

## **Detección de hongos y oomycetos en cultivos de peces dulceacuícolas empleando el kit BIAADETECT, producto desarrollado a partir del homóptero *Dactylopius coccus*.**

Rocío Parra Laca<sup>1</sup>, Fernando García-Gil de Muñoz<sup>1</sup>, Laura E. Borrego Enríquez<sup>1</sup>, Humberto Lanz-Mendoza<sup>3</sup>, Ignacio Del Río Dueñas<sup>4</sup> y Fidel de la Cruz Hernández-Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Simón Bolívar, México, D.F., <sup>2</sup>CINVESTAV-IPN, México, D.F., <sup>3</sup>CISEI-INSP, Cuernavaca, Mor., <sup>4</sup>Colorantes Naturales de Oaxaca Fundación "Tlapanochestli", Coyotepec, Oaxaca

### **Resumen**

*En los cultivos de peces dulceacuícolas existen numerosos organismos patógenos que causan grandes pérdidas. Dentro de estos patógenos se encuentran los hongos y oomycetos y, dado que existen pocos tratamientos eficaces para combatirlos en los estanques de cultivo, se hace fundamental poseer métodos que permitan detectarlos y prevenirlos. Con la finalidad de resolver esta problemática, en los últimos años se ha desarrollado el uso de herramientas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las cuales tendrían un alto costo para su aplicación en la acuicultura. El producto biotecnológico BIAADETECT desarrollado a partir del homóptero *Dactylopius coccus* reacciona al ponerse en contacto con componentes de pared celular de los hongos como el zymosan y  $\beta$  1-3 glucanos, lo que sugiere una posible aplicación como un detector de la presencia de patógenos en agua.*

**Palabras clave:** *Dactylopius coccus*, BIAADETECT, cultivos dulceacuícolas, hongos, *Saprolegnia*

### **Abstract**

*There are numerous pathogenic microorganisms which cause important losses in fresh water fish cultures. Fungi and Oomycetes are included among these pathogens. Due to there are not treatments to eliminate this pathogens in the culture tanks, it is important to design methods to detect and prevent their development.*

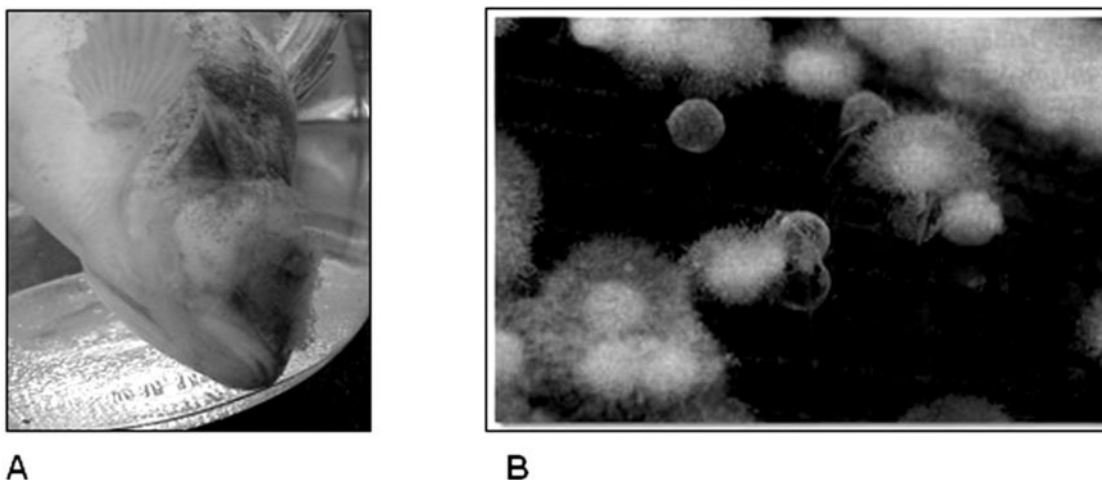
*In spite of in the last years, a number of cheap diagnostics tools, based on polymerase chain reaction (PCR) have been developed there are not methods for fungi/oomycete detection. The product BIAADETECT, developed from the Homoptera *Dactylopius coccus*, reacts contact with cellular wall compounds of fungi like zymosan and  $\beta$  1-3 glucans, which suggests a possible application as a predictor of pathogens in water.*

**Key words:** *Dactylopius coccus*, BIAADETECT, freshwater culture, fungi, *Saprolegnia*.

## Introducción

Los peces dulceacuícolas frecuentemente sufren infecciones por hongos como *Phoma sp.*, *Trichoderma sp.* y *Aspergillus sp.* y oomycetos como *Aphanomyces invadens*, *Achlya sp.* y *Saprolegnia sp.* (figura 1), tanto en vida libre como en granjas de producción acuícola siendo, en estas últimas, factores importantes de pérdidas económicas (Torto-Alalibo, Tian, Gajendran, Waugh, West & Kamoun, 2005). Estas enfermedades se presentan al coincidir parásitos viables, en número suficiente y con sobrevida larga con un hospedador susceptible. Para generarse la oportunidad de infección también debe darse una ruta de infección adecuada, como en la ruptura de las barreras mucosas y epiteliales, acompañado de cambios en los parámetros físico-químicos de la calidad del agua (Bondad-Reantaso, Subasinghe, Arthur, Ogawa, Chinabut, Adlard, Tan & Shariff, 2005).

Figura 1. Infección por *Saprolegnia sp.* en peces adultos (A) y huevos (B)



Infección por *Saprolegnia sp.* en epidermis de pez adulto (A) y capas externas en huevos (B) del bacalao de Murray (*Maccullochella macquariensis*). Imágenes de acceso abierto en el sitio: [http://botit.botany.wisc.edu/toms\\_fungi/apr2003.html](http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/apr2003.html), <http://www.natfish.tafensw.edu.au/>

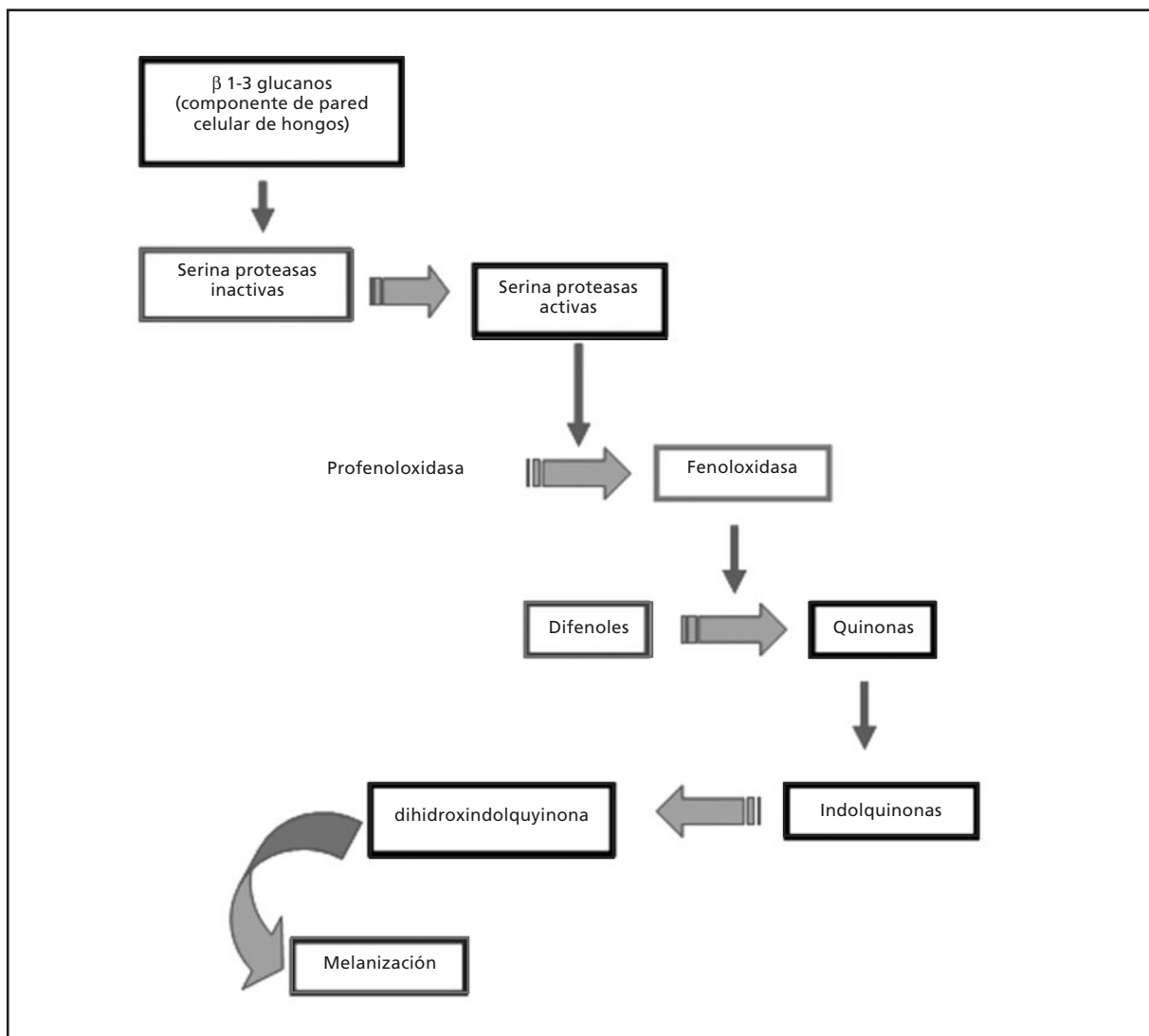
Algunos problemas causados por micosis en peces son controlables por la aplicación de Verde Malaquita, un colorante que puede ser aplicado solo o en combinación con otros fungicidas. Sin embargo, en los últimos años el uso de este compuesto ha sido prohibido en muchos países ya que se le han atribuido propiedades teratogénicas, de modo que este tipo de patologías han vuelto a ser un problema de importancia en la acuicultura (Alderman, 1982; Torto-Alalibo et al., 2005). Por estas razones, recientemente se han desarrollado herramientas moleculares para la detección de *Saprolegnia sp.* (Torto-Alalibo et al., 2005; Kamoun, 2003) como la creación de una base de datos genómica de oomycetos OGD ([www.oomycete.org](http://www.oomycete.org)) en la busca de posibles métodos de detección y/o tratamiento de infecciones; sin embargo, aún no se han generado soluciones prácticas para su aplicación en la acuicultura.

Los oomycetos son microorganismos capaces de infectar individuos de muy diversos tipos, incluyendo plantas (*Phytophthora sp.*), animales (*Aphanomyces sp.*) y microbios como *Pseudomonas fluorescens* (*Pythium sp.*), por lo que su estudio es importante desde el punto de vista de la ecología y de la producción (Kamoun, 2003, Rezzonico F, Bonder C, Defago C & Moenne-Locaz Y, 2005).

Hasta hace algunos años se consideró a los oomycetos dentro de los hongos debido a su crecimiento en forma hifal. Sin embargo los análisis moleculares recientes de estos microorganismos han mostrado diferencias con los hongos verdaderos o eumicetos como la presencia de:  $\beta$  1-3 glucanos, polímeros de celulosa, micolaminarinas (carbohidratos encontrados principalmente en el alga kelp y diatomeas), poca quitina en su pared celular y un ciclo reproductivo complejo con diploidia en la fase vegetativa. Estos datos han indicado que los oomycetos presentan muy poca afinidad taxonómica con los hongos y, en cambio, están muy emparentados con las algas cafés, agrupándose dentro de los Stramenopiles (Torto-Alalibo et al., 2005; Kamoun, 2003).

Por otro lado, aunque no se sabe la posible infectividad de los oomycetos sobre insectos se conoce que la hemolínfa (HL) de la grana fina del nopal, *Dactylopius coccus*, la cual posee disuelto y dentro de células sanguíneas (hemocitos) al ácido carmínico, que se consume en presencia de componentes propios de la pared celular de hongos, activan la ruta de la profenoloxidasa, produciéndose una reacción de melanización (Hernández-Hernández, García-Gil, Rojas-Martínez, Hernández-Martínez y Lanz-Mendoza, 2003) con el consecuente consumo del pigmento rojo y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (García, Calzada, Rangel, Castro, Lanz, Del Río y Hernández, 2005; Nappi, Carton & Vass, 1995) los cuales son capaces de destruir a los agentes invasores (Carton & Nappi, 1992) (figura 2). Recientemente se ha desarrollado un procedimiento para preparar un sistema de detección de patógenos a partir de componentes del sistema inmune de *D. coccus* (BIAADETECT, patente en trámite) del cual en este trabajo se evaluó su capacidad de detectar diferentes hongos y oomycetos.

Figura 2. Esquema de la activación del sistema de la profenoloxidasa y su participación en la formación de melanina



El proceso de melanización requiere de la activación en cascada de la fenoloxidasa para la formación de difenoles y quinonas las cuales en presencia de compuesto nucleofílicos se ciclan formando los precursores de la melanina como la DHI (dihidroxindolquinona).

## Objetivo

En este trabajo se propuso aislar e identificar hongos y oomycetos de muestras de peces *Carassius auratus* con infección micelial evidente y muestras de agua de estanques de peces dulceacuícolas.

Dada la capacidad de los oomycetos para infectar organismos de distintos tipos se analizó también la respuesta del kit BIAADETECT obtenido a partir de *D. coccus*, insecto de importancia económica, ante la presencia de los hongos y oomycetos aislados de peces y muestras de agua.

## Método

**Reactivos.** Los reactivos utilizados en este trabajo fueron de la más alta calidad y se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical Co. (St. Louis Missouri).

El kit BIAADETECT se obtuvo de la *compañía productora de colorantes naturales Tlapanochestli Coyotepec, Oaxaca (www.aztecolor.com)*.

**Obtención de muestras de estanques y aislamiento de colonias fúngicas.** Se tomaron muestras de 500 ml de estanques de peces dulceacuícolas, las cuales se procesaron en el menor tiempo posible después de su obtención para evitar así cambios en los parámetros de pH, temperatura, oxígeno, entre otros, que pudieran causar alteraciones en los patógenos presentes, producción de bacterias y formación de hongos externos a la muestra. Para obtener muestras de los peces infectados (*Carassius auratus*) se realizó un raspado superficial de la epidermis con asa de siembra, tomando el material a partir de la parte media lateral del cuerpo. El material obtenido se suspendió en 100 µl de agua estéril.

**Cultivo de hongos y oomycetos.** A partir de las muestras de agua y raspados se hicieron diluciones con solución salina amortiguadora de fosfatos estéril (PBS 1X), para cultivarlas según las condiciones de la norma oficial mexicana (NOM-111-SSA1-1994) para la identificación de hongos. Para este fin alícuotas de 25 µl se sembraron por extensión sobre la superficie de medio papadex-

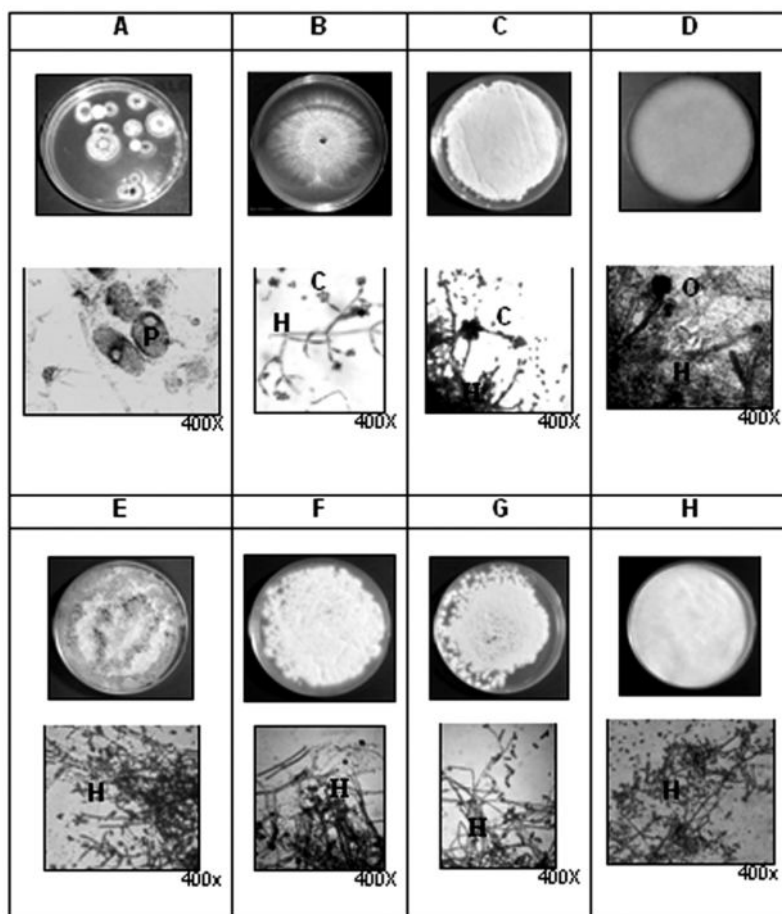
trosaagar (PDA) incubados a 26° C. Transcurridas 120 h se realizaron preparaciones en fresco (KOH al 10% y azul algodón) observadas en microscopía de luz. Los hongos y oomycetes obtenidos se enviaron para su identificación al departamento de Botánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Determinación de la presencia presuntiva de patógenos mediante el kit BIAADETECT. Para las determinaciones se usó el kit BIAADETECT según las especificaciones de uso del fabricante. Se utilizaron alícuotas de 100 µl de muestras de estanques y las obtenidas de epidermis. Las muestras se incubaron con 50 ml de BIAADETECT durante 20 min a 37° C, centrifugando a 14000 rpm por 3 min y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 495 nm (pico máximo de absorbancia del ácido carmínico) (Schmitt, P & Gunter, H, 1984).

## Resultados

**Aislamiento e identificación de hongos presentes en muestras de estanques dulceacuícolas.** A partir de las muestras de estanques y raspado de epidermis de peces infectados se aislaron cultivos puros de ocho diferentes especies de hongos y oomycetos, de los cuales se identificaron tres géneros de hongos: *Phoma sp.*, *Trichoderma sp.* y *Aspergillus sp.*, y un género de oomyceto: *Saprolegnia sp.* Los organismos A (*Phoma sp.*), B (*Trichoderma sp.*), D (*Saprolegnia sp.*) y H fueron obtenidos de muestras de estanques dulceacuícolas, por otro lado, los organismos C (*Aspergillus sp.*), E, F, y G fueron obtenidos del raspado de epidermis de la parte media lateral de peces infectados (figura 3). De los organismos aislados se hizo su identificación con claves taxonómicas y reacciones con el kit BIAADETECT obtenido a partir de *D. coccus*.

Figura 3. Crecimiento e identificación de los hongos y oomicetos aislados de muestras de estanques y peces infectados



Muestras de raspados de piel de peces infectados (C, E, F, y G) y de agua de tanques de cultivo (A, B, D y H), cultivados en medio PDA durante 120 h. Se hizo una identificación al microscopio con la utilización de claves taxonómicas, identificando los siguientes géneros: *Phoma* sp. (A), *Trichoderma* sp. (B), *Aspergillus* sp. (C) y *Saprolegnia* sp. (D). P.- Picnidio; C.- Conidias; H.- Hifas; O.- Oosporangios.

Pruebas de consumo de BIAADETECT. Los componentes de la pared celular de los hongos y oomicetos inducen cambio colorimétrico al estar en contacto con el producto BIAADETECT el cual se consume durante la reacción, midiendo el consumo por espectrofotometría (tabla 1).

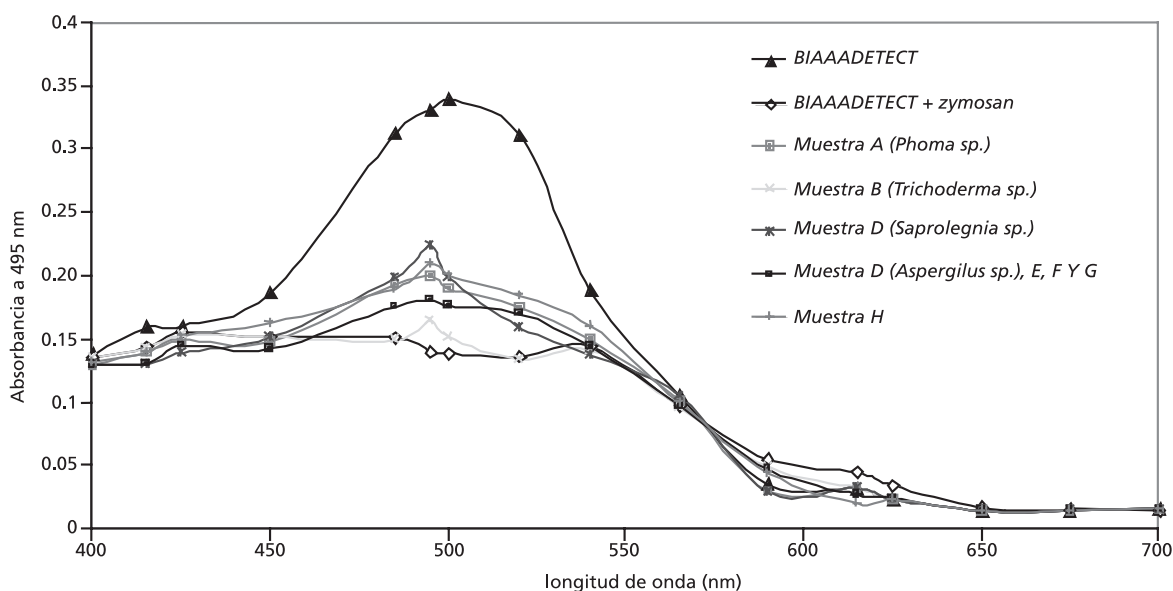
Tabla 1. Reacción de BIAADETECT a la presencia de hongos y oomicetos presentes en los estanques de cultivos y en peces infectados

	Control BIAADETECT	Muestra A <i>Phoma</i> sp.	Muestra B <i>Trichoderma</i> sp.	Muestra C, E, F y G Raspado ( <i>Aspergillus</i> sp.)	Muestra D <i>Saprolegnia</i> sp	Muestra H
Abs. absoluta	0.332	0.2001	0.165	0.182	0.225	0.21
Abs. ajustada	0.202	0.0701	0.035	0.052	0.098	0.08
Porcentaje	100	34.70	17.32	25.74	48.51	39.6

Muestras de los hongos y oomicetos aislados de aguas y pieles de peces infectados (Véase figura 3) se incubaron con BIAADETECT, midiendo su consumo espectrofotométricamente (495 nm).

**Espectro de absorción de BIAADETECT incubado con hongos y oomicetos y zymosan.** Para analizar si existen componentes que interfieran en las mediciones espectrofotométricas en las muestras obtenidas de los estanques, en muestras de piel de peces infectados y el zymosan, sometidas a interacción con BIAADETECT, se hicieron espectros de absorción en el rango de 400-700 nm después del consumo de BIAADETECT. En todo el espectro analizado, las diferencias en la absorbancia entre las muestras se dieron alrededor del pico de absorción a 495 nm. El zymosan (componente de la pared celular de hongos) presentó una absorbancia de 0.13 respecto al pico del 495 nm (0.35), las muestras incubadas con hongos y oomicetos presentaron una absorbancia menor respecto al control dándose el reconocimiento de los componentes de la membrana celular y el consecuente consumo del pigmento rojo durante el proceso de melanización, sugiriéndose una posible relación entre la absorbancia y la cantidad de hongo presente en la muestra (figura 4.)

**Figura 4.** Espectro de absorción de BIAADETECT obtenido a partir de *D. coccus* incubado en presencia de hongos y oomicetos aislado de estanques dulceaúcolas



Las muestras obtenidas de agua de estanques de peces dulceaúcolas (A, B, D y H) así como la muestra de raspado de piel de peces infectados que contenía los hongos C (*Aspergillus sp.*), E, F, y G (Véase figura 3) se mezclaron con BIAADETECT e incubaron por 30 min. haciendo un espectro de absorción en el rango 400-700 nm.


## Discusión

Al analizar las muestras de agua obtenidas de estanques dulceaúcolas se determinó la presencia de tres hongos, de los cuales, se cuenta con la identificación de los géneros *Phoma sp.* y *Trichoderma sp.* así como la presencia e identificación del oomiceto *Saprolegnia sp.* En los raspados de epidermis realizados a peces visiblemente infectados se obtuvo el crecimiento de cuatro especies de hongos de los cuales se identificó el genero *Aspergillus sp.* Los hongos y oomicetos cultivados a partir de las muestras son organismos comúnmente patógenos en cultivos dulceaúcolas siendo el oomiceto *Saprolegnia sp.* el agente infeccioso con mayor patogenicidad para los peces dulceaúcolas cultivados. La identificación de *Saprolegnia sp.* en los cultivos es un avance importante para así poder prevenir la infección de este oomiceto en peces dulceaúcolas, ya que al contar con este agente patógeno en el agua, aunado a factores como el estrés provocado por densidad de siembra y cambio en la temperatura del cultivo, se favorecería en los peces la invasión al ocurrir ruptura de la barrera mucosa epitelial dándose la enfermedad conocida como saprolegniosis; disminuyendo así la calidad y número de animales.

En las pruebas realizadas con el kit BIAADETECT con los hongos y oomycetos aislados se presentó una reacción positiva al darse el consumo del pigmento rojo con un cambio en la coloración en respuesta a un reconocimiento de los organismos presentes en la muestra del cultivo incubada con BIAADETECT, esta respuesta se ve reflejada cuando la lectura espectrofotométrica disminuyó, lo cual sugiere que el sistema no sólo tiene la capacidad de interactuar con componentes de la pared purificados como es el zymosan, sino también con la presencia de hongos y oomycetos presentes. Tanto en el caso de las muestras donde se presentó un mayor crecimiento de hongos como en las alícuotas que contenían el raspado de epidermis, se da un decremento en la absorbancia, esto sugiere una relación entre la concentración de los componentes de pared celular de hongo y oomyceto y la variación espectrofotométrica y con esto podría determinarse la probabilidad de infección del cultivo y tomarse medidas para evitar la parasitosis.

## Conclusión

La detección de oomycetos y hongos patógenos en el cultivo complementados con una supervisión constante de los parámetros temperatura, nitritos y oxígeno, entre otros, da la posibilidad de implementar tratamientos profilácticos, dando como resultado la disminución en el desarrollo de parásitos y la reducción de infecciones en los organismos acuáticos.

Los datos obtenidos del estudio del sistema BIAADETECT en presencia de estos patógenos proporcionan herramientas para la evaluación diagnóstica y su aplicación en cultivos comerciales. 

## Agradecimientos

Agradecemos la asesoría durante el trabajo de identificación de hongos a la Biol. Rosario Vázquez Bravo del Departamento de Botánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

## Referencias

- Alderman, D. J. (1982). *Fungal disease of aquatic animals*. In: Roberts R. J. ed.: *Microbial Diseases of Fish*. Special Publications of the Society for General Microbiology. N° 9, Academic Press, London and New York. 189-242.
- Bondad-Reantaso, G. Melba, Subasinghe Rohana P., Arthur Richard J., Ogawa Kazuo, Chinabut Supranee, Adlard Robert, Tan Zilong, Shariff Mohamed. (2005). *Disease and health management in Asian aquaculture*. *Veterinary Parasitology* 132, 249-272.
- Carton, Y. & Nappi, A. J. (1992). *Inheritance of cellular immune resistance in Drosophila melanogaster*. *Heredity*., 69, 393-399.
- Chase, M. R., Raina, K., Bruno, J. & Sugumaran, M. (2000). Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidase from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30, 953-967.
- García, G. F., Calzada, A., Rangel, C., Castro, G., Lanz, H., Del Río I. y Hernández, F. (2005). *Generación de anión superóxido O<sub>2</sub> en respuesta a zymosan (β 1-3 glucanos), activador de la respuesta inmune en la cochinilla fina del nopal (Dactylopius coccus: Homóptera)*. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria, Universidad Simón Bolívar*, 4, 26-31.
- Hernández-Hernández, Fidel de la Cruz., García-Gil, de Muñoz F., Rojas-Martínez, A., Hernández-Martínez, S. y Mendoza-Lanz, Humberto (2003). *Carminic acid dye from the homopteran Dactylopius coccus hemolymph is consumed during treatment with different microbial elicitors*. *Arch. Insect Biochem. and Physiol.*, 54,37-45.
- Kamoun, S. (2003). *Molecular genetics of pathogenic oomycetes*. *Eucaryot. Cell*, 2,191-199
- Nappi, A. J., Carton, Y & Vass, E. (1995). *Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites*. *Eur. J. Cell Biol.*, 68, 450-456.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. *Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. Publicación 13/09/1995. 111-ssa1.pdf-00B.
- Rezzonico F, Binder C, Defago C & Moenne-Loccoz Y.(2005). *The type III secretion of biocontrol Pseudomonas fluorescens KD targets the phytopathogenic Chromista Pythium ultimum and promotes cucumber protection*. *Mol. Plant. Microb. Inter.*, 18(9),1991-1001
- Schmitt, P & Gunte, H. (1984). *A 1H and 13C NMR Study of Carminic Acid*. *Org. Mag. Res.*, 22,446-449.
- Torto-Alalibo, Trudy., Tian, Miaoying., Gajendran, Kamal., Waugh, Mark E., Westvan, Pieter & Kamoun Saphien. (2005). *Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen Saprolegnia parasitica reveal putative virulence factors*. *BMC Microbiology*, 5, 46, 1-13.