i>Corynebacterium propinquum</i>	Corynebacterineae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	26	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella lacunata</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	27	Intestino	+	Bacilo	<i>Kurthia zopfii</i>	Planococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	31	Branquia	+	Bacilo	<i>Kurthia zopfii</i>	Planococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	32	Branquia	-	Bacilo	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	33	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria rizophila</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	35	Intestino	+	Bacilo	<i>Kurthia zopfii</i>	Planococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	36	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	37	Branquia	-	Bacilo	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	38	Branquia	-	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	42	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria kristinae</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	43=60	Branquia	+	Bacilo	<i>Arthrobacter mysorens</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	44	Hígado	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	45	Branquia	+	Bacilo	<i>Cellulomonas</i> spp.	Cellulomonadaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	46	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	47	Branquia	+	Bacilo	<i>Arthrobacter mysorens</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	48	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	50	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	51	Branquia	+	Coco	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	53	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
8	AS	55	Intestino	-	Bacilo	<i>Bacillus sphaericus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	56	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	57	Intestino	+	Bacilo	<i>Cellulomonas</i> spp.	Cellulomonadaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	58	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria kristinae</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	59	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	61	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	62	Branquia	+	Bacilo	<i>Cellulomonas</i> spp.	Cellulomonadaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	63	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	64	Branquia	-	Bacilo	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	65	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	67	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	68	Intestino	+	Bacilo	<i>Kurthia zopfii</i>	Planococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	70	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	Tubo peptonado/Mc	71	Branquia	-	Coco	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	Tubo peptonado/Mc	72	Branquia	-	Coco	<i>Moraxella catarrhalis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS-EU	1=42	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria rosea</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
AS-EU	2=98, 99	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes	
AS	3=75	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria rosea</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	
AS	4	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes	

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	AS-EU	5=49 Y 74	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	6	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	7	Branquia	+	Bacilo	<i>Rothia amara</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS-EU	8=47	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	9	Branquia	+	Coco	<i>Micrococcus lylae</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	10	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	11=15a	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus sciuri</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	11a	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria sp.</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	11a	Branquia	-	Bacilo	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Alcaligenaceae	Burkholderiales	Proteobacteria
	AS-EU	13=53	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS-EU	14=54,103,104	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	15	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	16	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus firmus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	17	Intestino	-	Coco	<i>Branhamella catarrhalis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	15	Intestino	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	19	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS-EU	22=58	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	23	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	24	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium lacticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	25	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella lacunata</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	AS-EU	26=109,111,112	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS-EU	27=61=88	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	27	Branquia	-	Coco	<i>Alcaligenes anitratus</i>	Alcaligenaceae	Burkholderiales	Proteobacteria
	AS-EU	30=31,68,69,90	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	32=33a	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS-EU	33b=70a	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	Mc	35	Branquia	-	Coco	<i>Branhamella catarrhalis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	Mc-EU	35=38 y 105	Branquia	-	Coco	<i>Branhamella catarrhalis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	Mc	37	Branquia	-	Bacilo	<i>Neisseria elongata</i>	Neisseriaceae	Neisseriales	Proteobacteria
	Mc-EU	39=67	Branquia	-	Coco	<i>Branhamella catarrhalis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	40=45a	Branquia	-	Coco	<i>Branhamella catarrhalis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	43	Branquia	-	Bacilo	<i>Veillonella spp.</i>	Veillonellaceae	Selenomonadales	Firmicutes
	EU	44	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	45	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus sp.</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	46	Hígado	+	Bacilo	<i>Brevibacterium sp.</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	48	Branquia	+	Bacilo	<i>Brevibacterium sp.</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	50	Branquia	+	Coco	<i>Micrococcus sp.</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	50a	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	EU	52	Branquia	-	Bacilo	<i>Veillonella spp.</i>	Veillonellaceae	Selenomonadales	Firmicutes
	EU	55	Branquia	+	Coco	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
9	EU	60	Intestino	+	Bacilo	<i>Bacillus mycoides</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	60a	Intestino	+	Coco	<i>Micrococcus</i> sp.	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	63=66	Branquia	-	Bacilo	<i>Veillonella</i> spp.	Veillonellaceae	Selenomonadales	Firmicutes
	EU	65	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria rosea</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	70	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus sciuri</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	70b	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium lacticum</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	71	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria kristinae</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	73=93	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	77	Branquia	+	Coco	<i>Micrococcus</i> sp.	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	78	Branquia	+	Coco	<i>Microbacterium imperiale</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	86	Branquia	+	bacilo	<i>Bacillus</i> sp.	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	89	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus auricularis</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	97	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus</i> sp.	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	106	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus</i> sp.	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	106a=114	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	1a	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella lacunata</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	1b	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	3	Branquia	-	Bacilo	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	4	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	4	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	AS	5	Branquia	-	Bacilo	<i>Flavobacterium</i> <i>Grupo II de Pickett</i>	Flavobacteriaceae	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
	AS-EU	6=38	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	7	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium</i> <i>imperiale</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	8a	Branquia	+	Bacilo	<i>Microbacterium</i> <i>arborescens</i>	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS-EU	8b=41	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus</i> <i>lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS-EU	9=37,43,58	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria kristinae</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	11=59	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria rosea</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	12	Intestino	-	Bacilo	<i>Moraxella</i> <i>oslonesis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS	13	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria varians</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	14=17	Branquia	-	Bacilo	<i>Moraxella</i> <i>osloensis</i>	Moraxellaceae	Pseudomonadales	Proteobacteria
	AS-EU	15=49	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria rosea</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	19	Bazo	+	Bacilo	<i>Bacillus sphaericus</i>	Bacillaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	20	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus</i> <i>xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	21	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus</i> <i>sciuri</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	AS	22	Branquia	+	Coco	<i>Micrococcus</i> sp.	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	AS	27	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus</i> <i>xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	31	Branquia	+	Bacilo	<i>Cellulomonas</i> spp.	Microbacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	32=71,73	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria kristinae</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	36	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria rosea</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	42	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus</i> <i>sciuri</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	48=79	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria kristinae</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria

No ID	Medio	No. Id	Órgano	Gram	Morfología	Identificación	Familia	Orden	Phylum
	EU	52	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	53	Branquia	+	Coco	<i>Kocuria rosea</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria
	EU	72	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus lentus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes
	EU	80a	Branquia	+	Coco	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Staphylococcaceae	Bacillales	Firmicutes

ANEXO V

Artículo Publicado

Parra-Laca R, Hernández-Andrade L, García-Espinosa G, Loza-Rubio E. Isolation of actinomycetes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in semi-intensive systems from Morelos, Mexico central zone. Lat. Am. J. Aquat. Res. 2020;48(5): 758-767. doi:10.3856/vol48-issue5-fulltext-2500.

Isolation of actinomycetes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in semi-intensive systems from Morelos, central zone of Mexico

ABSTRACT. The production of Nile tilapia has good technological development; however, today, it is still necessary to make it more efficient. One way to increase efficiency is to prevent disease and increase the food conversion factor. Since previous investigations of tilapia microbiota detected a high proportion of organisms belonging to the Order Actinomycetes, this study was to isolate, identify, and describe the species of bacteria microbiota belonging to the cultured Nile tilapia. These were done with Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) grown in a warm sub-humid climate during spring and summer seasons. The biopsy of different organs was performed for bacteriological culture and 16S rRNA sequencing analysis. From the 180 tissue samples, 49 isolates of the order Actinomycetes were obtained, representing ten species from seven genera: *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Actinomyces*, and *Micrococcus*. In spring, *Microbacterium* dominated, accounting for 74% of the total population. In the summer, lower diversity was observed, with 39% represented by *Microbacterium*. 16S rRNA sequencing analysis enabled classification of *Actinomyces neuui* and *Microbacterium lacticum* as *Kocuria varians* and *Agromyces indicus*; the classification of *Microbacterium imperiale* as *Rhodococcus* and *Micrococcus luteus* was confirmed. No sequences of *K. varians*

have been reported in fish. *Microbacterium dextranolyticum* showed high similarity to environmental samples. Here is the first study that analyzes the bacteria population in tilapia at the genetic level with an ecosystem approach, present in healthy cultured tilapia, indicating their beneficial associations with the host, making them candidates as probiotics, among other possible functions, applicable in the cultivation of tilapia.

Keywords: Actinomycetes; aquaculture; environmental health; fish (as food); fish (live)

INTRODUCTION

In all systems of cultivation, Nile tilapia regularly interact with biotic and abiotic factors within the system, resulting in interspecific interrelations that can be beneficial or causing damage (Odum 1971). Commensal bacteria promote the development of the adaptive immune system in vertebrates (Ferguson *et al.*, 2010; Standen *et al.*, 2015) and inhibit colonization by pathogenic bacteria either passively by competitive exclusion or actively by generating toxic secondary metabolites. Stress caused in fish by handling, sorting, grading, transport, and stocking influences the microbiota in different manners, with physiological, hormonal, and cellular effects on the host, contributing to disease development (Ley *et al.*, 2008).

A predominance of *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, and *Pseudomonas* has been reported in the microflora of freshwater fish including tilapia, which produce amylase and may facilitate the degradation of foods with a high content of elements from plants like starch; *Corynebacterium* forms such as Actinomycetes were present but were non amylase producers (Sugita *et al.*, 1997; Matin *et al.*, 2019).

Bacteria in the order Actinomycetes are Gram-positive microorganisms with variable morphology (rods or cocci); are non-sporulated, catalase-positive, aerobic, or anaerobic; may exhibit motility; and mostly ferment glucose (Coyle and Lipsky, 1990). Soto-Rodríguez *et al.* (2013) reported the genus *Microbacterium*, Gram-positive bacteria with rod morphology, are pathogenic in juvenile Nile tilapia. Information related to microorganisms in the order Actinomycetes in teleosts is limited. In previous

studies of pathogenic bacteria associated with Nile tilapia, carried out in our laboratory, we observed a large number of Actinomycetes of the total bacteria population, due to this, there was interesting to know what kind of species there were, their variation in the seasons of the year, as well as the population diversity of the Order. Therefore, the objective of this study was to isolate, identify and describe the species of bacteria belonging to the cultured Nile tilapia microbiota by bacterial culture grown in warm sub-humid climate during spring and summer seasons of 2015. This information has important economic and social relevance to tilapia aquaculture in warm sub-humid climates and is necessary for describing the microbiota in cultivated *O. niloticus*.

MATERIALS AND METHODS

Study animals

In order to analyze normal microbiota from the Order Actinomycetes, the study was conducted in healthy tilapia (*Oreochromis niloticus*), few organisms with 1-mm cutaneous lacerations, cultivated in semi-intensive systems (n = 30) during the spring and summer seasons of 2015, on farms located in a central zone of Mexico with an average annual temperature of 21.5°C (minimum 10°C, maximum 32°C).

Temperature and pH were measured and sampling was performed using a random yarn at four different points in the pond. Five organisms were obtained per farm, three farms were sampled per season, size and weight measurements were recorded, and to visibly determine that fish were healthy external analysis of parasites or lesions were performed before necropsy and the collection of tissue samples. Because we worked on production farms and we sampled other species for other studies within the same farm, it was not possible for producers to provide us with more organisms for the present study.

Necropsy and tissue sampling

The animals collected were sacrificed by an overdose of MS222 tricaine methanesulfonate (0.16 g m L⁻¹). The animals were cared for following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the protocols used in this study were reviewed and approved by the Institutional Committee for Care and Use of the Experimentation Animals of the faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics CICUAE No. DC-2015-2-3 (CICUAE, for its acronym in Spanish). A biopsy of the gill, liver, spleen, and intestine was

performed using sterile instruments, the samples were stored in 1.5 mL microfuge tubes at -20°C until analysis.

Bacteria isolation and identification

Each organ was macerated in a sterile saline solution (0.85% NaCl) in sterile individual bags. The homogenate was distributed with sterile swabs and incubated under aerobic conditions in duplicate at 37°C and room temperature (25-29°C) for ten days on 5% blood agar and Eugon-enriched medium supplemented with 1% B supplement (hematin yeast extract, L-glutamine, coenzyme, cocarboxylase, dextrose) and 10% fetal bovine serum (Bohle *et al.*, 2009). The growth of colonies was checked daily. After incubation, colonies were selected based on their shape, size, elevation, structure, color, and opacity and subcultured in 5% blood agar until pure cultures were obtained. The presumptive identification of the isolates was performed by primary bacterial identification and subsequent biochemical tests (MacFaddin and Jean, 2003).

The classification was determined using Cowan and Steel tax codes (1993), and classifications obtained at the species level were corroborated using the api[®] Coryne microsystems from bioMérieux, Inc. (Marcy-l'Étoile, France) according to the manufacturer's protocol. The results were analyzed using the electronic platform apiweb™ version: 1.3.1.

DNA extraction

A pure culture of each bacteria isolate was obtained using Eugon-enriched medium containing 1% B supplement and 10% fetal bovine serum and incubation for 48 h. bacteria DNA was obtained following the protocol described by Doyle and Doyle, 1987. DNA quantity and quality were measured with a Nanodrop™ spectrometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). The 16S rRNA fragment was amplified by PCR using the primers 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') and 1492R (5' ACGGCT ACCTTGTTACGACTT 3'), in the synthesis unit of the biotechnology institute of the National Autonomous University of Mexico. PCR was conducted in a 50-μL final volume reaction containing 200 μmol L⁻¹ dNTPs, 1.5 mmol L⁻¹ Mg, 1 μmol L⁻¹ of each primer, 1X buffer, 1 U of the high-fidelity polymerase, and 100 ng of bacterial genomic DNA as a template. Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (95°C, 5 min), followed by 35 cycles of denaturalization (94°C, 15 s), annealing (52°C, 15 s), and extension (72°C, 90 min), with a final extension step at 72°C for 5 min. Automated DNA sequencing was conducted in the synthesis unit of the biotechnology institute of the National Autonomous University of Mexico.

Molecular analysis

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 10 (Kumar *et al.*, 2018). Electropherograms were analyzed, and the right and left extremes were removed. The 16S rRNA was generated from forward and reverse sequence data using aligner software. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993).

Statistical analysis

Descriptive statistics as proportions and frequency were employed. The Kruskal-Wallis test was used to compare the isolation between organs. The Mann Whitney U test was used with GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA) to compare isolations between seasons.

RESULTS

Bacteria isolation and identification

From the fresh analysis of the eyes, gills, mouth, and skin, no parasitic organisms were observed. In the analysis of 150 tissue samples, 19 isolates of the order Actinomycetes were obtained with ten species grouped into five different genera: *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, and *Micrococcus*. According to the season, 19 isolates were obtained in the spring and 18 in the summer, from a total of 6 farms analyzed. According to the parameters analyzed during sampling, temperature was $28 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and pH was 8.0 ± 0.2 ; the length and weight of the organisms were similar for both samples, with average weights of 79 ± 2 and 81 ± 2 g, and 14 ± 1 and 11 ± 1 cm in the spring and summer, respectively. Twenty-four different bacteria were found in the spring and 25 in the summer (Table 1).

A total of 80% of the isolates presented Gram-positive rod morphology in palisade and angles of 45° , while the remaining 20% showed Gram-positive cocci morphology with tetrad arrangement. In the genus *Microbacterium*, all isolates were catalase- and oxidase-positive, and *Microbacterium imperial*

showed positive motility. *Microbacterium dextranolicum* and *Microbacterium aurum* used glucose as a carbon source, and only *Micrococcus luteus* was urease-positive. All *Micrococcus* isolates reduced nitrite.

In the spring season, microorganisms of the genus *Microbacterium* were dominant, accounting for 74% of the total population (n = 15 spring), which was represented by 32% *M. dextranolicum*, 37% *M. aurum*, and 5% *M. imperiale*. The genus *Brevibacterium* was the second most abundant group, followed by *Corynebacterium*, *Micrococcus*, and *Actinomyces* (Fig. 1A). In the summer season (n = 15 summers), lower genera of Actinomycetes were observed, of which 39% were represented by *Microbacterium*, comprising 11% *M. dextranolicum*, 6% *M. aurum*, and 22% *M. lacticum*. *Micrococcus luteus* accounted for 33% of the total population, followed by 28% by *Kocuria varians* (Fig. 1B).

The gills contained a greater representation of Actinomycetes, followed by the intestine. No isolations were made from water samples. The bacteria present in gills is likely that they are similar to those found in the aquatic environment where they live, according to Kumar *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2008 and Tang *et al.*, 2008. In the spring season, the presence of Actinomycetes was greater in the gills, while in the summer, the intestine contained more Actinomycetes. In the spleen, no isolates were obtained in the spring, with all isolates found in the summer season. The liver contained the same number of isolates in each season. The present is the first report of this type of bacteria in organs such as spleen and liver in Nile tilapia; no signs of apparent disease were observed. In the skin, samples collected in the spring season showed evident lesions; however, the number of isolates found was higher than those in the liver and spleen (Fig. 2).

There was a significant transition of the genera represented during the spring season, in which the most representative genus was *Microbacterium*, particularly *M. aurum* and *M. dextranolicum* (Fig. 3A). During the summer, the abundance of *M. luteus* and *K. varians* was higher, and that of *Microbacterium* was maintained; however, *M. lacticum* was the most frequent (Fig. 3B). No significant differences were observed between the analyzed organs and the number of isolates found ($P = 0.3743$ for spring and $P = 0.4593$ for summer). In the comparison of tissues, no significant differences were observed between the spleen and gill ($P \leq 0.05$), although no spleen isolates were observed in the spring season.

No significant difference was observed when comparing the numbers of isolated strains between the spring and summer seasons ($P \leq 0.05$). A comparison of the number of isolates obtained using

culture used revealed that the Eugon medium produced a higher number of isolates of species in the order Actinomycetes. Evaluation of these results by Fisher's test revealed a significant difference ($P = 0.0076$) between the culture media used.

Molecular analysis

The taxonomic keys for bacteria and databases of the microsystems of identification are nourished with information mainly focused on human or veterinary medicine of terrestrial organisms, so the identification of bacteria isolated from fish and aquatic environments may not be as accurate. Due to this, its identification with molecular tools and phylogeny was complemented. Species in the genus *Corynebacterium*, *Brevibacterium* and *Cellulomonas*, were observed in the same branch, with *Corynebacterium* and *Brevibacterium* then separated onto different nodes and into different taxa. These results indicate that these organisms can be classified as *Arthrobacter* (Genbank MN072343, MN077569, and MN072703) using genes as a reference, but it appears to be a different species or varieties. *Microbacterium lactcium* was observed in the same node that gave rise to *Microbacterium dextranoliticum*, indicating that they are different but highly similar bacteria. For *Actinomyces neuui* subsp. *anitratu*s, the genetic analysis suggested its classification as *Kocuria*, as shown for *K. varians* (MN072908). Finally, *Microbacterium imperiale* was classified separately from the other bacteria, and BLAST results revealed its classification in the genus *Rhodococcus* (MN072637) (Fig. 4).

Comparing the phylogeny of the 16S rRNA using a bootstrap test, including the first five queries (Fig. 5) and environmental samples (Fig. 6) of each bacteria analysis revealed that *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, and *Cellulomonas* were classified as *Arthrobacter* sp. (MN072343, MN077569, and MN072703). In the case of *K. varians* (Genbank MN072929) and *M. luteus* (Genbank MN071398), the identity was confirmed as along with *Microbacterium aurum* as *Microbacterium phyllosphaerae* (MN075195). *Actinomyces neuui* were classified as *K. varians*. The genus of *M. dextranoliticum* was confirmed but differed in the species based on molecular analysis, which suggested *Microbacterium phyllosphaerae* (MN072639).

Using traditional culture base-techniques with the microsystems API/Biochemistry versus 16S rRNA analysis for tilapia Actinomycetes identification revealed different classifications for *Microbacterium* (Table 2). The API system database was created primarily from humans and some

veterinary strains, and the data in GenBank are limited with respect to Actinomycetes fish bacteria, making species-level classification difficult.

DISCUSSION

The order Actinomycetes were represented by ten different species in Tilapia *O. niloticus*; the most representative genus in tilapia cultivated during the spring and summer seasons was *Microbacterium*. In the present study, different species of *Microbacterium* were isolated from different tissues such as the gill, liver, intestine, spleen, and gonad as well as skin containing cutaneous lesions. *Microbacterium aurum* was the most common species in the spring, accounting for 37% of 74% of the total population isolated, followed by the species *M. dextranoliticum* (32%) and *M. imperiale* (5%). In the summer, species substitution was observed; the most represented species was *Microbacterium lacticum* (22%) followed by *M. dextranoliticum* (11%) and with a lower representation by *M. aurum* (6%). Species associated with skin lesions were *M. aurum* and *M. dextranoliticum*, as they were identified in the skin and tissue fins with signs of cutaneous ulceration (Funke *et al.*, 1995). Few studies have examined *Microbacterium* species in fish and have mainly been described as commensal microorganisms (Mansooreh *et al.*, 2015; Larsen *et al.*, 2013). However, Soto-Rodríguez *et al.* (2013) reported *M. paraoxydans* as a pathogen in cultured tilapia, which can be explained by process of dysbiosis induced by external factors to the host such as changes in temperature, pH, and manipulation or overpopulation.

Species in the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium* have been reported as opportunistic pathogenic microorganisms in immunocompromised humans; however, these microorganisms are commonly found in sediments and water (Lee *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2013) and on normal skin and in the mucosal microbiota (Diez-Aguilar *et al.*, 2013), respectively. In contrast, there are no reports of pathogenicity in any teleosts for *Brevibacterium* and *C. propinquum* species.

The genera *Brevibacterium* (5%), *Corynebacterium* (5%), and *Micrococcus* (5%) were equally represented in the spring. In the summer season, these genera were not represented equally in the total population, with *M. luteus* and *K. varians* accounting for larger proportions (28 and 33%,

respectively). However, the genus *Microbacterium* remained present at 39% of the total population analyzed in this season. Thus, the spring population is more diverse than the summer population.

Although it is known that *M. luteus* has probiotic potential in tilapia, the genus *Micrococcus* is poorly described in fish (Azza *et al.*, 2009; Standen *et al.*, 2015). In general, *Micrococcus* and *Microbacterium* show significant potential for use in aquaculture fish as probiotics and the production of secondary metabolites for the industry. *K. varians* has been detected in activated sludge, semen, and urogenital area of some freshwater fishes (Boonthai *et al.*, 2016).

Few studies have conducted a molecular analysis of the 16S rRNA based on information in the databank. Few *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, and *Brevibacterium* have been described in freshwater fish or environmentally related samples, and there are no reports of *C. propinquum* in fish. For *Cellulomonas* sp. FJ626816.1 16S rRNA and 070605-23_H13_25, there are only two queries from gut bacteria samples of freshwater zooplankton species, but no phylogenetic relationship with *Cellulomonas* bacteria was observed in the present study (Fig. 6). For *Brevibacterium* sp., there is a report with accession number KP698716.1 of bacterial microbiota in golden mahseer (*Tor putitora*), but this species did not show a phylogenetic relationship with the strain in this study. For these three cases, the genetic analysis suggested classification as *Arthrobacter* sp. The query with the best identification and coverage was not from fish or environmental samples (Fig. 5), possibly because of the lack of genetic descriptions of freshwater fish bacteria in the genus *Arthrobacter*, which is important in studies of fish.

Classification of the bacteria *M. luteus* was confirmed by 16S rRNA analysis. There are no reports of the *K. varians* 16S rRNA in fish. Thus, this is the first report of this species isolated in the freshwater fish *O. niloticus*. *Microbacterium dextranolicum* showed high similarity to *Microbacterium phyllosphaerae* (KY936459.1) in environmental samples and a small difference from *M. phyllosphaerae* (KR811203.1) from freshwater lake columns, as well as a larger difference from *M. dextranolicum* (IHBB9212) of freshwater Chandra Tal Lake, but there are no reports for freshwater fish (Figs. 5-6).

For the bacteria classified based on morphology and biochemistry as *A. neuui* subsp. *anitratu*s and *M. lacticum*, 16S rRNA analysis revealed classifications as *K. varians* and *A. indicus* (KM588140.1), respectively, based on their high phylogenetic similarity and percentage of identity and coverage to the genus *Agromyces* (Table 2 and Fig. 6). 16S rRNA analysis of *M. imperiale* suggested a *Rhodococcus* bacteria, although it is important to consider that BLAST analysis results showed 93% identity and 91%

coverage; the next query with classification at the species level was *Rhodococcus fascians*, a plant pathogen bacterium, with 93% identity and 90% coverage. This result and those of phylogenetic analysis (Fig. 6) suggest that the bacteria classified as *M. imperiale* with morphological and biochemistry analysis may be *Rhodococcus* sp. because of its phylogenetic differences from the *M. imperiale* strain Bsw-22c in freshwater samples (KX161408.1) (Fig. 6).

Most of the genera of the Order Actinomycetes described in this study as part of the population of bacteria in Nile tilapia have been described in other species and environments as symbiont and commensal organisms (Kumar and Jadeja, 2018; Dsouza *et al.*, 2015; Mansooreh *et al.*, 2015; Soonthornchai *et al.*, 2015). Their presence may be related to the state of health of the fish, probably regulating pathogen and opportunistic species, although it is necessary to do more studies to verify this function within the ecosystem.

The present is the first report of Actinomycetes in tilapia *O. niloticus*, contributing information to databases of bacterial genes of interest for aquaculture and enabling identification of bacteria in tilapia in the future. Analyzed tilapia shows a dominance of the genus *Microbacterium* with 80% in spring and 35% in summer. Being the gills the organ that is most exposed to the external environment along with the skin and tissue of the cavities, it shows the highest percentage of isolates with a 43% of the total. The bacteria species with the lowest representation are *M. imperiale* and *M. lacticum* with a 4% representativeness each. Although the bacteria were characterized in tilapia without signs of disease, in the two analyzed seasons, there are variations in the proportion of different genera of bacteria in the total population, which suggests a dynamism of the microbiota throughout the productive cycle. The analyzed culture tilapia presents strains such as *Brevibacterium*, *M. luteus*, *C. propinquum* and *A. neuii* that only appear in spring, and the *K. varians* and *Cellulomonas* species only in summer. With increases in the development of tilapia aquaculture in sub-humid warm climates, it is very important to identify all organisms associated with the fish to improve cultivation and prevent disease and mortality, thus avoiding the use of antibiotics and generation of resistant microorganisms.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the advice and review of Dr. Carolina Tafalla Piñeiro and Dr. Estefania Muñoz Atienza from the INIA, Madrid, Spain. The MVZ Ana Lilia del Monte Rodriguez from the CENID-SAI, INIFAP Mexico, for technical assistance and the State Committee of Aquaculture Health of the State of Morelos, Mexico, for fieldwork and technical assistance. This work was supported by the National Council for Science and Technology (CONACyT) [grant No. 391616 2014-2018].

REFERENCES

- Azza, M., El-Rahman, A., Yassir, A.E.K. and Adel, M.E.S. 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunology*, 27(2): 175-80. doi: 10.1016/j.fsi.2009.03.020.
- Bohle, H., Tapia, E., Martínez, A., Rozas, M., Figueroa, A. and Bustos, P. 2009. *Francisella philomiragia*, bacteria asociada con altas mortalidades en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) cultivados en balsas-jaulas en el lago Lanquihue. *Archive Medical Veterinary*, 41 (3):237-244. doi: 10.4067/S0301-732X2009000300008.
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016. Semen collection methods affect the bacterial composition of the post-thawed semen of silver barb (*Barbodes gonionotus*). *Anim Reprod Sci.*, 166:90-8. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.007
- Cowan and Steel's. 1993. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. Ed GI Barrow, RKA Feltham. Cambridge University Press.
- Coyle, M.B. and Lipsky, B.A. 1990. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3(3): 227–246.
- Díez-Aguilar, M., Ruiz-Garbajosa, P., Fernández-Olmos, A., Guisado, P., Del Campo, C., Quereda, C. Cantón, R. and Meseguer M.A. 2013. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 32, 769–772. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1805-5>.
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.*, 19:11–15.

- Dsouza, M., Taylor, M. W., Turner, S. J., and Aislabie, J. 2015. Genomic and phenotypic insights into the ecology of *Arthrobacter* from Antarctic soils. *BMC genomics*, 16(1), 36. doi:10.1186/s12864-015-1220-2.
- Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchietti, S., Balcázar, J.L. and Davies, S.J. 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Appl Microbiol.*, 109(3):851-62. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.047.
- Funke, G., Falsen, E. and Barreau, C. 1995. Primary identification of *Microbacterium* spp. encountered in clinical specimens as CDC Coryneform Group A-4 and A-5 bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 33(1):188-92.
- Kumar, R. R., and Jadeja, V. J. 2018. Characterization and partial purification of an antibacterial agent from halophilic actinomycetes *Kocuria* sp. strain rsk4. *BiolImpacts: BI*, 8(4), 253-261.
- Kumar, A., Ince, I.A., Kati, A., and Chakraborty, R. 2013. *Brevibacterium siliguriense* sp. nov., a novel facultatively oligotrophic bacterium isolated from river water. *Int. J. Syst. Evol Microbiol.*, 63(2): 511-515. doi: 10.1099/ijs.0.038281-0.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.
- Larsen, A., Tao, Z., Bullard, S.A. and Arias, C.R. 2013. Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiol Ecol.*, 85(3):483-94. doi: 10.1111/1574-6941.12136.
- Lee, S. D. 2008. *Brevibacterium marinum* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 58(2):500-4. doi: 10.1099/ijs.0.65099-0.
- Ley, R.E., Losupone, C.A., Hamady, M., Knight, R. and Gordon, J.I. 2008. Worlds within worlds, the evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(10):776-788. doi: 10.1038/nrmicro1978.
- MacFaddin, and Jean, F. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3.ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. AR.
- Mansoorah, J., Mahdi, G., Wolfgang, K. and Konrad, J.D. 2015. Phylogenetic diversity and biological activity of culturable Actinobacteria isolated from freshwater fish gut microbiota. *Microbiol. Res.*, 175:6-15. doi: 10.1016/j.micres.2015.01.009.

- Martin M. F., Okpo E. A. and Andy I. E. 2019. Production of amylase by the intestinal microflora of cultured freshwater fishes (*Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*) reared locally in Calabar, south Nigeria. *WNOFNS*, 23:13-23.
- Odum, P.E. 1971. *Ecología*. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. Tercera edición. México.
- Soto-Rodríguez, S.A., Cabanillas-Ramos, J., Alcaraz, U., Gómez-Gil, B. and Romalde, J.L. 2013. Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii*, and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *J. Appl. Microbiol.*, 115(3):654-62. doi: 10.1111/jam.12280.
- Soonthornchai, W., Chaiyapechara, S., Jarayabhand, P., Söderhäll, K., and Jiravanichpaisal, P. 2015. Interaction of *Vibrio* spp. with the Inner Surface of the Digestive Tract of *Penaeus monodon*. *PLoS One*, 10(8), e0135783. doi: 10.1371/journal.pone.0135783
- Standen, B.T., Rodiles, A., Peggs, D.L., Davies, S.J., Santos, G.A., and Merrifield, D.L. 2015. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, 99(20) :8403-17. doi: 10.1007/s00253-015-6702-2.
- Sugita H., Kawasaki J., Deguchi Y. 1997. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Lett Appl Microbiol.*, 24(2):105-108. doi:10.1046/j.1472-765x.1997.00360.
- Tamura, K., and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. and Evol.*, 10(3):512-526.
- Tang, S.K., Wang Y., Schumann, P., Stackebrandt, E., Lou, K., Jiang, C.L., Xu, L.H., and Li, W.J. 2008. *Brevibacterium album* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a saline soil in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58(3):574-7. doi: 10.1099/ijs.0.65183-0.

Table 1. Total bacteria isolated from tilapia *Oreochromis niloticus*.

	Farm number	Number of bacteria per organism					Sub Total	Total
		1	2	3	4	5		
Spring	1	6	2	1	0	0	9	24
	2	4	3	0	0	0	7	
	3	5	1	2	0	0	8	
Summer	1	4	4	2	2	1	13	25
	2	2	0	2	1	3	8	
	3	0	2	0	1	1	4	

Table 2. Comparison results of bacteria classification obtained using classical methods and molecular biology methods. *The system API was used for the classification getting the result up to the level of genus and species were established according to (Funke et al., 1995).

API/Biochemistry	API ID	Databank access number	ID	Coverage
<i>Microbacterium dextranolicum</i> *	99.9%	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> KY936459.1	99%	99%
<i>Microbacterium aurum</i> *	99.9%	<i>Microbacterium</i> sp. KU560421.1	98%	96%
<i>Microbacterium lacticum</i> *	99.9 %	<i>Agromyces</i> sp. KF774201.1	99%	99%
<i>Microbacterium imperial</i>	99.7%	<i>Rhodococcus</i> sp. HQ652549.1	93%	91%
<i>Corynebacterium propinquum</i>	96.9%	<i>Arthrobacter</i> sp. HE662641.2	99%	96%
<i>Brevibacterium</i> sp.	99.2%	<i>Arthrobacter</i> sp. FN397658.1	99%	99%
<i>Actinomyces neuii ssp. anitratus</i>	97.5%	<i>Kocuria</i> sp. MF188118.1	100%	99%
<i>Micrococcus luteus</i> *	99.9%	<i>Micrococcus luteus</i> AM237388.1	99%	99%
<i>Kocuria varians</i>	99.9%	<i>Kocuria</i> sp. MF188118.1	99%	99%
<i>Cellulomonas</i> sp.	99.9%	<i>Arthrobacter</i> sp. KT424987.1	99%	93%

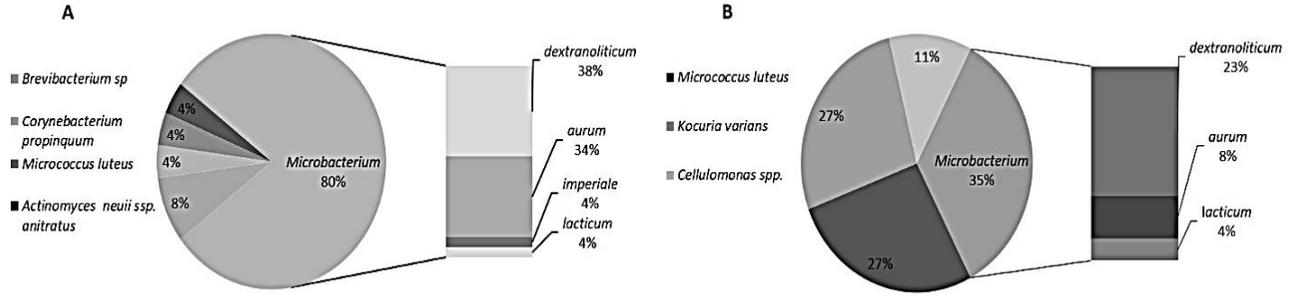


Figure 1. Diversity of Actinomycetes species isolated from tilapia in spring (A) and summer (B). $P = 0.3743$ for spring and 0.4593 for summer.

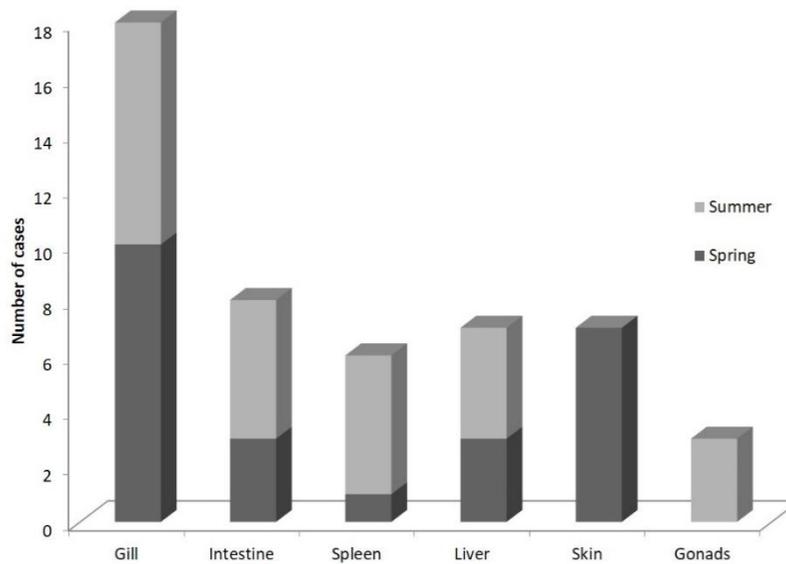


Figure 2. Distribution of Actinomycetes species in sampled organs ($n = 15$). Kruskal-Wallis test was performed with $p = 0.3743$ for spring and 0.4593 for summer.

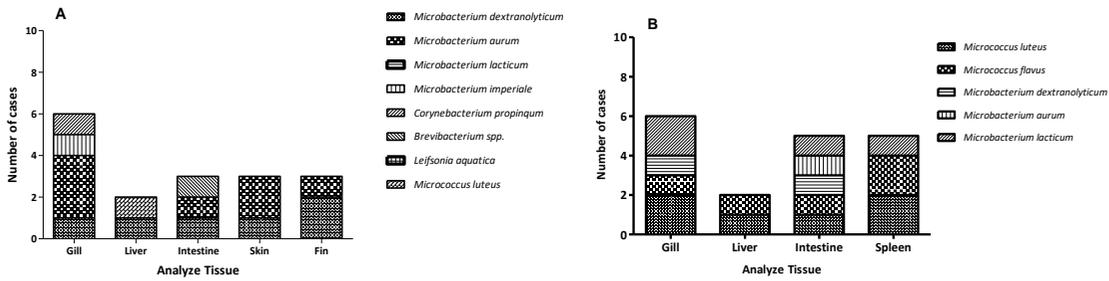
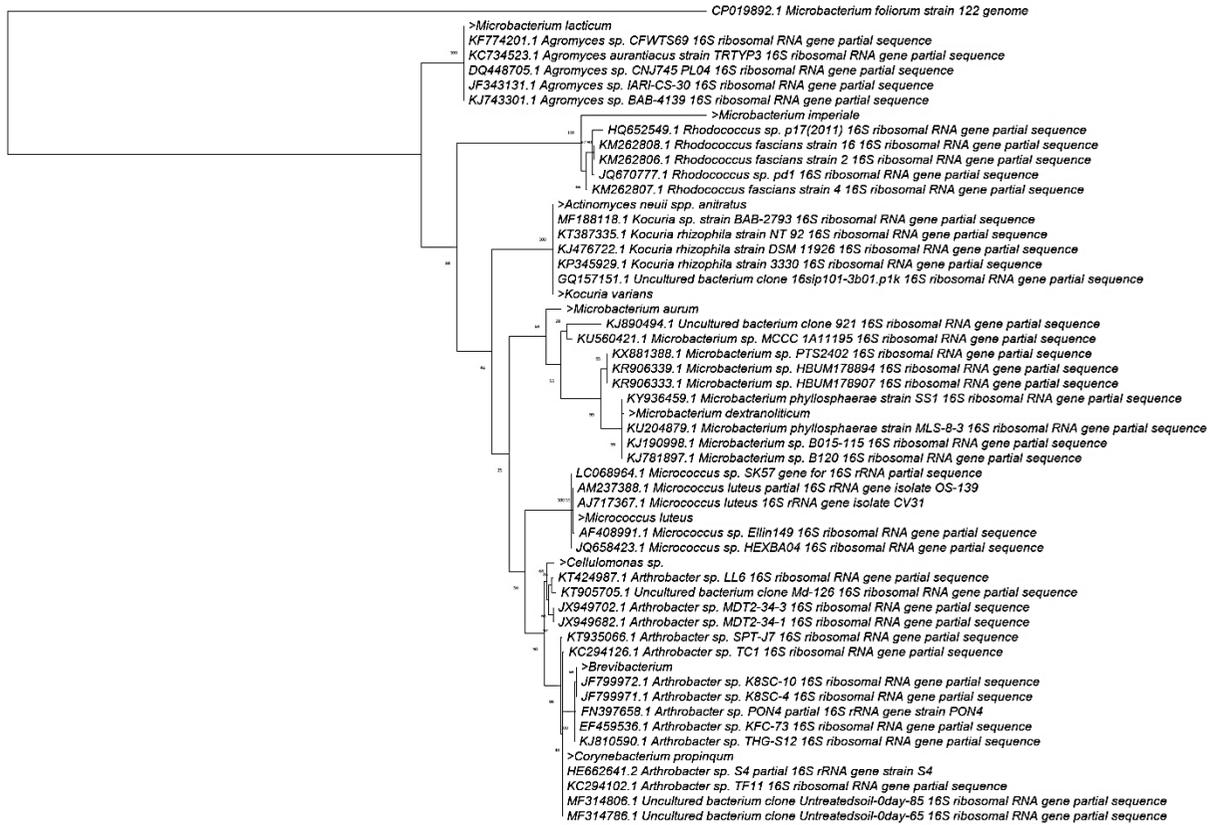


Figure 3. Relation of Actinomyces isolated in the different organs of Nile tilapia analyzed in spring (A) and summer (B). Mann Whitney U test, with a value <0.05.



Figure 4. Molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood method with 16S rRNA of bacteria. Ten nucleotide sequences representing the species isolated by traditional culture-based techniques were analyzed. There was a total of 1347 bases in the final dataset.



810

Figure 5. Molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood method and bootstrap test phylogeny of the tilapia Actinomycetes 16S rRNA. Isolates examined in the present study were marked with a point and compared with the first five queries of each in the databank. A total of 55 nucleotide sequences was analyzed, and 1135 bases were in the final dataset. Samples of the present study are indicated with the bullet>.

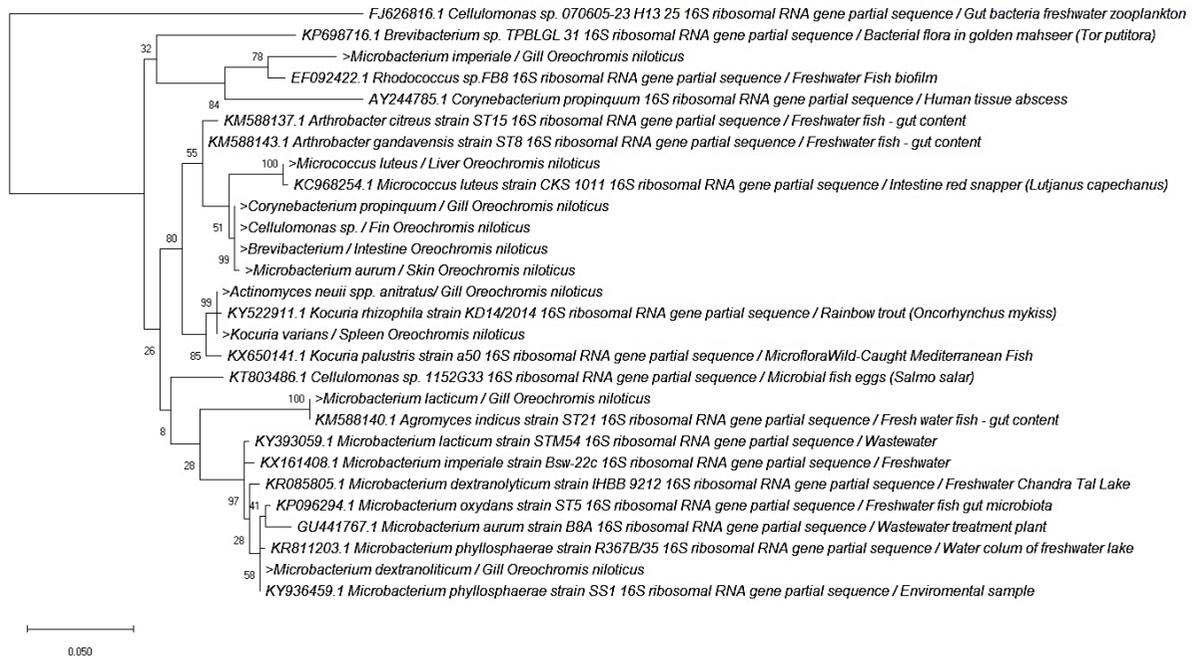


Figure 6. Molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood method and bootstrap test phylogeny, comparing the present study bacteria 16S rRNA versus 16S rRNA of related bacteria with fish or freshwater environmental samples. The analysis involved 28 nucleotide sequences. There was a total of 400 bases in the final dataset. Samples of the present study are indicated with the bullet >.