

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETERMINACIONES FISICOQUIMICAS Y PRESENCIA DE *Streptococcus agalactiae* EN GRANJAS DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) DEL DISTRITO DE RIEGO DE ATIOCOYO SUR

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO POR

YENI STEFANY PERDOMO RAMIREZ

KELVIN ALEXANDER VASQUEZ HERNANDEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

MAYO 2023

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS BENITEZ

**SECRETARIO GENERAL**

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

**SECRETARIA**

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

**DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO**

**DIRECTORA GENERAL**

M.Sc. Ena Edith Herrera Salazar

**TRIBUNAL EVALUADOR**

**ASESORA DE AREA EN MICROBIOLOGIA**

PhD. Tania Ethel Cuadra Zelaya

**ASESORA DE AREA EN APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

M.Sc. Morena Lizette Martínez de Díaz

**DOCENTE ASESOR**

Lic. Carlos Alberto Buendía Rivas

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios todopoderoso por haberme guiado y darme además de fortaleza y confianza, la inteligencia necesaria para lograr mis propósitos y así poder culminar exitosamente mis estudios.

A mis padres que a lo largo de mi vida me han apoyado y motivado en mi formación académica, creyendo en mí en todo momento sin dudar de mis habilidades y actitudes.

A nuestros docentes asesores M.Sc. Carmen Polío y Lic. Carlos Buendía por el tiempo y dedicación que nos brindaron para este trabajo ¡muchas gracias! ¡Dios los bendiga!

Al comité de trabajo de graduación: M.Sc. Ena Herrera, PhD. Tania Cuadra y M.Sc. Morena Martínez, por orientarnos a lo largo de la realización de esta investigación.

También agradezco al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), al Laboratorio de Análisis de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia, y a la Asociación de Regantes de Atiocoyo Sur (ARAS), por su colaboración, atención y disposición en permitirnos ejecutar nuestro trabajo de investigación.

**Yeni Stefany Perdomo Ramírez**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco principalmente a nuestros a las instituciones como el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), a la Facultad de Química y Farmacia y a la Asociación de Regantes de Atiocoyo Sur (ARAS) por permitirnos ejecutar nuestra investigación, por su enorme colaboración y disposición en ayudarnos en todo momento.

A nuestros docentes asesores, M.Sc. Carmen Polío y Lic. Carlos Buendía por el valioso apoyo constante y sus orientaciones, las cuales fueron fundamentales para la ejecución de nuestra investigación.

Al jurado evaluador y M.Sc. Ena Herrera por su tiempo, paciencia y por aportar de forma valiosa a esta investigación.

También agradezco a mi Compañera, Yeni Stefany Perdomo Ramírez, por el incondicional apoyo en todo momento, por compartir este enorme reto y triunfar juntos en ello ¡lo logramos Yeni!

**Kelvin Alexander Vásquez Hernández**

## **DEDICATORIA**

A Dios por todo lo que me han dado a lo largo de mi vida y por siempre estar ahí cuando más los necesito, por guiarme para poder lograr mis propósitos iluminándome, dándome fuerzas y sabiduría para enfrentar los obstáculos vividos a lo largo de mis estudios.

Con mucho cariño y amor principalmente a mi madre Marta Argelia Ramírez por haberse esforzado y limitado muchas veces para darme mis estudios y por ese apoyo incondicional que siempre me brindo, a mi abuela Rosenda Ramírez por su amor y apoyo, a mi querido amigo y compañero de vida Nelson Sonaí Fabian, quien a lo largo de mi carrera siempre estuvo ahí para apoyarme en mis estudios motivándome a seguir adelante, a mi hermana Tatiana Ramírez por ayudarme en lo que podía y por motivarme siempre.

A mi amiga incondicional, Nuvia Judith Mena, con la que compartí muchos momentos de estudio y alegría, que lograron hacer de mis años universitarios un recuerdo bueno e inolvidable.

A mi compañero de tesis Kelvin Alexander Vásquez, gracias por su empeño, paciencia, apoyo y comprensión que me brindó.

**Yeni Stefany Perdomo Ramírez**

## INDICE

	Pág. N°
Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xix
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco teórico	24
3.1 Generalidades de las tilapias	24
3.2 Biología de la especie	24
3.2.1 Distribución	24
3.2.2 Morfología externa	25
3.2.3 Características taxonómicas de <i>Oreochromis niloticus</i>	26
3.2.4 Hábitos alimenticios	27
3.2.5 Hábitos reproductivos	28
3.2.6 Caracteres sexuales	29
3.3 Enfermedades en tilapias	29
3.4 Estreptococosis en tilapias cultivadas	31
3.4.1 Biología de <i>Streptococcus agalactiae</i>	31
3.4.2 Mecanismo y factores de virulencia	33
3.4.3 Signos clínicos y lesiones por estreptococosis	34
3.4.4 Kit miniaturizado para la identificación de microorganismos	36
3.5 Calidad del agua en el cultivo de tilapias	37

3.5.1	Indicadores de la calidad del agua de cultivo	38
3.6	Correlación de la calidad de agua y la presencia de <i>S. agalactiae</i>	44
3.7	Cultivo de tilapias y estreptococosis en El Salvador	45
Capítulo IV		
4.0	Diseño metodológico	48
4.1	Tipo de estudio	48
4.1.1	Transversal	48
4.1.2	Experimental	48
4.1.3	De campo	49
4.2	Investigación bibliográfica	49
4.3	Investigación de campo	49
4.3.1	Universo	49
4.3.2	Muestreo	50
4.3.3	Muestra	51
4.3.4	Modelo matemático para el muestreo	51
4.3.5	Instrumentos de recolección de datos	52
4.4	Análisis estadístico para los datos obtenidos	52
4.5	Parte Experimental	53
4.5.1	Recolección de las muestras	53
4.5.2	Preparación de las muestras de tilapias y agua de estanques	56
4.5.3	Análisis microbiológico en tilapias y agua de estanque	58
4.5.4	Identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i>	60
4.5.5	Análisis fisicoquímico al agua de estanque	63
Capítulo V		
5.0	Resultados y discusión de resultados	74
5.1	Presencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> en tilapia y agua de cultivo	74
5.1.1	Presencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> en agua de cultivo	74

5.1.2	Presencia de <i>Streptococcus agalactiae</i> en tilapia	77
5.1.3	Identificación de <i>S. agalactiae</i> en muestras presuntivas	81
5.2	Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo	87
5.2.1	Evaluaciones fisicoquímicas al agua de cultivo	87
5.2.2	Evaluaciones en función a los casos positivos de <i>S.agalactiae</i>	99
5.3	Correlación de las evaluaciones con presencia de <i>S.agalactiae</i>	108
5.3.1	Oxígeno disuelto y pH	108
5.3.2	Temperatura y lluvia acumulada	109
5.3.3	Alcalinidad y dureza	111
5.3.4	Nitrato y fosfato	112
5.3.5	Nitrito	113
5.3.6	Amonio	114
Capítulo VI		
6.0	Conclusiones	118
Capítulo VII		
7.0	Recomendaciones	121
Bibliografía		
Anexos		

## INDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Pág. N°
1. Características reproductivas de las tilapias	28

## INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág. N°
1. Morfología externa de una tilapia	26
2. Tilapia nilótica ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	27
3. <i>Oreochromis niloticus</i> macho	29
4. <i>Oreochromis niloticus</i> hembra	30
5. Interrelación entre el estrés, la salud y enfermedad de los peces	30
6. Diferentes tipos de estresores que afectan a los peces	31
7. Signos de enfermedad por <i>Streptococcus spp.</i> en tilapia nilótica	37
8. Método de cuadricular el estanque	53
9. Áreas a muestrear para el análisis fisicoquímico del agua	55
10. Disección de tilapias	57
11. Resultados del análisis microbiológico a agua de estanque	76
12. Sintomatología por estreptococosis en las tilapias capturadas	79
13. Sintomatología externa por estreptococosis	79
14. Características macroscópicas de las colonias presuntivas aisladas	81
15. Tinción de Gram de los casos presuntivos	81
16. Resultados prueba de CAMP para los casos presuntivos	82
17. Resultados prueba de sensibilidad/resistencia a antibióticos	84
18. Resultado de las reacciones del kit Microgen® Strep-ID	85
19. Resultados de la hidrólisis del hipurato	86
20. Evaluaciones de oxígeno disuelto en el agua de cultivo	88
21. Evaluaciones de pH en el agua de cultivo	90
22. Evaluaciones de temperatura en el agua de cultivo	91
23. Evaluaciones de la alcalinidad en el agua de cultivo	93
24. Evaluaciones de la dureza en el agua de cultivo	94
25. Evaluaciones de iones nitrato en el agua de cultivo	96
26. Evaluaciones de iones nitrito en el agua de cultivo	96

27. Evaluaciones de iones fosfato en el agua de cultivo	98
28. Evaluaciones de amonio en el agua de cultivo	99
29. Oxígeno disuelto, pH, temperatura y <i>S. agalactiae</i>	101
30. Evaluación de oxígeno disuelto, pH y temperatura in situ	101
31. Alcalinidad y dureza en los estanques positivos a <i>S. agalactiae</i>	102
32. Resultados del análisis volumétrico para determinar alcalinidad	103
33. Resultados del análisis volumétrico para determinar dureza	103
34. Concentración de nitratos en los estanques positivos a <i>S. agalactiae</i>	105
35. Resultados del análisis para determinar iones nitrato	106
36. Resultados del método colorimétrico para determinar iones fosfato	105
37. Concentración de nitritos en los estanques positivos a <i>S. agalactiae</i>	106
38. Resultados del análisis fotométrico para determinar iones nitrito	106
39. Concentración de amonio en los estanques positivos a <i>S. agalactiae</i>	107
40. Resultados del análisis fotométrico para determinar de amonio	109
41. Correlación entre oxígeno disuelto, pH y <i>S. agalactiae</i>	110
42. Correlación entre temperatura, lluvia acumulada y <i>S. agalactiae</i>	111
43. Correlación entre alcalinidad, dureza y <i>S. agalactiae</i>	113
44. Correlación entre iones fosfato, nitrato y <i>S. agalactiae</i>	113
45. Correlación entre iones nitrito y <i>S. agalactiae</i>	114
46. Correlación la concentración de amonio y <i>S. agalactiae</i>	115

## INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1.Características fenotípicas de las especies de <i>Streptococcus</i>	32
2.Parámetros óptimos de la calidad del agua	37
3.Tiempo y frecuencia de muestreo al Distrito de Riego de Atiocoyo Sur	48
4. <i>S. agalactiae</i> en muestra de agua de estanque	74
5.Sintomatología de las muestras de tilapias capturadas	77
6.Resultados de la prueba de sensibilidad/resistencia a antibióticos	83
7. Resultados obtenidos en la identificación con Microgen® Strep-ID	84
8.Identificación de las muestras presuntiva a <i>S. agalactiae</i>	86

## INDICE DE ANEXOS

### Anexo N°

1. Distrito de Riego de Atiocoyo Sur, San Pablo Tacachico, La Libertad
2. Cálculo del tamaño de muestra a partir del servidor web Win Epi
3. Formato de la hoja de recolección de datos in situ
4. Equipos utilizados para el análisis fisicoquímico
5. Preparación de la muestra de tilapia para análisis microbiológico
6. Hoja de cotejo para sintomatología externa de las especies recolectadas
7. Aislamiento y purificación de *streptococcus agalactiae* obtenido de tilapias
8. Aislamiento y purificación de *streptococcus agalactiae* obtenido de agua de estanque
9. Procedimiento para la tinción de GRAM
10. Prueba de CAMP
11. Esquema para la prueba de resistencia/sensibilidad a antibióticos
12. Identificación mediante Microgen® Strep-ID
13. Tabla de colores y formulario para resultados de Microgen® Strep-ID
14. Hidrólisis del hipurato
15. Determinación de la alcalinidad en el agua de estanque
16. Determinación de la dureza en el agua de estanque
17. Determinación de la concentración de iones nitrato
18. Determinación de la concentración de iones nitrito
19. Determinación de la concentración de iones fosfato
20. Determinación de la concentración de iones amonio
21. Preparación de reactivos para análisis químico
22. Evaluaciones preliminares hechas al Distrito de Riego de Atiocoyo Sur
23. Recolección y transporte de las muestras
24. Preparación de la muestra de tilapias (pool de órganos)
25. Hojas de cotejo referente a la sintomatología externa por estreptococosis en las tilapias capturas

26. Informe Microgen® Strep-ID referente a los casos positivos a *S. agalactiae*
27. Datos primarios referente a las determinaciones de oxígeno disuelto, pH y temperatura del agua de cultivo
28. Resultados de las evaluaciones fisicoquímicas realizadas al agua de cultivo
29. Ubicaciones geográficas de las granjas positivas a *S. agalactiae*
30. Estandarización de las soluciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N y EDTA 0.01 M
31. Cálculos para la determinación de alcalinidad, dureza, concentración de iones nitrato, nitrito, fosfato y amonio

## **Abreviaturas**

**APHA:** American Public Health Association (Asociación Estadounidense de Salud Pública).

**ARAS:** Asociación de Regantes de Atiocoyo Sur.

**CENSALUD:** Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.

**BHI:** Brain Heart Infusion (Infusión Cerebro Corazón).

**CAMP:** Christie Atkins-Munch- Petersen.

**EDTA:** ácido etilendiamintetraacético.

**ICAR:** Informe de la Calidad de Agua de los Río en El Salvador.

## Resumen

La estreptococosis es una infección bacteriana en tilapias que produce pérdidas económicas y es ocasionada principalmente por *Streptococcus agalactiae*, siendo asociada frecuentemente a factores de estrés como la calidad desfavorable del agua de cultivo, es por ello que el presente estudio se realizó con el objetivo de determinar parámetros fisicoquímicos y presencia de *S. agalactiae* en granjas acuícolas de tilapias (*Oreochromis niloticus*) del Distrito de Riego de Atiocoyo Sur, el cual constituye uno de los principales productores de tilapias a nivel nacional. La investigación se llevó a cabo entre los meses de septiembre a octubre del año 2022, en 26 granjas con sospechas de estreptococosis. De cada granja fueron seleccionados, un estanque, de 4 a 6 tilapias, además de una muestra de agua para análisis microbiológico y otra para análisis fisicoquímico. Para el análisis microbiológico, se analizaron muestras de órganos de tilapias y para la muestra de agua, se realizaron diluciones para detectar el patógeno en placas de agar sangre, mientras que, para el análisis fisicoquímico del agua de cultivo, se realizaron evaluaciones de alcalinidad, dureza, concentración de iones nitrato, nitritos, fosfatos y amonio.

El análisis microbiológico en tilapias, demostró 4 casos positivos a *S. agalactiae* en diferentes granjas y ningún caso detectado en agua de cultivo, mientras que el análisis fisicoquímico demostró condiciones desfavorables con respecto al oxígeno disuelto, pH, temperatura, concentración de iones fosfato y amonio. Con los resultados obtenidos se concluye la existencia de casos positivos de *S. agalactiae* en las granjas de cultivo de tilapias y una posible correlación frente a las altas temperaturas y las altas concentraciones de iones fosfatos. Finalmente, el presente estudio ha establecido el primer antecedente a nivel nacional sobre dicha problemática por lo que se espera que las entidades de gobierno puedan establecer procedimientos de monitoreo y evaluación de tendencias orientadas a prevenir los altos brotes de mortalidad asociados a la estreptococosis.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 Introducción

El valor y aporte nutricional del pescado, entre ellos la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), ha sido ampliamente reconocido por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y ha estimado que, del total del consumo de pescado, a nivel mundial, la acuicultura aporta aproximadamente el 50% de los peces destinados para el consumo humano, por lo tanto, ésta juega un papel importante y crítico no sólo para lograr la seguridad alimentaria de la población, sino también como un activo económico principalmente en países en vías de desarrollo. En El Salvador, el cultivo y producción de tilapia ha crecido de manera significativa desde los años 60's, representando una fuente importante de alimentos para la población, un rubro valioso para las exportaciones y una fuente de empleos e inversión que actualmente aporta a la economía nacional un valor de USD \$30.200.000, sin embargo, las infecciones ocasionadas por bacterias como *Streptococcus agalactiae* son un problema para la producción de tilapias en cultivo de nuestro país ya que se dificulta su tratamiento y prevención debido a que se tiene un conocimiento limitado respecto a la incidencia de este patógeno, lo que genera mortandad en los peces y las subsecuentes pérdidas económicas.

La estreptococosis se han asociado frecuentemente a los factores fisicoquímicos del agua de cultivo, como lo son las altas temperaturas, las bajas concentraciones de oxígeno disuelto, pH alcalino y, niveles elevados de amonio y nitritos, siendo estos factores, los que provocan estrés en las tilapias y que finalmente afectan su respuesta inmune. Por esta razón, el presente estudio tuvo como objetivos determinar los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo y la presencia de *S. agalactiae* en las granjas acuícolas del Distrito de Riego de Atiocoyo Sur, en el municipio de San Pablo Tacachico, La Libertad para evaluar una posible correlación entre ambas variables.

Se realizó un tipo de estudio de campo y experimental, de corte transversal, realizado entre los meses de septiembre a octubre del año 2022, con un muestreo dirigido y puntual a 26 granjas con sospechas de estreptococosis, de las cuales se analizaron dos matrices; tilapias frescas y agua de estanque para realizar análisis microbiológicos y análisis fisicoquímicos, de igual modo se realizaron evaluaciones *in situ* de oxígeno disuelto, pH y temperatura al momento de la recolección de las muestras. En el laboratorio de Alimentos y Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), se evaluó microbiológicamente el agua de estanque y tilapias, realizando pre tratamientos de las muestras (tilapias), inoculaciones y resiembras para la purificación de muestras presuntivas a *S. agalactiae* y su posterior identificación se realizó mediante tinción de Gram, prueba de CAMP, sensibilidad/resistencia a antibióticos y uso del kit Microgen Strep-ID, mientras que para el análisis fisicoquímico del agua, se evaluó la alcalinidad, dureza, concentración de iones nitrato, nitrito, fosfato y amonio en el Laboratorio de Análisis de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia en la Universidad de El Salvador.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la incidencia de *S. agalactiae* en aproximadamente el 15.4% de las granjas muestreadas con relación a la muestra de tilapias frescas, sin embargo, para la muestra de agua de estanque, no fue posible aislar al patógeno. Con respecto a las evaluaciones fisicoquímicas del agua de estanque, se demostraron calidades subóptimas en los parámetros correspondientes a oxígeno disuelto, pH, temperatura, concentración de iones fosfato y amonio, siendo la temperatura y los fosfatos las variables que tienen una posible correlación con la presencia de *S. agalactiae*. Se espera que los resultados ayuden a la entidad encargada del Distrito de Riego, la Asociación de Regantes de Atiocoyo Sur (ARAS) a implementar procedimientos de monitoreo y evaluación de tendencia ante casos tempranos de estreptococosis, evitando así las pérdidas que actualmente oscilan entre el 5% al 30% de la producción anual.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

## **2.0 Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

- 2.1.1. Determinar parámetros fisicoquímicos y presencia de *Streptococcus agalactiae* en tilapia (*Oreochromis niloticus*) de las granjas acuícolas del Distrito de Riego de Atiocoyo Sur.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 2.2.1. Identificar la presencia de *Streptococcus agalactiae* en tilapia (*Oreochromis niloticus*) y agua de cultivo.
- 2.2.2. Evaluar los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*).
- 2.2.3. Correlacionar los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con la presencia de *Streptococcus agalactiae*.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

### **3.0 Marco teórico**

#### **3.1 Generalidades de las tilapias <sup>(1)</sup>**

La tilapia, como se les conoce a un grupo de peces de origen africano, habita principalmente en regiones tropicales del mundo, donde existen las condiciones necesarias para su reproducción y crecimiento. La tilapia en comparación con otros peces, posee extraordinarias cualidades para el cultivo, como: crecimiento acelerado, tolerancia a altas densidades, adaptación a cautiverio, aceptación de una amplia gama de alimentos, alta resistencia a enfermedades, además de contar con algunos atributos para el mercado, como: carne blanca de buena calidad, buen sabor, pocas espinas, buena talla y precio accesible, que le confiere una preferencia y demanda comercial en la acuicultura mundial.

Tilapia como alimento: la experiencia demuestra que grupos étnicos que obtienen su proteína de los peces, están bien nutridos. Los constituyentes principales de los alimentos marinos, como las tilapias, son: agua del 66 al 84%, proteínas del 15 al 24%, lípidos del 0.1 al 22% y minerales del 0.8 al 2%

#### **3.2 Biología de la especie**

##### **3.2.1 Distribución <sup>(1)</sup>**

Son organismos tropicales dulceacuícolas principalmente, originarios de África, los cuales, debido a su facilidad de adaptación se encuentran actualmente distribuidos en la mayoría de los países tropicales y subtropicales con fines de cultivo.

Las tilapias han colonizado hábitats diversos, pues es un pez de aguas cálidas, dulces, salobres o salinas que puede adaptarse a aguas con baja concentración

de oxígeno, por lo que también es común que habiten en aguas de poca corriente (lénticas), permaneciendo en zonas poco profundas y cercanas a las orillas.

La tilapia se ha introducido en todo el mundo y se cría de manera generalizada en los trópicos y las zonas subtropicales. Aunque Asia domina la producción en la actualidad, se cría cada vez más en condiciones ambientalmente controladas en climas templados.

Se encuentra naturalmente distribuida por América Central, sur del Caribe, sur de Norteamérica, el sudeste asiático, Medio Oriente y África.

### 3.2.2 Morfología externa <sup>(2)</sup>

Presenta un solo orificio nasal a cada lado de la cabeza, que sirve simultáneamente como entrada y salida de la cavidad nasal. El cuerpo es generalmente comprimido y discoidal, raramente alargado. La boca es protáctil, generalmente ancha, a menudo bordeada por labios gruesos; las mandíbulas presentan dientes cónicos y en algunas ocasiones incisivos.

Para su locomoción poseen aletas pares e impares. Las aletas pares las constituyen las pectorales y las ventrales; las impares están constituidas por las aletas dorsales, la caudal y la anal. La parte anterior de la aleta dorsal y anal es corta, consta de varias espinas y la parte terminal de radios suaves, disponiendo sus aletas dorsales en forma de cresta.

La aleta caudal es redonda, trunca y raramente cortada, como en todos los peces, esta aleta le sirve para mantener el equilibrio del cuerpo durante la natación y al lanzarse en el agua.

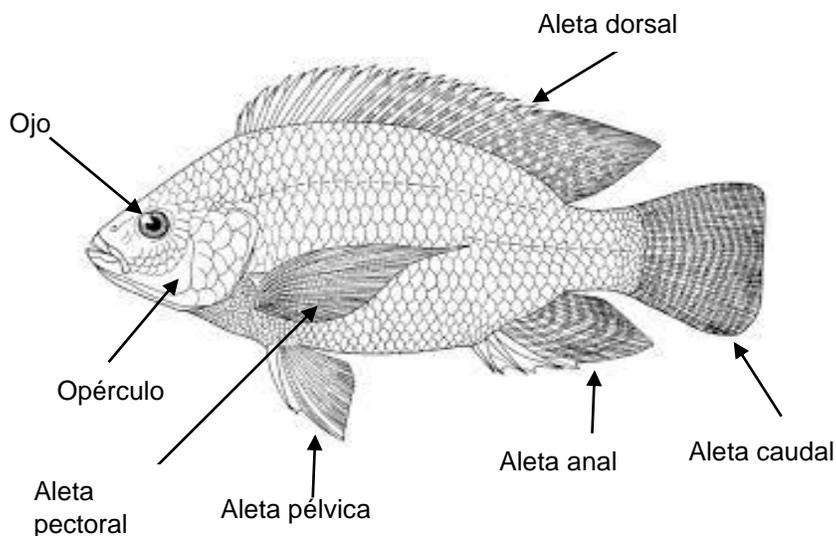


Figura N°1. Morfología externa de una tilapia <sup>(2)</sup>

### 3.2.3 Características taxonómicas de *Oreochromis niloticus*

Las características más importantes que distinguen a este género, en comparación con otros géneros de tilapia es que son incubadoras bucales, presentan un marcado dimorfismo y dicromatismo sexual, los huevos son de menor tamaño y éstos carecen de una capa adhesiva. <sup>(1)</sup>

Para el caso de *Oreochromis niloticus* la parte frontal del hueso faríngeo presenta un área dentada con una menor cantidad de dientes. Se puede apreciar en la parte superior la presencia de dientes bicúspides y en la parte inferior de monocúspides curvados hacia atrás. <sup>(1)</sup>

Presenta bandas negras verticales en la aleta caudal; pecho blanco; extremo de la aleta abdominal anterior al ano; aleta dorsal con 16 a 18 espinas duras y 12 a 13 restantes suaves. <sup>(3)</sup> Se suma la aleta caudal con 3 espinas duras y restantes 8 a 11 suaves, 31 a 35 escamas a lo largo de la línea lateral, 5 escamas hacia arriba y 12 hacia abajo de la línea lateral. <sup>(3)</sup>



Figura N°2. Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) <sup>(3)</sup>

#### 3.2.4 Hábitos alimenticios <sup>(2)</sup>

El género *Oreochromis* se clasifica como Omnívoro, por presentar mayor diversidad en los alimentos que ingiere, variando desde vegetación macroscópica hasta algas unicelulares y bacterias, tendiendo hacia el consumo de zooplancton.

Las tilapias son peces provistos de branqui-espinas con los cuales los peces pueden filtrar el agua para obtener su alimentación consistiendo en algas y otros organismos acuáticos microscópicos. Los alimentos ingeridos pasan a la faringe donde son mecánicamente desintegrados por los dientes faríngeos. Esto ayuda en el proceso de absorción en el intestino, el cual mide de 7 a 10 veces más que la longitud del cuerpo del pez.

Una característica de la mayoría de las tilapias es que aceptan fácilmente los alimentos suministrados artificialmente. Para el cultivo se han empleado diversos alimentos, tales como plantas, desperdicios de frutas, verduras y vegetales, semillas oleaginosas y cereales, todos ellos empleados en forma suplementaria. La base de la alimentación de la tilapia la constituyen los alimentos naturales que se desarrollan en el agua y cuyo contenido proteico es de un 55% (peso seco) aproximadamente.

### 3.2.5 Hábitos reproductivos <sup>(1)</sup>

Las tilapias poseen sexos separados, existiendo en muchos casos una clara diferencia entre macho y hembra, que puede ser por la coloración del cuerpo o su tamaño, siendo generalmente los machos de mayor peso y talla que las hembras. Para llevar a cabo la reproducción, se toman en consideración parámetros ideales de crecimiento, es así que el peso y la talla óptima varía de entre 200 a 500 g. y de 12 a 15 cm. de longitud, cantidades que se alcanzan entre las edades de 6 a 12 meses (Cuadro N°1).

A diferencia de otros peces cultivados, tienen la característica de reproducirse fácilmente en cautiverio sin necesidad de intervención del hombre. De hecho, puede considerarse como uno de los principales problemas, la gran facilidad con la que se reproducen estos organismos, así como la precocidad en la que comienza, pues al iniciar ésta, reducen sus tasas de crecimiento a la vez que hay una sobrepoblación en los estaqués, motivo por el cual se prefiere el cultivo monosexo, principalmente de machos.

La temporada de reproducción abarca desde finales de marzo o principios de abril hasta mayo, cuando la temperatura del agua es aproximadamente de 20 a 22° C y cuando se alcanza temperatura de 25 a 31 °C las hembras comienzan a poner e incubar huevos.

Cuadro N°1. Características reproductivas de la tilapia <sup>(1)</sup>

<b>Parámetros de reproducción de tilapia</b>	
Peso adultos	1-3 kg
Madurez sexual	Machos (4-6 meses), hembras (3-5 meses)
Número de desoves	5-8 veces por año
Temperatura de desove	25-31°C
Número de huevos/hembra/desove	Condiciones idóneas > 100
Vida útil reproductores	2-3 años
Tipo de incubación	Bucal
Tiempo de incubación	3-6 días
Proporción de siembra de reproductores	15-20 machos por cada 3 hembras
Tiempo de cultivo	7-8 meses, o peso comercial de 300g

### 3.2.6 Caracteres sexuales <sup>(2)</sup>

La diferenciación externa de los sexos se basa en que el macho presenta dos orificios bajo el vientre: el ano y el orificio urogenital (Figura N°3), mientras que la hembra posee tres: el ano, el poro genital y el orificio urinario (Figura N°4). El ano está siempre bien visible; es un agujero redondo. El orificio urogenital del macho es un pequeño punto. El orificio urinario de la hembra es microscópico, apenas visible a simple vista, mientras que el poro genital se encuentra en una hendidura perpendicular al eje del cuerpo.

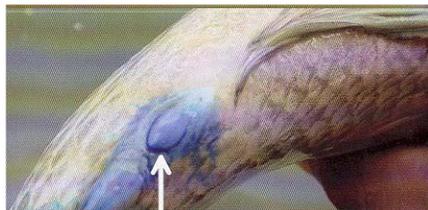


Figura N°3. *Oreochromis niloticus* macho <sup>(1)</sup>



Figura N°4. *Oreochromis niloticus* hembra <sup>(1)</sup>

### 3.3 Enfermedades en tilapias <sup>(4)</sup>

Generalmente los problemas de salud en los peces, en los de cultivo especialmente, están relacionados directamente al estrés de los peces sobre los factores ambientales (estresores) y alteraciones de su fisiología. Así, existe una interrelación directa entre el estrés, la salud y la enfermedad.

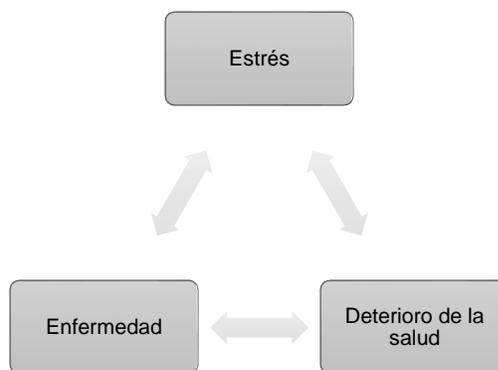


Figura N°5. Interrelación entre el estrés, la salud y enfermedad de los peces <sup>(4)</sup>

Además, el estrés es considerado el principal factor que afecta la salud de los peces, y puede conducir a enfermedades infecciosas. Los estresores pueden ser agudos o crónicos, y su impacto sobre los peces son aditivos y acumulativos, por lo menos por un corto período. Los estresores pueden ser químicos, biológicos, físicos o de procedimientos.

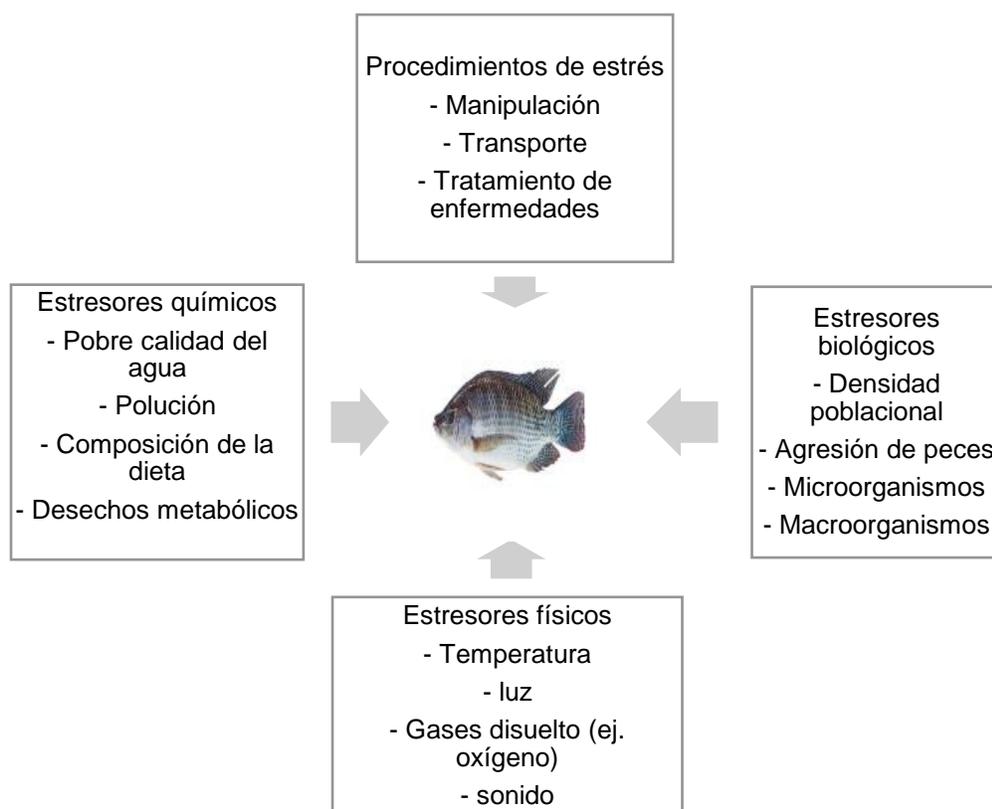


Figura N°6. Diferentes tipos de estresores que afectan a los peces (4)

Los cultivos de tilapia son afectados por una gran variedad de organismos patógenos: crustáceos, protozoos, hongos, bacterias y virus. Dentro de este grupo, son las bacterias las que producen los mayores perjuicios económicos, siendo las más frecuentes en ambientes de agua dulce las siguientes: *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus epidermidis*,

*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus milleri* y *Francisella*; entre otras

### 3.4 Estreptococosis en tilapias cultivadas <sup>(4)</sup>

Actualmente, la estreptococosis es una de las infecciones bacterianas más importantes que afectan a la tilapia y ha evolucionado de una “patología emergente” a una entidad verdadera, completamente identificada y bien establecida. Esta enfermedad se ha reportado en todo el mundo, afectando a más de 45 especies de peces en ambientes de agua dulce, agua de mar y estuarios en África, América, Asia, Australasia y Europa. En nuestro continente se han reportado casos de estreptococosis en tilapia cultivada cuando menos en 12 países de Norte, Centro y Sudamérica, y en el Caribe. Los aislamientos de *Streptococcus spp.* procedentes de tilapias enfermas en el continente americano se han identificado como *S. agalactiae* y *S. iniae*, aun cuando se han reportado algunas otras especies como *S. constellatus* y *Streptococcus spp.*

#### 3.4.1 Biología de *Streptococcus agalactiae*

*Streptococcus agalactiae* fue identificado a partir de muestras de leche de vaca y como causa de mastitis en bovinos antes del año de 1930. Son células ovoides esféricas y grampositivas, de tamaño entre 0.5-1.0 x 1.0-2.0  $\mu\text{m}$ , catalasa negativas, inmóviles, no esporuladas y anaerobias facultativas. Obtienen energía a través de la fermentación de carbohidratos como la glucosa, que en su mayoría resulta en ácido láctico. Las clasificaciones tradicionales de estreptococos se basan en la serotipificación de los antígenos de carbohidratos de la pared celular y sus actividades hemolíticas. Las especies de estreptococos del grupo B de Lancefield (GBS) corresponden a una sola especie que es *S. agalactiae*. <sup>(5)</sup> Las principales características fenotípicas de las especies de *Streptococcus* se muestran en la Tabla 1.

Tabla N°1. Principales características fenotípicas diferenciales de varias especies de Streptococcus aisladas de tilapias enfermas en el continente americano. +: positivo, -: negativo, (+): típicamente positivo, (-): típicamente negativo, V: variable, R: resistente, S: sensible, ND: no se determinó, \* aislado en México. (4)

Característica/ prueba	Resultados			
	<i>S. iniae</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>Streptococcus spp. *</i>
Morfología	cocos	cocos	cocos	cocos
Tinción de Gram	+	+	+	+
Motilidad	-	-	-	-
Catalasa	-	-	-	-
Hemólisis	+ (beta)	+ (beta)	-	(-)
Hidrólisis del almidón	+	-	-	-
Hidrólisis del hipurato	-	+	+	-
Bilis-escualina	-	-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	+	+	+
Ácido de manitol	+	+	+	ND
Ácido de sorbitol	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	+	+	(+)
Leucina-aminopeptidasa	-	+	ND	(+)
Pirrolidínico-amilamidasa	+	-	ND	-
Crecimiento a 10°C	+	-	-	-
Crecimiento a 45°C	-	-	-	-
Crecimiento en NaCl al 6.5%	V	V	+	-
Bacitracina	R	R	R	ND
Vancomicina	S	S	R	S
Grupo de Lancefield	-	B	-	-

El interés por la patogénesis de GBS se inició en la década de 1960, cuando se centró la atención en la meningitis neonatal causada en humanos por este microorganismo. En 1970, un gran número de publicaciones estuvieron enfocadas a la colonización, respuesta inmune, tratamiento con antibióticos y diagnóstico de infecciones por GBS en vacas y humanos. En la década de los 80's, las investigaciones se enfocaron en dilucidar factores de virulencia específicos, tales como el polisacárido capsular sialilado, toxinas y proteínas de superficie. El

estudio de la patogénesis de GBS ha progresado a una nueva era en este milenio. <sup>(5)</sup>

Se puede dividir en 10 serotipos según la composición del polisacárido capsular: Ia, Ib y II a IX. (1) Poseen el Factor CAMP, que se considera un factor de virulencia debido a su capacidad para unirse a las inmunoglobulinas G y M, a través del fragmento cristalizante (región Fc). Por lo tanto, la detección de la producción de factor CAMP es una ayuda significativa en la identificación de *S. agalactiae*. <sup>(5)</sup>

*S. agalactiae* es el agente etiológico de septicemia y meningococemia en peces, y por tratarse de una inflamación del sistema nervioso central, los principales signos clínicos son natación errática, lesiones en la piel del huésped, líquido blanquecino y sanguinolento en la cavidad visceral, esplenomegalia, peritonitis fibrosa, opacidad ocular, oftalmítis con edema corneal. <sup>(5)</sup>

#### 3.4.2 Mecanismo y factores de virulencia <sup>(4)</sup>

Dentro de los principales mecanismos de virulencia de *S. agalactiae* podemos mencionar:

- La presencia del polisacárido (PS) de la pared celular.
- La capacidad de actividad antifagocítica dentro de los macrófagos del hospedero.
- Las estreptolisinas O y S que son en esencia hemolisinas formadoras de poros asociada a la superficie responsable de la zona característica de hemólisis en placas de agar sangre.
- Producir factor CAMP que es una segunda toxina formadora de poros cuya actividad se ve principalmente en los glóbulos rojos pre-tratados con esfingomielinasa.
- La cápsula que le confiere mayor habilidad para su permanencia en el hospedero.

- La alfa C proteína y PilB que facilitan la traslocación de GBS para la infección invasiva por ruta paracelular.

#### 3.4.3 Signos clínicos y lesiones por estreptococosis <sup>(4)</sup>

Por lo general, las tilapias afectadas por estreptococosis muestran diferentes manifestaciones clínicas dependiendo de la especie de *Streptococcus* y del tipo o híbrido de tilapia de que se trate. Al parecer *Oreochromis niloticus* es más resistente a la estreptococosis que *Oreochromis aureus*, así como la manifestación de los signos clínicos son algo diferentes. Los signos clínicos típicos pueden incluir anorexia, letargia, melanosis en la piel, hiperemia y hemorragias petequiales en la región anal y sobre las aletas, lesiones hemorrágicas y necróticas en la piel y el tejido muscular, exoftalmos uni o bilateral con o sin hemorragias perioculares, y opacidad de la córnea.

Un signo característico es la presencia de movimientos natatorios erráticos y desorientados, principalmente en los peces moribundos, lo que ha dado origen al término “enfermedad de la tilapia loca”. La conducta anormal al nadar es causada por meningoencefalitis, resultante de la infección de cerebro y meninges por el *Streptococcus* invasivo.

El exoftalmos generalmente se asocia con las primeras etapas de la enfermedad, con congestión y edema retrobulbares, acompañados de inflamación e hiperemia, necrosis de la coroides y del nervio óptico, lo que da como resultado la expulsión de material necrosado a través de la córnea ulcerada. También se puede encontrar opacidad o incluso pérdida total de la córnea.

En cuanto a las lesiones, las hemorragias cutáneas difusas o petequiales son frecuentes y si bien se observan en todo el cuerpo prevalecen en la región cefálica y caudal. Con cierta frecuencia se observa una esplenomegalia y el hígado se observa friable. En la cavidad craneal se puede ver la congestión difusa cerebral con líquido cefalorraquídeo hemorrágico. A la necropsia el bazo suele

estar aumentado de volumen, el hígado y el riñón se ven pálidos y moteados con numerosas áreas de necrosis focal. Con frecuencia se observa miocarditis y pericarditis y poliserositis.

La cavidad abdominal puede estar distendida y puede contener un exudado seroso y sanguinolento. Los vasos sanguíneos branquiales por lo general están hiperémicos e infiltrados con macrófagos, en cuyo caso los filamentos de las branquias pueden mostrar hemorragias masivas y sufrir un proceso de necrosis que afecta amplias áreas branquiales, lo que causa mal olor y aumenta la mortalidad. El tracto intestinal también puede estar hiperémico y la mucosa puede presentar descamación continua.

Los casos crónicos de estreptococosis en tilapia por lo general se asocian a granulomas, oftalmitis, presencia de granulomas meníngeos y focos inflamatorios renales. El análisis histológico muestra un característico cuadro septicémico con una marcada infiltración celular inflamatoria y numerosos cocos en la mayoría de los tejidos examinados.

Predomina un cuadro meningoencefálico con dilatación de capilares meníngeos, extravasación de eritrocitos y densos infiltrados inflamatorios con predominio de granulocitos y macrófagos, aunque también se observan linfocitos. Con técnicas de impregnación argéntica se puede ver abundantes cocos en el parénquima encefálico. En el hígado se observa una hepatitis focal intraséptica con focos de necrosis hepatocelular e infiltrados inflamatorios. En algunos casos se puede observar una periarteris hepática. En el bazo se observa disgregación de melanomacrófaos y presencia de cocos en los sinusoides esplénicos.

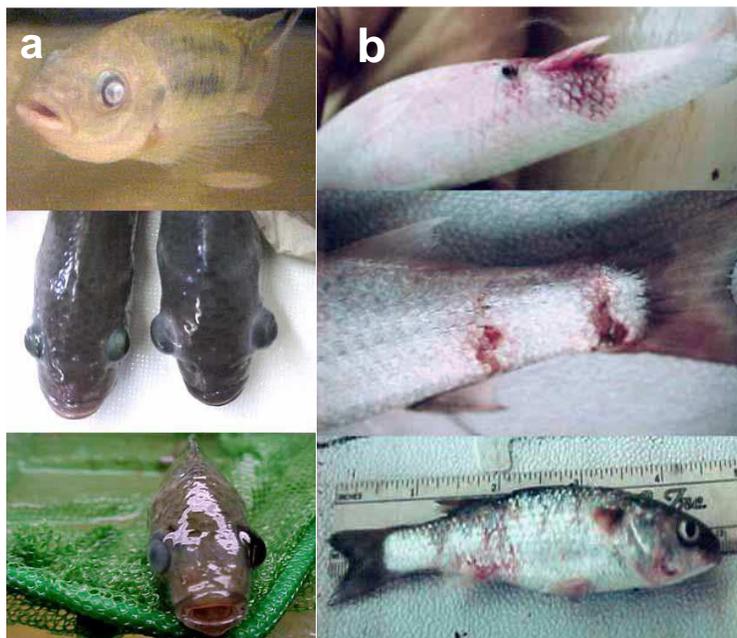


Figura N°7. Signos de enfermedad por *Streptococcus* spp. en tilapia nilótica: a) Enfermedad ocular, b) Lesiones de cuerpo y aletas en peces infectados (4)

#### 3.4.4 Kit miniaturizado para la identificación de microorganismos (6)

Los sistemas miniaturizados o kits miniaturizados, son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. El sistema Microgen Strep-ID, es uno de ellos y comprende 15 pruebas bioquímicas de las cuales 12 se realizan en una tira de prueba estandarizada con 12 micropocillos, una prueba de hipurato (suministrada), y dos pruebas basadas en observaciones en medio de agar sangre de la morfología de las colonias del aislado microbiano. Todas estas pruebas han sido seleccionadas en función de un detallado análisis informático de bases de datos publicadas, para la identificación del género *Streptococcus*. Los sustratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una suspensión del microorganismo en el medio de suspensión suministrado y si los sustratos individuales son metabolizados por el microorganismo, ocurre un cambio de

coloración durante la incubación o después de añadir los reactivos específicos, luego estos resultados positivos se interpretan utilizando el software del sistema para la identificación del microorganismo de prueba. De acuerdo a la tabla de datos proporcionada por el kit, las pruebas bioquímicas características para la identificación de *S. agalactiae* contemplan a la hidrólisis del hipurato (99%), hemólisis beta (98%), hidrólisis del ácido de ribosa (99%), reacción de la fosfatasa (99.9%) y la reacción de arginina dihidrolasa (99.9%).

### 3.5 Calidad del agua en el cultivo de tilapias

Es indispensable que al momento de iniciar un cultivo en la piscicultura se avale la sostenibilidad y rentabilidad de la actividad en este caso con los factores físicos, químicos y biológicos de la calidad del agua para que sea favorable a los peces y así, generar un medio rentable en su producción. (7) La calidad del agua está determinada, en gran parte, por sus propiedades fisicoquímicas, entre las más importantes destacan: temperatura, oxígeno disuelto, pH, transparencia, entre otros.

Tabla N°2. Parámetros óptimos de la calidad del agua en el cultivo y manejo de tilapia (1)

Parámetro	Rangos
Temperatura	25.0 – 32.0°C
Oxígeno disuelto	5.0 – 9.0 mg/L
pH	6.0 – 9.0
Alcalinidad total	50 – 150 mg/L
Dureza total	80 – 110 mg/L
Calcio	60 – 120 mg/L
Nitritos	0.1 mg/L
Nitratos	1.5 – 2.0 mg/L
Amonio total	0.1 mg/L
Hierro	0.05 – 0.2 mg/L
Fosfatos	0.15 – 0.2 mg/L
Dióxido de carbono	5.0 – 10 mg/L
Sulfuro de hidrógeno	0.01 mg/L

### 3.5.1 Indicadores de la calidad del agua de cultivo

Los parámetros fisicoquímicos deben mantenerse dentro de los rangos aceptables para el buen desarrollo de los organismos. En caso contrario, la población en cultivo podría tener bajo crecimiento, proliferación de patógenos con brotes de enfermedad, eventuales mortalidades y baja calidad del producto final. Por lo anterior, es necesario llevar a cabo una serie de recomendaciones tomando en cuenta la procedencia del agua, su calidad, el control y mantenimiento de dicha calidad. <sup>(7)</sup>

#### 3.5.1.1 Temperatura

La temperatura del agua es una variable importante en la acuicultura, pero en la mayoría sus tipos, no se puede controlar y depende de la cantidad de radiación solar; la temperatura del aire o de la temperatura del agua que pasa a través de la unidad de cultivo. Los peces están fuertemente afectados por la temperatura; las operaciones de acuicultura deben programarse para que correspondan a la temperatura del agua, y las mediciones de temperatura son críticas para operaciones eficientes. <sup>(8)</sup>

Además, se sabe que la temperatura del agua afecta el perfil metabólico de los peces, reduciendo su capacidad para sobrevivir infecciones e induce a un aumento de la actividad hemolítica y viabilidad de bacterias como *Streptococcus* del grupo B (SGB), que son factores determinantes durante el proceso de infección. También se ha informado que muchos factores de virulencia se sobreexpresan a altas temperaturas. <sup>(9)</sup>

#### 3.5.1.2 pH <sup>(8)</sup>

El rango de pH adecuado para el cultivo de la tilapia es de 6 a 9, debiéndose controlar las variaciones del pH del medio, ya que valores superiores o inferiores a ese margen pueden generar cambios en el comportamiento de los peces, como

letargia e inapetencia o implicar graves trastornos en las tasas de crecimiento, reproducción y supervivencia.

Valores cercanos a 5 provocan la muerte por fallos respiratorios en un período de 3 a 5 horas además de causar pérdidas de pigmentación y el aumento de las secreciones del mucus.

#### 3.5.1.3 Oxígeno disuelto <sup>(8)</sup>

En general, las tilapias son capaces de sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno disuelto, por la capacidad que su sangre posee para saturarse de oxígeno, cuando la presión parcial de éste es baja. En esos casos, la tilapia tiene la facultad de reducir el consumo del mismo cuando las condiciones son adversas.

En concreto, la tilapia nilótica es capaz de sobrevivir en aguas cuya concentración de oxígeno disuelto es menor de 0.3 mg/L, considerablemente más baja que la requerida por la mayor parte de especies cultivadas.

Aunque la tilapia sea capaz de sobrevivir en condiciones de muy baja concentración de oxígeno disuelto, durante varias horas, los estanques de cría de tilapia deberían mantener una concentración por encima de 2 mg/L.

La actividad metabólica, el crecimiento y posiblemente la resistencia a enfermedades, se ven afectadas cuando los niveles de oxígeno disuelto en el agua descienden de ese valor, durante períodos prolongados.

Los efectos causados por la baja concentración de oxígeno pueden resumirse en:

- Aumento de la conversión alimenticia.
- Inapetencia y letargia.
- Patologías respiratorias.

- Provoca inmunodepresión e incrementa la susceptibilidad a las enfermedades.
- Reduce la capacidad reproductiva.

Los factores a tener en cuenta en la explotación de cultivos de tilapia, en virtud de su efecto negativo sobre la cantidad de oxígeno disuelto son:

- Velocidad de degradación de la materia orgánica.
- Generación de excedentes alimenticios.
- Presencia de heces.
- El incremento de la temperatura también reduce la solubilidad del oxígeno en el agua.
- Respiración de los organismos presentes en la columna de agua.
- Desgasificación del oxígeno del agua hacia la atmósfera.
- Cantidad de peces por unidad de volumen.
- Constante agitación del agua.

#### 3.5.1.4 Dureza <sup>(10)</sup>

Es principalmente la medida de la concentración de los iones de calcio (Ca) y magnesio (Mg) pero también se incluyen otros iones como aluminio (Al); hierro (Fe); zinc (Zn), estroncio (Sr) e hidrógeno (H). Se expresa en partes por millón (ppm) de su equivalente a carbonato de calcio.

Deben mantenerse valores de dureza de al menos 20 ppm para un crecimiento óptimo de los organismos acuáticos, de no ser así, los niveles bajos de dureza se pueden aumentar con la adición de cal agrícola molida.

#### 3.5.1.5 Alcalinidad <sup>(10)</sup>

La alcalinidad es la capacidad del agua para neutralizar los ácidos sin aumentar el pH. Este parámetro es una medida de las bases, bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ),

carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y, en raras ocasiones, hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) que actúan como un sistema de amortiguación. Este sistema de amortiguación es importante para el piscicultor, independientemente del método de producción utilizado.

En la producción de estanques, donde la fotosíntesis es la principal fuente natural de oxígeno, los carbonatos y bicarbonatos son áreas de almacenamiento para el exceso de dióxido de carbono libre, el cual podría formar grandes cantidades de ácido débil (ácido carbónico) durante la noche y disminuir el pH.

Para los suministros de agua que tienen alcalinidades naturalmente bajas, se puede agregar cal agrícola para aumentar la capacidad amortiguadora del agua.

#### 3.5.1.6 Nitratos <sup>(11)</sup>

La concentración de nitratos es un tópico común de muchas discusiones acerca de la calidad del agua, ya que es de importancia tanto para humanos como para animales. Debido a sus propiedades físicas, no puede olerse ni sentirse y su presencia en concentraciones potencialmente peligrosas, es detectada cuando se manifiesta un problema de salud en organismos de cultivo.

Valores de nitratos superiores a 8.0 ppm pueden ser tóxicos. A menudo es difícil precisar el origen de un alto contenido de nitratos, debido a que puede provenir de muchas fuentes. La entrada de los nitratos al agua puede ser el resultado de procesos naturales y del efecto directo o indirecto de las actividades humanas. Los procesos naturales incluyen la precipitación, el constante movimiento de los minerales y descomposición de la materia orgánica.

#### 3.5.1.7 Nitritos

Los nitritos son un producto intermedio de la transformación del amoníaco en nitrato por la actividad bacteriana. El nitrito es tóxico en los peces, mermando la capacidad de la hemoglobina para transportar oxígeno, por lo cual su toxicidad está relacionada con el oxígeno disuelto en agua. Un incremento en el  $\text{CO}_2$  puede

disminuir el pH a un valor por debajo de 6.5, lo que puede llevar a toxicidad de nitrito a través de la formación de ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ). <sup>(12)</sup> Niveles de nitritos superiores a 0,75 ppm en el agua pueden provocar estrés en peces y mayores de 5 ppm pueden ser tóxicos. <sup>(13)</sup>

#### 3.5.1.8 Amonio <sup>(14)</sup>

Es un producto de la excreción, orina de los peces y descomposición de la materia (degradación de la materia vegetal y de las proteínas del alimento no consumido). El amonio no ionizado (forma gaseosa) y primer producto de excreción de los peces, es un elemento tóxico.

La reacción que ocurre es la siguiente:



Donde:

$\text{NH}_3$ : forma no ionizada, forma tóxica, producto de excreción de los peces, indica degradación de la materia orgánica.

$\text{NH}_4\text{OH}$ : su velocidad de conjugación con el agua depende del pH.

$\text{NH} + \text{OH}_4$ : forma ionizada, forma no tóxica.

La toxicidad del amonio en forma no ionizada ( $\text{NH}_3$ ), aumenta cuando la concentración de oxígeno disuelto es baja, el pH indica valores altos (alcalino) y la temperatura es alta. Cuando los valores de pH son bajos (ácidos), el amonio no causa mortalidades. Los valores de amonio deben fluctuar entre 0.01 ppm a 0.1 ppm (valores cercanos a 2 ppm son críticos).

Una alta concentración de amonio en el agua causa bloqueo del metabolismo, daño en las branquias, afecta el balance de sales, produce lesiones en órganos internos, inmunosupresión y susceptibilidad a las enfermedades, reducción del crecimiento y sobrevivencia, exoftalmia (ojos brotados) y ascitis (acumulación de líquidos en el abdomen).

#### 3.5.1.9 Dióxido de carbono <sup>(14)</sup>

Es un producto de la actividad biológica y metabólica, su concentración depende de la fotosíntesis. Debe mantenerse en un nivel inferior a 20 ppm, porque cuando sobrepasa este valor se presenta letargia e inapetencia.

#### 3.5.1.10 Gases tóxicos <sup>(14)</sup>

Son compuestos químicos producidos en los estanques por la degradación de materia orgánica. A continuación, se presenta los más comúnmente hallados y cuyas concentraciones deben estar por debajo de los valores siguientes:

- Sulfuro de hidrógeno < 10ppm.
- Ácido cianhídrico < 10ppm.
- Gas metano < 25ppm.

Estos gases incrementan su concentración con la edad de los estanques y con la acumulación de materia orgánica en el fondo, produciendo mortalidades masivas y crónicas. Se pueden controlar mediante la adición de cal y zeolita a razón de 40 kg/ha, además, del secado de estanques (entre cosechas).

#### 3.5.1.11 Sólidos en suspensión <sup>(14)</sup>

Aumentan la turbidez en el agua, disminuyendo el oxígeno disuelto en ella. Los sólidos se deben controlar mediante sistemas de desarenadores y filtros. De acuerdo a la concentración de sólidos disueltos podemos clasificar los estanques así:

- Estanques limpios: Sólidos menores a 25 mg/L.
- Estanques intermedios: Sólidos entre 25 - 1 0 0 mg/L.
- Estanques lodosos: Sólidos mayores a 1 0 0 mg/L.

#### 3.5.1.12 Fosfatos <sup>(14)</sup>

Son productos resultantes de la actividad biológica de los peces y de la sobrealimentación con alimentos balanceados. La concentración alta, causa aumento en la población de fitoplancton; y éstas a su vez, provocan bajas de oxígeno por la noche. Su valor debe fluctuar entre 0.2 mg/L a 0.5 mg/L como  $\text{PO}_4^{3-}$ , además de que su toxicidad aumenta a valores de pH ácido.

#### 3.5.1.13 Cloruros y sulfatos <sup>(14)</sup>

Al igual que los fosfatos, se derivan de la actividad metabólica de los peces y del aporte de los suelos y aguas subterráneas, utilizadas en las granjas piscícolas. El límite superior para cada uno de estos compuestos, son 10 ppm y 18 ppm respectivamente.

### **3.6 Correlación de la calidad de agua y la presencia de *Streptococcus agalactiae***

La calidad del agua es una parte importante de cualquier sistema acuícola. Las condiciones ambientales (disponibilidad de hierro, fuerza osmótica, niveles de oxígeno, pH, salinidad y temperatura) y, a veces, malas prácticas de manejo (nutrición inadecuada, hacinamiento y sobrealimentación) pueden causar estrés a los peces de cultivo y hacerlos más susceptibles a brotes de enfermedades. Sin embargo, la información sobre la influencia de la calidad del agua en la presencia de *Streptococcus spp.* en peces de cultivo en condiciones reales de campo es limitada. <sup>(15)</sup>

Se sabe hasta ahora que las condiciones ambientales que rodean a los sitios de cultivo pueden afectar la calidad del agua, lo que a su vez provoca estrés en los peces cultivados debido a alteraciones en su fisiología. Esto finalmente disminuye su respuesta inmunológica, lo que provoca la infección bacteriana, que

puede ya estar presente en el agua o en los propios peces, lo que provoca a su vez, brotes de enfermedades. <sup>(15), (16)</sup>

### **3.7 Cultivo de tilapias y estreptococosis en El Salvador**

La acuicultura en El Salvador es una actividad sustentable y se perfila para convertirse en un pilar fundamental para la seguridad alimentaria para el 2025. Al mismo tiempo, esta actividad debe superar problemas de patologías, calidad, procesamiento, comercialización, alimento, organización interna, coordinación institucional, sostenibilidad ambiental, entre otros. <sup>(17)</sup>

Se cree que la estreptococosis aparece típicamente cuando los peces son sometidos a estrés y bajan sus defensas inmunológicas. El estrés puede ser causado por factores ambientales, contaminación y manejo de las granjas. Algunos factores que han sido identificados incluyen cambio de temperatura del agua, presencia de lluvias, la calidad del agua, contaminantes químicos, demasiados desechos en el agua y el hacinamiento de peces en las piletas de cultivo, entre otros factores todavía no debidamente identificados. Tampoco se conoce las fuentes de contaminación con *Streptococcus spp.* de los peces en diversos ambientes de cultivo en los que existe la potencial contaminación de plantas industriales, cultivos agrícolas o granjas ganaderas que liberan desechos, incluyendo productos veterinarios (antibióticos), pesticidas y fertilizantes. La dieta de los peces puede también jugar un papel, tanto como fuente de contaminación como también poseer una baja calidad nutritiva que no contribuya a una adecuada inmunidad de los peces (A. Santos, comunicación personal, marzo de 2022).

Dicha situación es un problema muy importante para la acuicultura de tilapias en El Salvador, ya que la infección se propaga rápidamente causando mortalidad masiva que oscilan entre 5-30%, con pérdidas económicas de gran magnitud (A. Santos, comunicación personal, marzo de 2022). Las enfermedades causadas

por bacterias y parásitos son un problema para la producción de tilapias en cultivo; existen limitaciones en el conocimiento de estas problemáticas a nivel nacional por lo que se dificulta el tratamiento y prevención de esta enfermedad <sup>(9)</sup>, aun cuando tiene prioridad media en la producción de vacunas para reducir el uso de antibióticos. <sup>(18)</sup>

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0 Diseño metodológico

### 4.1 Tipo de estudio

#### 4.1.1 Transversal

La investigación se realizó en el período comprendido entre los meses de septiembre a octubre del año 2022. El tiempo y la frecuencia del muestreo al Distrito de Riego de Atiocoyo Sur correspondió según como se muestra en la Tabla N°3

Tabla N°3. Tiempo y frecuencia de muestreo al Distrito de Riego de Atiocoyo Sur, San Pablo Tacachico, La Libertad

Semana número	Fecha	Días de muestreo	Número de granjas muestreadas por día
1	Del 19 al 24 de septiembre de 2022	Martes 20/9/22	2
		Jueves 22/9/22	2
2	Del 26 al 1 de octubre de 2022	Lunes 26/9/22	3
		Jueves 29/9/22	2
3	Del 3 al 8 de octubre de 2022	Lunes 3/10/22	3
		Jueves 6/10/22	2
4	Del 10 al 15 de octubre de 2022	Jueves 13/10/22	3
5	Del 17 al 22 de octubre de 2022	Lunes 17/10/22	2
		Jueves 20/10/22	2
6	Del 24 al 29 de octubre de 2022	Lunes 24/10/22	2
		Jueves 27/10/22	3
<b>Total</b>			<b>26</b>

Fuente: elaboración propia

#### 4.1.2 Experimental

Se realizaron determinaciones microbiológicas por medio del análisis en laboratorio, al agua del estanque y órganos de tilapias frescas (cerebro, hígado, ojos y bazo), además de realizar al agua del estanque, evaluaciones fisicoquímicas de temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, alcalinidad, dureza, concentración de iones nitrato, nitrito, amonio y fosfato,

siguiendo los métodos normalizados de la American Public Health Association (APHA) para aguas potables y residuales.

#### 4.1.3 De campo

Se visitaron las granjas de tilapias en el Distrito de Riego de Atiocoyo Sur, en el municipio de San Pablo Tacachico, La Libertad (Anexo N°1); desarrollando un muestreo dirigido y puntual, a los estanques donde se presentaron sospechas de estreptococosis, previamente evaluados y coordinados por el equipo técnico de la Asociación de Regantes de Atiocoyo Sur (ARAS).

## 4.2 Investigación bibliográfica

Las bibliotecas en las cuales se realizó la investigación bibliográfica son las siguientes:

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Sistema Bibliotecario de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Felix Choussy de la Facultad de Ciencias Agronómicas en la Universidad de El Salvador.
- Internet.

## 4.3 Investigación de campo

### 4.3.1 Universo

150 granjas de cultivo de tilapia existentes en total hasta el mes de marzo de 2022 en el Distrito de Riego de Atiocoyo Sur, municipio de San Pablo Tacachico, La Libertad. Las granjas poseen una cantidad de estanques que va de 1 a 8, cada estanque posee una dimensión aproximada de 3500 m<sup>2</sup> y una densidad de

siembra de aproximadamente 4 alevines/m<sup>2</sup> (A. Santos, comunicación personal, septiembre 2022).

Es importante mencionar que la selección del universo se determinó de acuerdo a la distribución geográfica del distrito de riego (Anexo N°1), el cual está comprendido entre los cantones Atiocoyo, San Isidro, Los Dos Cerros, Las Pavas, Obraje Nuevo y Natividad, y cuyas fuentes de los recursos hídricos son el Río Sucio y el Río Lempa (Anexo N°1).

Las matrices investigadas correspondieron a tilapias frescas (cerebro, hígado, ojos y bazo), y el agua del estanque.

#### 4.3.2 Muestreo

El número de granjas a muestreadas se determinó mediante el servidor web WinEpi (ver Anexo N°2). Para calcular la muestra, se introdujo en el programa los siguientes datos: con un tamaño de población (N) igual a 150 granjas, nivel de confianza (NC) de 95 % y una prevalencia mínima esperada (Pmin) de 10%, se obtuvo el tamaño de muestra (n) de 26 granjas, las cuales fueron seleccionadas mediante un muestreo dirigido y puntual hacia aquellas granjas que, principalmente, presentaron casos sospechosos de estreptococosis. Las granjas muestreadas fueron coordinadas, evaluadas e identificadas por el equipo técnico de la Asociación de Regantes de Atiocoyo Sur (ARAS), quienes, además, en estudios anteriores, establecieron la prevalencia mínima esperada (Pmin) del 10%, siendo dicho dato utilizado también para este estudio. Es importante mencionar que se dio prioridad al muestreo de las granjas con casos evidentes de estreptococosis, sin embargo, se muestrearon 4 granjas sin signos aparentes de la enfermedad.

### 4.3.3 Muestra

26 granjas pertenecientes al Distrito de Riego de Atiocoyo Sur con sospechas de estreptococosis, previamente evaluadas, identificadas y coordinadas por el equipo técnico de ARAS (ver Anexo N°22), de donde de cada una se tomó lo siguiente: un estanque con cultivo de tilapias, de 4 a 6 tilapias con signos de enfermedad o moribundas (preferiblemente), una muestra de agua del estanque para análisis microbiológico (500 mL) y una muestra de agua para análisis fisicoquímico (1000 mL). Es importante mencionar que el número de tilapias frescas a muestrear, correspondió a un valor aleatorio establecido por el equipo de investigación, esto con el fin de garantizar la correcta ejecución de la investigación y la integridad de los datos obtenidos.

### 4.3.4 Modelo matemático para el muestreo

Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó el servidor web WinEpi (<http://www.winepi.net>, Anexo N°2) el cual está diseñado como una herramienta estadística-epidemiológica para detectar un brote de enfermedad. Dicho programa está basado según siguiente fórmula matemática:

$$(1) \quad n = \left[ 1 - (1 - NC)^{\left(\frac{1}{P \times N}\right)} \right] \times \left[ N - \frac{(P \times N) - 1}{2} \right]$$

$$n = \left[ 1 - (1 - 0.95)^{\left(\frac{1}{0.10 \times 150}\right)} \right] \times \left[ 150 - \frac{(0.10 \times 150) - 1}{2} \right]$$

$$n = 26$$

Donde:

n = tamaño de la muestra	n = 26 granjas
N = tamaño de la población, universo	N = 150 granjas
NC = nivel de confianza	NC = 95%
Pmin = prevalencia mínima	Pmin = 10%

#### 4.3.5 Instrumentos de recolección de datos

Se utilizó una hoja de recolección de datos (Anexo N°3) en donde se especificó: el número de estanque, nombre de la granja, código de la muestra (establecido de acuerdo al nombre de la granja/propietario, número del estanque, mes y año, siendo único para cada granja), fecha, hora, condición climática, pH, temperatura, oxígeno disuelto, entre otros.

#### 4.4 Análisis estadístico para los datos obtenidos

Se utilizó un análisis estadístico-descriptivo basado en el estudio de Sapugahawatte et al. <sup>(19)</sup>, en el cual mediante gráficos se asoció las tendencias de las variables de porcentaje de aislamiento de *S. agalactiae* en las diferentes matrices de estudio (tilapia fresca y agua) con cada nivel de los parámetros fisicoquímicos que se determinaron en el agua de estanque, de igual forma se evaluó la presencia de lluvias entre los meses de septiembre a octubre del año 2022, como factor que contribuye a una mayor tasa de aislamiento de *S. agalactiae*.

## 4.5 Parte Experimental

### 4.5.1 Recolección de las muestras

#### 4.5.1.1 Muestra de tilapia <sup>(20)</sup>

Se capturaron entre 4 a 6 tilapias, utilizando el método de “cuadricular” cada estanque a muestrear y que sea presuntivo a estreptococosis. Se seleccionaron cuatro puntos de recolección como se señala en la Figura N°8, y en donde se incluyó el uso de redes (atarrayas) para capturarlas. Se seleccionaron las que cuyo peso osciló entre 200 a 250 gramos (peso comercial) y que, principalmente, manifestaran síntomas clínicos de estreptococosis (natación errática, opacidad ocular y exoftalmia, lesiones/ hemorragias en branquias y/o meningoencefalitis). Éstas se colocaron en bolsas de polietileno de alta densidad, con espesor de 7/100 mm, medidas de 40 x 101 cm, que contenían agua del estanque. Luego de ser depositadas, se procedió proveerles de oxígeno, mediante una manguera de caucho conectada a un tanque suministrador de dicho gas (cilindro de 660 L, INFRASAL médica). El oxígeno se inyectó al agua dentro de la bolsa y se cerró, todo ello con la finalidad de que las tilapias permanecieran vivas durante el transporte hacia los laboratorios de Microbiología y de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en la Universidad de El Salvador.

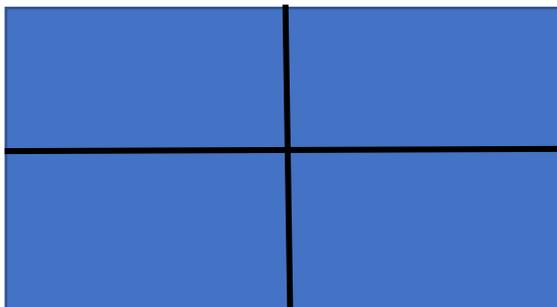


Figura N°8. Método de cuadricular el estanque <sup>(20)</sup>

#### 4.5.1.2 Muestra de agua de estanque para análisis microbiológico

Se utilizó un frasco de polietileno estéril de 500 mL de capacidad, de boca ancha y con tapa rosca. La tapa del frasco estuvo cubierta con papel Kraft hasta el momento de la toma de la muestra. Se tomó de cada estanque, una muestra de 500 mL la cual se recogió lo más lejos posible de la orilla, mediante una cuchara de muestreo de mango largo. Se sujetó el frasco con un cordel a la cuchara de muestreo, luego se sumergió en posición invertida hasta una profundidad de aproximadamente veinte centímetros, desplazándolo horizontalmente; procurando no remover el fondo y evitando los remansos o zonas de estancamiento. Las muestras se identificaron y se depositaron en una hielera acondicionada con hielo para su transporte a los laboratorios de Microbiología y de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en la Universidad de El Salvador. Las muestras se transportaron y almacenaron en condiciones de refrigeración a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , y con un tiempo de almacenaje de 24 horas como máximo desde el muestreo hasta el inicio del análisis.

#### 4.5.1.3 Muestra de agua de estanque para análisis fisicoquímico

En cada estanque presuntivo a estreptococosis, se tomó una muestra combinada que se elaboró a partir de tres submuestras ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ) tomadas al dividir el estanque en tres secciones equitativas (formando un triángulo), de acuerdo con su largo, como se señala en la Figura N°9.

- Cada submuestra recolectada tuvo un volumen equivalente a un tercio de un frasco de polietileno de 1000 mL (depositadas en un mismo frasco).
- La muestra se recogió lo más lejos posible de la orilla utilizando una cuchara de muestreo de mango largo.
- El agua recolectada se depositó en el frasco de polietileno de 1000 mL y se cerró inmediatamente.

- Se repitió el mismo procedimiento para las submuestras M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub>.

Las muestras fueron identificadas y depositadas en hieleras acondicionadas con hielo para su transporte al Laboratorio de Análisis de Aguas de la Facultad de Química y Farmacia en la Universidad de El Salvador. Las muestras fueron almacenadas en condiciones de refrigeración a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , y con un tiempo de almacenaje de 24 horas como máximo desde el muestreo hasta el inicio del análisis.

#### 4.5.1.4 Medición de temperatura, pH y concentración de oxígeno disuelto del agua de estanque

Adicionalmente en las tres secciones (M1, M2, M3) señaladas en la Figura N°9, se realizó *in situ* la lectura de los parámetros fisicoquímicos correspondientes a temperatura, pH y concentración de oxígeno disuelto, inmediatamente después de la toma de cada submuestra. Las mediciones fueron realizadas mediante la sonda multiparámetros Aquaread AP-700 (ver Anexo N°4), proporcionada por el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

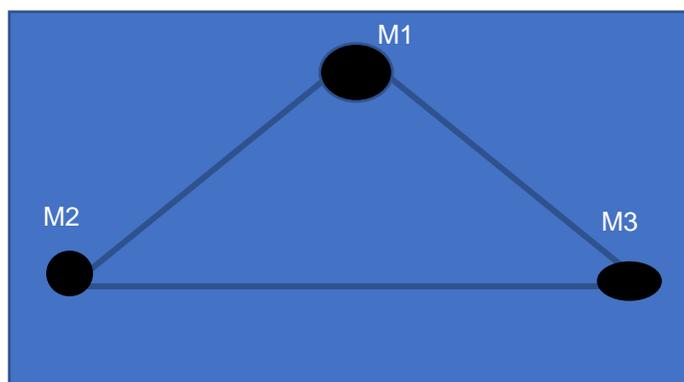


Figura N°9. Áreas a muestrear para el análisis fisicoquímico del agua. Fuente:elaboración propia

#### 4.5.2 Preparación de las muestras de tilapias y agua de estanques

##### 4.5.2.1 Muestra de tilapias (ver Anexo N°5) <sup>(20), (21)</sup>

Se realizó una muestra combinada (pool) de los cerebros, hígados, bazos y ojos de las tilapias recolectadas (entre 4 a 6 especies), de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Sacrificar las tilapias recolectadas, introduciéndolas en un baño de hielo entre 5 a 10 minutos.
- Tomar registro individual de la sintomatología externa y registrarla en hoja de cotejo (ver Anexo N°6).
- Realizar primeramente un corte longitudinal, de aproximadamente 2 cm de profundidad, a la altura de los ojos para la disección del cerebro (Figura N°10a).
- Realizar un segundo corte transversal de alrededor de 1 cm de profundidad en la parte inicial de la aleta dorsal.
- Retirar la porción diseccionada de cada tilapia con una pinza estéril hasta visualizar el cerebro.
- Extraer el cerebro con la pinza y depositarlo en una placa de Petri estéril.
- Cambiar la hoja de bisturí o cuchillo y proceder a diseccionar el abdomen de la especie.
- Realizar un corte en la parte inferior de la tilapia, iniciando desde la aleta pélvica hasta finalizar en la aleta anal (ver Figura N°10b).
- Realizar una leve apertura manual de la parte diseccionada hasta descubrir los órganos internos.
- Proceder a retirar con pinza estéril hígado y bazo.
- Colocarlos en la caja de Petri junto a los cerebros.
- Proceder a perforar la cuenca ocular, utilizando bisturí estéril y sin dañar los ojos.

- Retirar los ojos con pinzas y depositarlos en la caja de Petri junto con los demás órganos.
- Rotular y tarar dos bolsas para Stomacher.
- Proceder a verter toda la cantidad de órganos en una de las bolsas de Stomacher previamente rotuladas.
- Cerrar herméticamente y llevar al homogeneizador tipo Stomacher durante 15 minutos a 230 rpm.
- Con ayuda de una espátula estéril y en cabina de flujo laminar, pesar una cantidad aproximada de 10 gramos de la mezcla homogénea de órganos en balanza semianalítica.
- Verter 50 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) dentro de la bolsa que contiene los 10 gramos de muestra (cerrar inmediatamente el Erlenmeyer luego del vertido del caldo).
- Cerrar la bolsa de forma hermética y llevarla nuevamente a Stomacher durante 15 minutos a 230 rpm.
- Luego del tiempo, verter la muestra en un Erlenmeyer de 125 mL (mismo que contenía los 50 mL de caldo BHI).
- Sellar el Erlenmeyer con papel Parafilm y llevar a incubadora de anaerobiosis al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C ± 2°C de 18 a 24 horas.
- El procedimiento se hará una única vez para cada pool de tilapia.

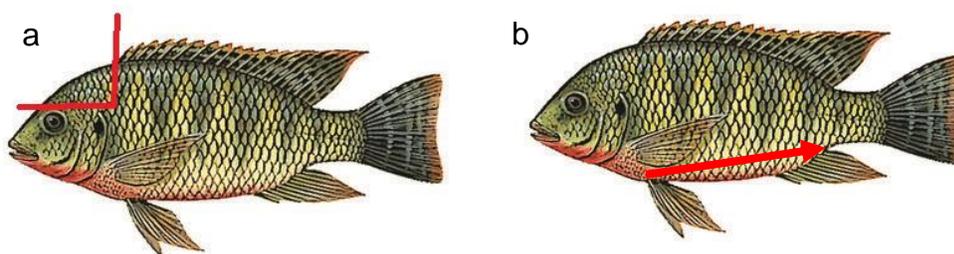


Figura N°10. Disección de tilapias, a) cerebro y b) órganos internos (31)

#### 4.5.2.2 Muestra de aguas

El agua del estanque (tanto para análisis microbiológico como análisis fisicoquímico) se analizó a partir del frasco en que se recolectó. Se almacenó por un máximo de 24 horas a partir del momento en que se recolectó a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.3 Análisis microbiológico en tilapias y agua de estanque

##### 4.5.3.1 Preparación de *Streptococcus agalactiae* ATTC 12386 <sup>(22)</sup>

Se utilizó *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 como control positivo para las pruebas de identificación, ésta fue proporcionada por los laboratorios de Microbiología y de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador. Del criovial se tomó una asada y se inoculó en una placa de Petri con Agar Sangre por la técnica de estriado para luego ser incubada en anaerobiosis al 5% de  $\text{CO}_2$ , de 24 a 48 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , verificando el crecimiento, la identidad y pureza luego del tiempo de incubación.

##### 4.5.3.2 Aislamiento de *Streptococcus agalactiae* en tilapias <sup>(22)</sup>

Procedimiento (ver Anexo N° 7)

- Limpiar y sanitizar el área de trabajo.
- Introducir un asa previamente esterilizada en el Erlenmeyer que contiene los 50 mL de caldo BHI más la muestra de órganos de tilapia (luego del tiempo de incubación).
- Inocular en dos placas de Petri con Agar Sangre al 5%, por técnica de estriado en cuadrantes.
- Tapar y sellar las placas de Petri con papel Parafilm.
- Incubar en incubadora de anaerobiosis al 5% de  $\text{CO}_2$ , de 24 a 48 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

- Verificar el crecimiento y realizar réplicas de estriado hasta obtener colonias presuntivas de *Streptococcus agalactiae* (colonias puntiformes, levemente marrón y con halo de beta hemólisis).

#### 4.5.3.3 Aislamiento de *Streptococcus agalactiae* en agua de estanque <sup>(22)</sup>

Procedimiento (Ver Anexo N°8)

- Limpiar y sanitizar el área de trabajo.
- Homogenizar la muestra agitando mecánicamente por 2 minutos.
- Dilución  $10^{-1}$ : tomar una alícuota de 10.0 mL de la muestra de agua, con pipeta graduada (estéril) y agregar sobre 90.0 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI), luego agitar.
- Dilución  $10^{-2}$ : tomar una alícuota de 10.0 mL de la dilución  $10^{-1}$  con pipeta graduada (estéril) y agregar sobre 90.0 mL de caldo BHI, luego agitar.
- Tomar de cada una de las diluciones, dos volúmenes de 300  $\mu$ L utilizando micropipeta de 1000  $\mu$ L y verter sobre placas con agar sangre.
- Tomar de cada una de las diluciones, un volumen de 400  $\mu$ L, utilizando micropipeta de 1000  $\mu$ L y verter sobre placas con agar sangre.
- Esparcir cada inóculo sobre la superficie del agar sangre utilizando un asa en L estéril.
- Dejar en reposo durante 10 minutos para que el inóculo penetre en el agar sangre.
- Al finalizar el tiempo, tapar y sellar las placas con papel Parafilm.
- Incubar en incubadora de anaerobiosis al 5% de  $\text{CO}_2$ , por 24 a 48 horas a  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .
- Verificar el crecimiento y realizar réplicas de estriado hasta obtener colonias presuntivas de *Streptococcus agalactiae* (colonias puntiformes, levemente marrón y con halo de beta hemólisis).

#### 4.5.4 Identificación de *Streptococcus agalactiae*

##### 4.5.4.1 Tinción de Gram <sup>(23)</sup>

Procedimiento (ver Anexo N°9)

- Realizar un frotis de una de las colonias características de *Streptococcus agalactiae* y proceder a su tinción.
- Observar la morfología microscópica, registrar y comparar las características observadas con el control positivo (cepa ATCC).

##### 4.5.4.2 Prueba de CAMP <sup>(20)</sup>

Procedimiento (ver Anexo N°10)

- Estriar en agar sangre un cultivo de *Staphylococcus aureus* betahemolítico (ATCC 25923) en forma lineal al centro de la placa con agar sangre.
- Estriar el inóculo de prueba en forma perpendicular al estriado anterior de *Staphylococcus aureus* sin tocarlo (alrededor de 5 mm de separación entre las líneas).
- Identificar cada estría de acuerdo al microorganismo inoculado.
- Incubar las placas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas en incubadora de anaerobiosis al 5% de  $\text{CO}_2$ .
- Examinar las placas y observar posible prueba positiva: la hemólisis de la estría perpendicular (inóculo de prueba) da un halo en forma de punta de flecha con respecto a la estría de *Staphylococcus aureus*.

##### 4.5.4.3 Prueba de sensibilidad/resistencia a antibióticos <sup>(23)</sup>

Procedimiento (ver Anexo N°11):

- Dividir la placa de agar sangre en dos secciones utilizando un marcador indeleble.

- Inocular el microorganismo de prueba en el agar sangre mediante estriado simple (zig-zag).
- Rotar la placa 180° y realizar un segundo estriado simple.
- Colocar de forma aséptica, un disco de bacitracina de 0.04 unidades en una de las secciones del agar sangre.
- Colocar de forma aséptica en la otra sección, un disco de vancomicina de 30 µg.
- Incubar las placas durante 18 a 24 horas a 37°C ± 2°C en incubadora de anaerobiosis al 5% de CO<sub>2</sub>.
- Examinar las zonas de inhibición, donde se espera resistencia a bacitracina y sensibilidad a vancomicina tanto de los microorganismos de prueba como del control positivo (cepa ATCC).

#### 4.5.4.4 Identificación mediante Microgen® Strep-ID <sup>(24)</sup>

Procedimiento (ver Anexo N°12):

- Realizar tinción de Gram (cocos Gram positivos en pares o cadenas) para verificar morfología.
- Tomar nota de la hemólisis producida en la placa de agar sangre (beta hemólisis) y registrar lo observado en el software (proporcionado junto con el kit).
- Extraer suficientes colonias aisladas idénticas del medio de aislamiento primario (agar sangre).
- Emulsionar las colonias en el medio de suspensión, suministrado en el kit, para producir una suspensión equivalente a 2.0 McFarland.
- Despegar con cuidado las cintas adhesivas que sellan las tiras reactivas de micropocillos, sin quitarlas por completo. No desechar las cintas adhesivas.
- Usar micropipeta y adicionar 100 µL de la suspensión bacteriana a cada micropocillo de la tira de prueba.

- Después de la inoculación, cubrir el pocillo 12 con 3-4 gotas de aceite mineral. Este pozo está resaltado con un círculo negro alrededor del pozo para permitir una fácil identificación del pozo correcto.
- Sellar la parte superior de la tira de prueba de micropocillos con la cinta adhesiva que se retiró anteriormente.
- Control de pureza: transferir 100  $\mu$ L con micropipeta de la suspensión bacteriana a una placa con agar sangre, depositando sobre la superficie (no estriar).
- Incubar aeróbicamente a 35 - 37 °C durante 18 - 24 horas (tira de prueba, control pureza y solución de hipurato).
- Después del tiempo de incubación, retirar la cinta adhesiva y registrar todas las reacciones positivas con la ayuda de la tabla de colores (incluida en el kit).
- Registrar los resultados en el formulario (ver Anexo N°13).
- Agregar los reactivos apropiados a los siguientes micropocillos:
- Realizar la prueba de Voges-Proskauer en el pozo 8 agregando 1 gota de reactivo VPI seguida de 1 gota de reactivo VPII al pozo y leer después de 15 a 30 minutos. El desarrollo de un color rosa claro a rojo oscuro indica que la reacción de VP es positiva. Un fondo claro indica una reacción VP negativa (ver Anexo N°13).
- Agregar 1 gota del reactivo PYR al pozo 11 y leer después de 5 a 10 minutos. La formación de un color rosa pálido a un rojo muy intenso indica un resultado positivo (ver Anexo N°13).
- Identificación:
- En el formulario de resultados Microgen® Strep-ID (ver Anexo N°13), los sustratos se han organizado en tripletes (conjuntos de 3 reacciones) con cada sustrato, a los cuales se les ha asignado un valor numérico (4, 2 o 1). La suma de las reacciones positivas de cada triplete forma un solo dígito del Código Octal que se utiliza para determinar la identidad del aislado. El Código Octal se ingresa en el Software del Sistema de Identificación de Microgen® ID

versión 2.0.2.33, que genera un informe de los cinco organismos más probables en la base de datos seleccionada (cada uno de ellos con su porcentaje de similitud).

#### 4.5.4.5 Hidrólisis del hipurato <sup>(24)</sup>

Procedimiento (ver Anexo N°14)

- Agregar 3 gotas de solución de hipurato sódico al 10% (proporcionado por el kit) a un tubo vacío.
- Tomar de 2 a 4 colonias características de *Streptococcus agalactiae* usando un asa bacteriológica estéril.
- Emulsionar el inóculo dentro de la solución de hipurato y luego tapar el tubo.
- Incubar aeróbicamente durante 18-24 horas  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Luego de la incubación, agregar con cuidado 3 gotas del reactivo de ninhidrina al 3% al tubo, no mezclar el reactivo.
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos y verificar reacción. El desarrollo de un color púrpura en la capa superior del reactivo indica una reacción de hidrólisis del hipurato positiva. Un color claro en el nivel superior del reactivo indica una reacción negativa (ver Anexo N°13).
- Registrar los resultados obtenidos en el formulario (ver Anexo N°13).

#### 4.5.5 Análisis fisicoquímico al agua de estanque

##### 4.5.5.1 Alcalinidad <sup>(25)</sup>

Método volumétrico

Principio: Los iones carbonato, bicarbonato e hidroxilo, presentes en una muestra como resultado de la disociación o hidrólisis de solutos, reaccionan con adiciones de ácido estándar.

Procedimiento (ver Anexo N°15)

- Pipetear 50.0 mL de agua destilada y colocarlos en un Erlenmeyer de 250 mL.
- Colocar 2 gotas de solución indicadora de anaranjado de metilo.
- Titular con ácido sulfúrico 0.02 N sobre una superficie blanca y anotar el valor del ácido gastado hasta el cambio de color (valor del blanco).
- Agregar de 2 a 3 gramos de carbón activado por cada 500 mL de muestra, agitar y reposar por 3 minutos.
- Filtrar al vacío la muestra de agua a través de papel filtro Whatman grado 41.
- Pipetear 50.0 mL de la muestra y colocarlos en un Erlenmeyer de 100 mL manteniendo la punta de la pipeta cerca del fondo del Erlenmeyer.
- Ajustar la muestra a la temperatura ambiente si es necesario.
- Agregar 2 gotas de solución indicadora de anaranjado de metilo.
- Titular con ácido sulfúrico 0.02 N estándar sobre una superficie blanca hasta conseguir un cambio de color persistente de amarillo a rojo naranja, característico del punto equivalente.
- Anotar el volumen utilizado.
- Realizar titulación por triplicado.
- Realizar los cálculos respectivos para determinar la concentración en miligramos por litro de alcalinidad mediante la siguiente ecuación:

$$(2) \text{Alcalinidad} \left( \frac{\text{mg de CaCO}_3}{L} \right) = \frac{A \times N \times 50000}{\text{mL de muestra}}$$

Donde:

A = mL de ácido sulfúrico usados.

N = normalidad del ácido sulfúrico 0.02 N estándar.

Estandarización del titulante: ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.02 N <sup>(25)</sup>

- Pesar 3.000 ± 0.2 g de estándar primario de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) en crisol previamente tarado.

- Llevar a estufa entre 180 a 200°C por 2 horas.
- Retirar de estufa y almacenar en desecador durante 24 horas.
- Pesar una cantidad de  $2.550 \pm 0.001$  g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .
- Depositar la cantidad pesada en un balón volumétrico de 1 L y diluir con agua desmineralizada.
- Trasvasar un volumen aproximado de 50 mL de la solución de carbonato de sodio a un beaker de 100 mL.
- Cubrir con un vidrio de reloj y hervir suavemente durante 3 a 5 minutos en hot plate.
- Enfriar la solución a temperatura ambiente.
- Tomar una alícuota de 10.0 mL y transferir a un Erlenmeyer de 125 mL
- Agregar 2 gotas de Tiosulfato Sódico 0.1 N y 2 gotas de solución indicadora de anaranjado de metilo.
- Titular con la solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02 N (pureza= 37%,  $\rho = 1.18$  g/mL) en una superficie blanca hasta un cambio de color persistente de amarillo a rojo naranja, característico del punto equivalente.
- Realizar estandarización por triplicado.
- Calcular la normalidad real a partir de la siguiente fórmula:

$$(3) \quad N = \frac{A \times B}{53.00 \frac{\text{g}}{\text{eq}} \times C}$$

Donde:

A=gramos de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para preparar un litro de solución.

B=mililitros de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  tomados para la titulación.

C= mililitros de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilizados para la titulación.

1mL de solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.02 N equivale a 1.00 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

#### 4.5.5.2 Dureza <sup>(25)</sup>

##### Método volumétrico

Principio: El ácido etilendiaminotetraacético y su sal sódica (EDTA) forman un complejo soluble (quelato) cuando es añadido a una solución de ciertos cationes metálicos. Si se agrega una pequeña cantidad de Negro de Eriocromo T a una solución acuosa que contiene iones de calcio y magnesio a un pH de  $10.0 \pm 0.1$ , la solución se vuelve de color rojo vino. Si el EDTA es agregado como valorante, el calcio y el magnesio se complejarán, y cuando todo el magnesio y el calcio se hayan complejado, la solución cambia de rojo vino a azul, marcando el punto final de la titulación. El ion magnesio debe estar presente para producir un punto final satisfactorio.

##### Procedimiento (ver Anexo N°16)

- Pipetear 50 mL de agua destilada y colocarlos en un Erlenmeyer de 250 mL
- Añadir 2 mL de solución tampón de cloruro de amonio - hidróxido de amonio, para dar un pH entre 10.0 a 10.1.
- Realizar la titulación en cinco minutos, medidos a partir del momento de la adición del tampón.
- Añadir dos gotas de solución indicadora negro de Eriocromo T.
- Poco a poco, añadir titulante EDTA 0.01 M estándar, removiendo continuamente, hasta que desaparezcan los últimos matices rojizos.
- Añadir las últimas gotas con intervalos de 3-5 segundos. En el punto final, la solución suele ser azul (anotar valor de blanco).
- Agregar de 2 a 3 gramos de carbón activado por cada 500 mL de muestra, agitar y reposar por 3 minutos.
- Filtrar al vacío la muestra de agua a través de papel filtro Whatman grado 41.
- Pipetear 25 mL de muestra y colocarlos en un Erlenmeyer de 250 mL.
- Incorporar 25 mL pipeteados de agua destilada.

- Añadir 2 mL de solución tampón de cloruro de amonio - hidróxido de amonio, para dar un pH entre 10.0 a 10.1.
- Añadir dos gotas de solución indicadora Negro de Eriocromo T.
- Poco a poco, añadir titulante EDTA 0.01 M estándar, removiendo continuamente, hasta que desaparezcan los últimos matices rojizos.
- Añadir las últimas gotas con intervalos de 3-5 segundos. En el punto final, la solución suele ser azul.
- Nota: Se recomienda utilizar luz natural o una lámpara fluorescente de luz diurna, ya que las lámparas de incandescencia tienden a producir un matiz rojizo en el azul de punto final.
- Registrar los mililitros gastados de titulante.
- Realizar por triplicado.
- Realizar los cálculos respectivos para determinar la concentración en miligramos por litro de dureza total mediante la siguiente ecuación:

$$(4) \text{ Dureza total } \left( \frac{\text{mg de CaCO}_3}{L} \right) = \frac{V_{EDTA} \times B \times 1000}{V_{Muestra}}$$

Donde:

$V_{EDTA}$  = Volumen de titulante (EDTA) para valorar dureza, en mL

B= miligramos de  $\text{CaCO}_3$  equivalentes a 1.0 mL de EDTA 0.01 M.

$V_{Muestra}$  = Alícuota de muestra titulada, en mL.

1.0 mL de EDTA 0.01 M equivalen a 1.0 mg de  $\text{CaCO}_3$ .

Estandarización del titulante: EDTA 0.01 M <sup>(25)</sup>

- Pesar  $1.1 \pm 0.1$  g de estándar primario de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) en un crisol previamente tarado.
- Secar en estufa durante 2 horas a  $110^\circ\text{C}$ .
- Retirar el crisol de la estufa y colocarlo en un desecador durante 24 horas.

- Pesar 1.0 g  $\pm$  0.01 de CaCO<sub>3</sub> y transferir a un beaker de 100 mL
- Añadir gota a gota ácido clorhídrico 3 N hasta disolver
- Agregar 50 mL de agua destilada
- Cubrir el beaker con un vidrio de reloj y hervir suavemente durante 3 a 5 minutos en hot plate.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Trasvasar la solución a un balón volumétrico de 1 L
- Aforar el balón con agua destilada.
- Medir 10.0 mL de la solución de CaCO<sub>3</sub> con pipeta volumétrica y depositar en Erlenmeyer de 125 mL.
- Añadir 2 mL de la solución tampón de cloruro de amonio - hidróxido de amonio, para dar un pH entre 10.0 a 10.1.
- Añadir dos gotas del indicador negro de eriocromo T.
- Titular con la solución de EDTA 0.01 M, removiendo constantemente hasta que desaparezcan los últimos matices rojizos.
- Añadir las últimas gotas con intervalos de 3-5 segundos. En el punto final, la solución suele ser azul.
- Anotar los mililitros gastados de titulante.
- Realizar la estandarización por triplicado.
- Calcular la molaridad real de la solución de EDTA mediante la siguiente ecuación:

$$(5) \quad M = \frac{g \text{ CaCO}_3 \text{ alicuota}}{V_{EDTA} \times 100.08}$$

#### 4.5.5.3 Nitratos <sup>(25), (26)</sup>

Método espectrofotométrico

Equipo: espectrofotómetro Shimadzu UV-VIS 1800 (ver Anexo N°4)

Principio: Este método se basa en la medición de la absorbancia producida por los nitratos a una longitud de onda de 220 nm, sin embargo, la materia orgánica

disuelta puede ser absorbida a esa longitud de onda, pero el  $\text{NO}_3^-$  no absorbe a 275 nm, por lo que se puede realizar una segunda medición a 275 nm y se utiliza para corregir el valor de nitratos.

Procedimiento (ver Anexo N°17)

- Realizar una curva de calibración con patrones de nitratos de sodio (1000 ppm, pureza= 98%, marca Merck) 0, 1, 2, 4, 8, 10 ppm.
- Agregar de 2 a 3 gramos de carbón activado por cada 500 mL de muestra, agitar y reposar por 3 minutos.
- Filtrar al vacío la muestra de agua a través de papel filtro Whatman grado 41.
- Aforar un balón volumétrico de 50.0 mL con la muestra filtrada.
- Medir 1 mL de HCl 1.0 N, agregarlo al balón de 50.0 mL conteniendo la muestra y mezclar.
- Leer la absorbancia a 220 nm y a 275 nm.
- Realizar procedimiento por duplicado.
- Realizar los cálculos para determinar la concentración de iones nitrato mediante la siguiente fórmula:

$$(5) \quad Y(abs) = mx + b$$

$$(6) \quad \text{NO}_3 \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{(Abs_{\text{corregida } Mx} - \text{intercepto})}{pendiente}$$

$$(7) \quad Abs_{\text{corregida } Mx} = Abs_{220nm} - (2 \times Abs_{275nm})$$

#### 4.5.5.4 Nitritos <sup>(25), (26)</sup>

Método colorimétrico

Equipo: fotómetro HACH DR 2700 (ver Anexo N°4)

Principio: el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) se determina a través de la formación de un colorante azoico púrpura rojizo producido a un pH de 2,0 a 2,5 por acoplamiento de

sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED).

Procedimiento (ver Anexo N°18)

- Lavar los tubos de ensayos con agua desmineralizada.
- Agregar de 2 a 3 gramos de carbón activado por cada 500 mL de muestra, agitar y reposar por 3 minutos.
- Filtrar al vacío la muestra de agua a través de papel filtro Whatman grado 41.
- Tomar 5.0 mL de muestra filtrada y traspasarla a un tubo de ensayo con rosca.
- Agregar 1 microcuchara del reactivo N°2 de iones  $\text{NO}_2^-$  (HACH), tapar y agitar.
- Esperar 10 minutos.
- Colocar el tubo en el espectrofotómetro y leer la muestra a una longitud de onda de 543 nm.
- Realizar procedimiento por duplicado.
- Calcular la concentración de iones nitritos mediante la siguiente fórmula:

$$(8) \quad \text{NO}_2^- \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(\text{Abs}_{Mx} - \text{intercepto})}{\text{pendiente}}$$

#### 4.5.5.5 Fosfato <sup>(25)</sup>

Método colorimétrico del ácido vanadomolibdofosfórico

Equipo: fotómetro HACH DR 2700

Principio: En una solución diluida de ortofosfato, el molibdato de amonio reacciona en condiciones ácidas para formar un heteropoliácido, el ácido molibdofosfórico. En presencia de vanadio, se forma ácido vanadomolibdofosfórico amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de fosfato.

Procedimiento (ver Anexo N°19)

- a. Realizar una curva de calibración con patrones de fosfato de potasio (1000 ppm, pureza= 98%, marca Merck) de 0, 4, 8, 12 y 16 ppm.
- b. Agregar de 2 a 3 gramos de carbón activado por cada 500 mL de muestra, agitar y reposar por 3 minutos.
- c. Filtrar al vacío la muestra de agua a través de papel filtro Whatman grado 41.
- d. Tomar 5.0 mL de muestra filtrada y traspasarla al tubo de ensayo.
- e. Agregar 1.0 mL de la solución A y 1.0 ml de la solución B (ver Anexo N°21).
- f. Esperar 15 minutos.
- g. Colocar el tubo en el espectrofotómetro y leer la muestra a una longitud de onda de 420 nm.
- h. Calcular la concentración de iones fosfatos mediante la siguiente fórmula:

$$(9) \quad [PO_4^{3-}] \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{(Abs_{mx} - intercepto)}{pendiente}$$

#### 4.5.5.6 Amonio <sup>(25)</sup>

Método espectrofotométrico

Equipo: fotómetro HACH 2700

Principio: Un compuesto azul intenso, el indofenol, es formado por la reacción de amoníaco, hipoclorito y fenol catalizada por nitroprusiato de sodio.

Procedimiento (ver Anexo N°20)

- a. Agregar de 2 a 3 gramos de carbón activado por cada 500 mL de muestra, agitar y reposar por 3 minutos.
- b. Filtrar al vacío la muestra de agua a través de papel filtro Whatman grado 41.
- c. Colocar 25.0 mL de la muestra en un Erlenmeyer de 50 mL.

- d. Agregar a la muestra 1.0 mL de solución de fenol y mezclar bien.
- e. Agregar a la muestra 1.0 mL de solución de nitroprusiato 0.5% p/v y mezclar bien.
- f. Agregar 2.5 mL de solución oxidante (ver Anexo N°21).
- g. Cubrir las muestras con una envoltura de plástico o Parafilm.
- h. Dejar que el color se desarrolle a temperatura ambiente (22 a 27 °C) con luz tenue durante al menos una hora (el color es estable durante 24 horas).
- i. Medir la absorbancia a 640 nm.
- j. Preparar una solución blanco y al menos dos estándares por dilución de la solución stock de cloruro de amonio (1000 ppm, pureza=98%, marca Merck) en el rango de concentración de la muestra.
- k. Tratar los estándares de igual manera que las muestras.
- l. Calcular la concentración de iones amonio a partir de la siguiente ecuación:

$$(10) \quad NH_4 \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{(Abs_{Mx} - intercepto)}{pendiente}$$

## **CAPITULO V**

### **RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

## 5.0 Resultados y discusión de resultados

### 5.1 Presencia de *Streptococcus agalactiae* en tilapia y agua de cultivo

Es importante mencionar que la codificación se estableció de acuerdo a las iniciales del nombre de la granja o del propietario, el número de estanque dentro de la granja, el mes en que se evaluó dicha granja y el año en que se evaluó, generando así un código único para cada granja y sus muestras.

#### 5.1.1 Presencia de *Streptococcus agalactiae* en agua de cultivo

Tabla N°4. Resultados obtenidos del aislamiento e identificación de *S. agalactiae* en muestra de agua de estanque

Muestra	Fecha	Características macroscópicas del crecimiento	Presencia/ausencia de colonias características a <i>S. agalactiae</i>
IGE409-22	20/9/2022	Sin crecimiento	Ausencia
RAE609-22	20/9/2022	Colonias irregulares, filamentosas, opacas y de aspecto húmedo	Ausencia
PBE109-22	22/9/2022	Colonias filamentosas, color marrón y de aspecto húmedo.	Ausencia
EME309-22	22/9/2022	Sin crecimiento	Ausencia
JAE109-22	26/9/2022	Sin crecimiento	Ausencia
RAE209-22	26/9/2022	Colonia filamentosas, color beige, aspecto húmedo y brillante	Ausencia
CPE609-22	26/9/2022	Colonias irregulares, color verdoso, aspecto húmedo y brillante	Ausencia
JL1/E209-22	29/9/2022	Sin crecimiento	Ausencia
MVE109-22	29/9/2022	Colonias puntiformes, color beige, aspecto húmedo y sin hemólisis	Ausencia
JL2/E210-22	3/10/2022	Sin crecimiento	Ausencia
NVE210-22	3/10/2022	Colonias circulares, color blanco, aspecto húmedo y brillante	Ausencia

Tabla N°4 (Continuación)

MVE210-22	3/10/2022	Colonias puntiformes, color blanco, aspecto húmedo y sin hemólisis	Ausencia
ARE210-22	6/10/2022	Colonias irregulares, filamentosas, color marrón y verde, aspecto húmedo	Ausencia
IOE110-22	6/10/2022	Sin crecimiento	Ausencia
YSE410-22	13/10/2022	Colonias circulares, color blanco, aspecto húmedo y sin hemólisis	Ausencia
LFE110-22	13/10/2022	Colonia irregular, color marrón, aspecto húmedo y brillantes	Ausencia
BDE310-22	13/10/2022	Sin crecimiento	Ausencia
ALE410-22	17/10/2022	Colonias irregulares, color blanco, aspecto húmedo y brillantes	Ausencia
RRE210-22	17/10/2022	Película blanquecina, color blanco, aspecto húmedo y brillante	Ausencia
COE110-22	20/10/2022	Sin crecimiento	Ausencia
RCE410-22	20/10/2022	Colonias irregulares, color verdoso, aspecto seco y mate	Ausencia
WGE210-22	24/10/2022	Colonias filamentosas, color marrón, aspecto húmedo y brillante	Ausencia
YAE310-22	24/10/2022	Sin crecimiento	Ausencia
FRE410-22	27/10/2022	Sin crecimiento	Ausencia
JAE410-22	27/10/2022	Colonias circulares, color blanco, aspecto húmedo y brillante	Ausencia
HME410-22	27/10/2022	Sin crecimiento	Ausencia

Fuente: elaboración propia

Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico de las muestras de agua de estanque se muestran la Tabla N°4, en donde no fue posible el aislamiento y en consiguiente, tampoco la identificación de la bacteria siguiendo la metodología propuesta para este estudio. Los resultados de esta investigación siguen la tendencia actual, ya que hasta ahora no se ha podido aislar ni identificar bacterias del género *Streptococcus* de muestras de aguas, y los estudios relacionados al tema son casi inexistentes.

Algunos de los factores que pudieron llevar a los resultados de este estudio son el hecho de que la metodología de análisis para el agua de estanque, no se encuentra validada, asimismo el utilizar la técnica de filtración por membrana podría haber ayudado a la recuperación del microorganismo. Otros de los factores que se podrían mencionar son el hecho de que las bacterias del género *Streptococcus* no sean capaces de sobrevivir por mucho tiempo en el agua debido al ambiente desfavorable que ésta pueda representar y la existencia de otros microorganismos oportunistas, tal y como se evidencia en la Figura N°11, pueda inhibir su crecimiento.

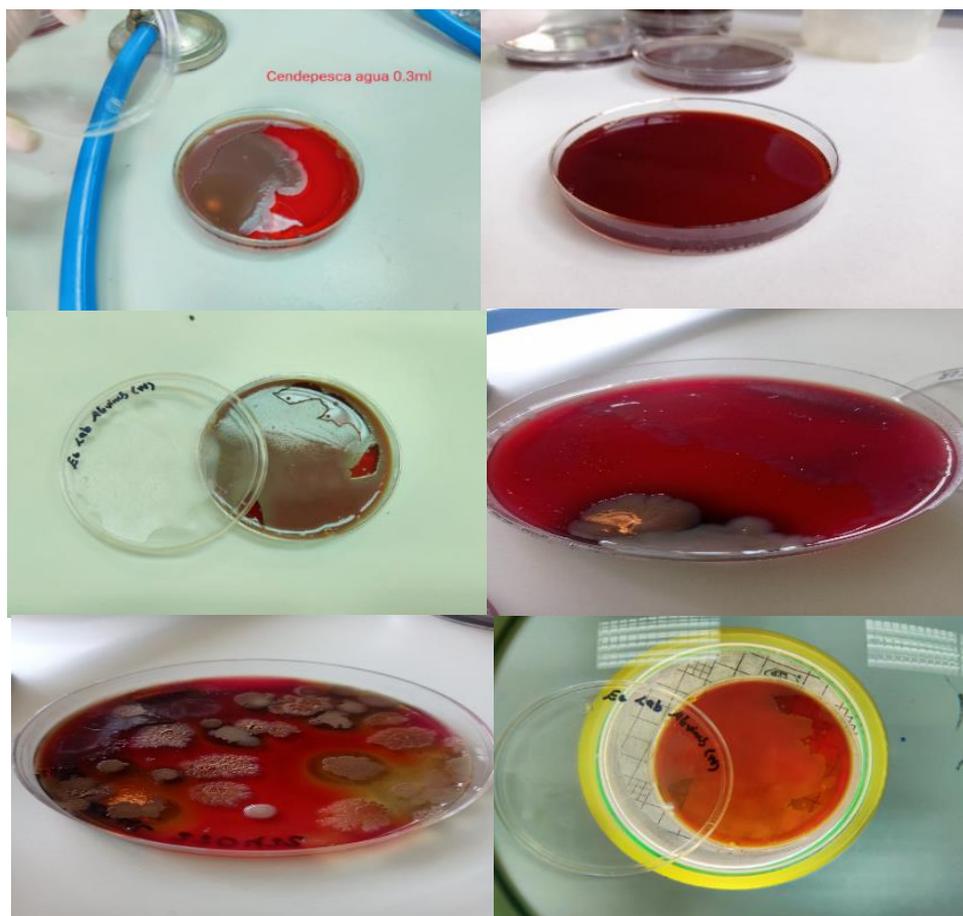


Figura N°11. Resultados obtenidos del análisis microbiológico a agua de estanque.

Fuente: elaboración propia

### 5.1.2 Presencia de *Streptococcus agalactiae* en tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*)

#### 5.1.2.1 Sintomatología referente a estreptococosis

Tabla N°5. Sintomatología de las muestras de tilapia (*Oreochromis niloticus*) capturadas

Muestra	Fecha	Síntomas						
		Mx	NE	EU	EB	OC	LH	MT
IGE409-22	20/9/2022	4	++	-	+	+	+	-
RAE609-22	20/9/2022	5	+	-	-	-	++	-
PBE109-22	22/9/2022	4	+	-	+	+	-	-
EME309-22	22/9/2022	4	+	-	-	-	++	-
JAE109-22	26/9/2022	6	-	-	-	-	+	-
RAE209-22	26/9/2022	4	+++	-	++	+	++	+
CPE609-22	26/9/2022	4	+	-	+	+	-	-
JL1/E209-22	29/9/2022	6	-	-	-	-	-	-
MVE109-22	29/9/2022	4	+	-	+	-	-	-
JL2/E210-22	3/10/2022	4	-	-	-	-	+	-
NVE210-22	3/10/2022	5	+	-	++	+	++++	+
MVE210-22	3/10/2022	4	+++	-	-	-	+	-
ARE210-22	6/10/2022	4	-	-	-	-	-	+
IOE110-22	6/10/2022	6	+	-	-	-	-	-
YSE410-22	13/10/2022	4	+++	-	++	+	++	+
LFE110-22	13/10/2022	5	++	-	+	+	+++	-
BDE310-22	13/10/2022	4	-	-	-	-	-	-
ALE410-22	17/10/2022	4	-	-	-	-	+	-
RRE210-22	17/10/2022	5	+	-	-	-	-	-
COE110-22	20/10/2022	6	-	-	-	-	-	-
RCE410-22	20/10/2022	4	+	-	++	+	+	+
WGE210-22	24/10/2022	4	-	-	-	-	-	+
YAE310-22	24/10/2022	4	-	-	-	-	-	-
FRE410-22	27/10/2022	5	+	-	-	-	+	-
JAE410-22	27/10/2022	4	-	-	++	-	-	-
HME410-22	27/10/2022	4	+	-	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>		<b>117</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	<b>22</b>	<b>6</b>

Mx: muestras capturadas, NE: natación errática, EU: exoftalmo unilateral, EB: exoftalmo bilateral, OC: opacidad ocular, LH: lesiones y/o hemorragias, MT: muertes durante el transporte. Fuente: elaboración propia

En la Tabla N°4, se muestran el número de tilapias (*Oreochromis niloticus*) capturadas por fecha de muestreo siendo un total de 117 especies capturadas. De las especies capturadas, 24 mostraron natación errática, 15 presentaron exoftalmo bilateral, 8 con opacidad ocular, 22 presentaron lesiones y/o hemorragias externas, 6 murieron durante el transporte y ninguna presentó exoftalmo unilateral. Los datos fueron registrados cada día de muestreo, utilizando para ello la hoja de cotejo establecida (ver Anexo N°25).

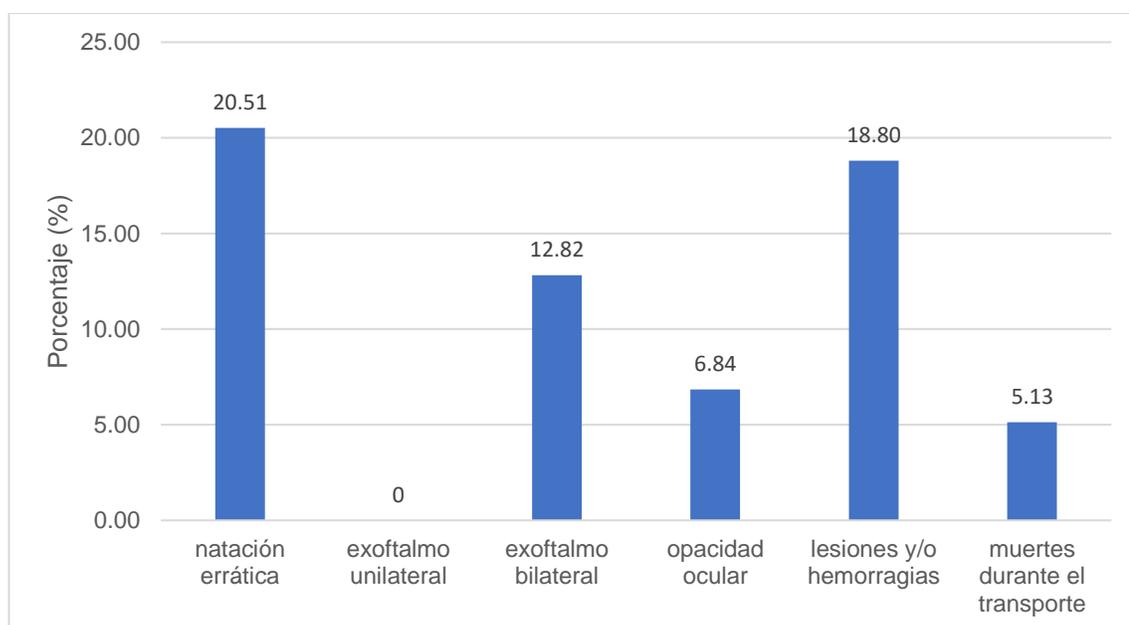


Figura N°12. Sintomatología por estreptococosis en las tilapias capturadas. Fuente: elaboración propia

Los resultados mostrados en la Figura N°12 indican que la sintomatología con mayor porcentaje de incidencia fue la natación errática con un 20.51% seguido de un 18.80% de lesiones y/ hemorragias presentes en las tilapias capturadas y de un 12.82% de casos de exoftalmos bilateral (ojos saltones). El signo de opacidad ocular se manifestó en un 6.84% de forma aislada y nunca resultando en más de un ejemplar de cada muestra, de igual forma se obtuvo un porcentaje bajo del 5.13% de muertes durante el transporte y un 0% de exoftalmo unilateral. De forma general, los resultados obtenidos demuestran que los síntomas referidos a estreptococosis se manifiestan con baja frecuencia, lo que lleva a

deducir que no todas las granjas muestreadas presentaban casos reales de infección por *S. agalactiae* o que la enfermedad se encontraba de forma latente hasta el momento de la captura de las especies analizadas.

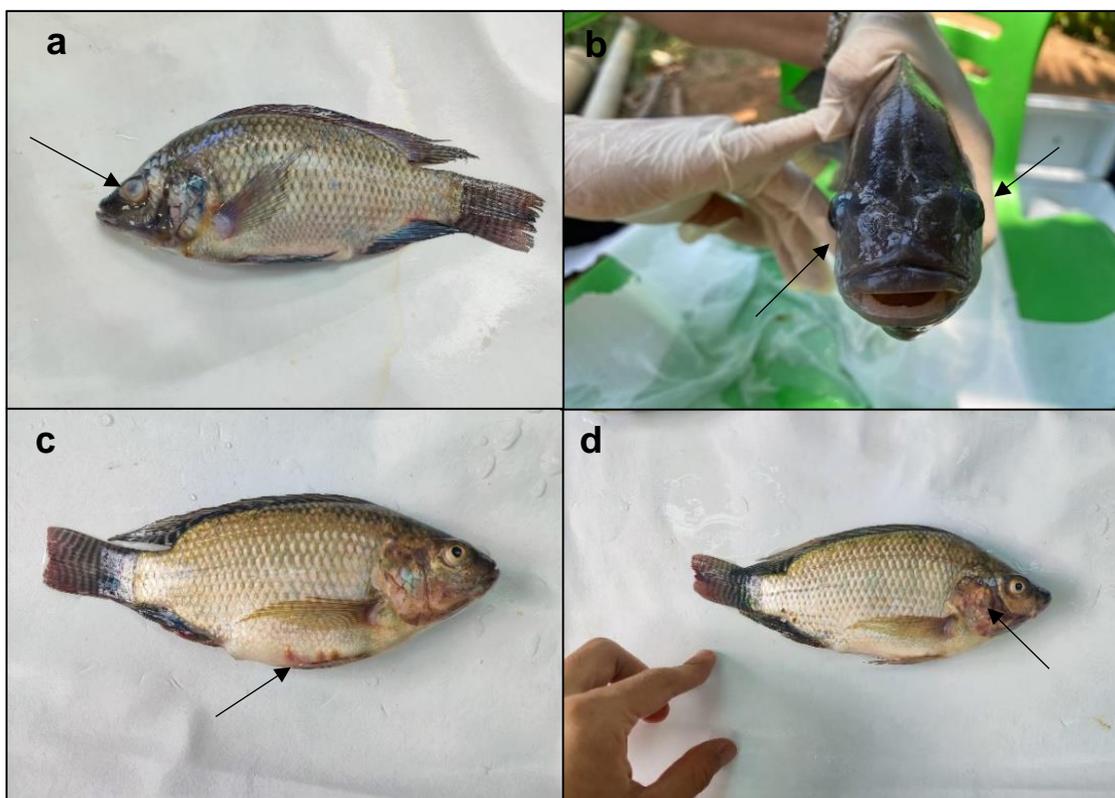


Figura N°13. Sintomatología externa por estreptococosis, a) opacidad ocular, b) exoftalmo bilateral, c) hemorragias y distensión abdominal, d) lesión tisular. Fuente: elaboración propia

#### 5.1.2.2 Aislamiento y purificación de colonias presuntivas a *Streptococcus agalactiae*

Cuatro muestras presuntivas a *S. agalactiae* se aislaron de tilapia fresca siguiendo la metodología propuesta, sin el uso de medios enriquecidos con antibióticos para el aislamiento selectivo ya que no fue posible su obtención al momento del desarrollo de la investigación. Las muestras presuntivas provinieron de las granjas con código: RAE209-22, CPE609-22, MVE210-22 y ARE210-22.

Luego de resiembras para su purificación, todas las muestras presuntivas mostraron colonias con características macroscópicas similares al control positivo (*S. agalactiae* ATCC 12386) como lo son colonias puntiformes, color beige, con presencia de beta hemólisis, tal y como se visualiza en la Figura N°14.

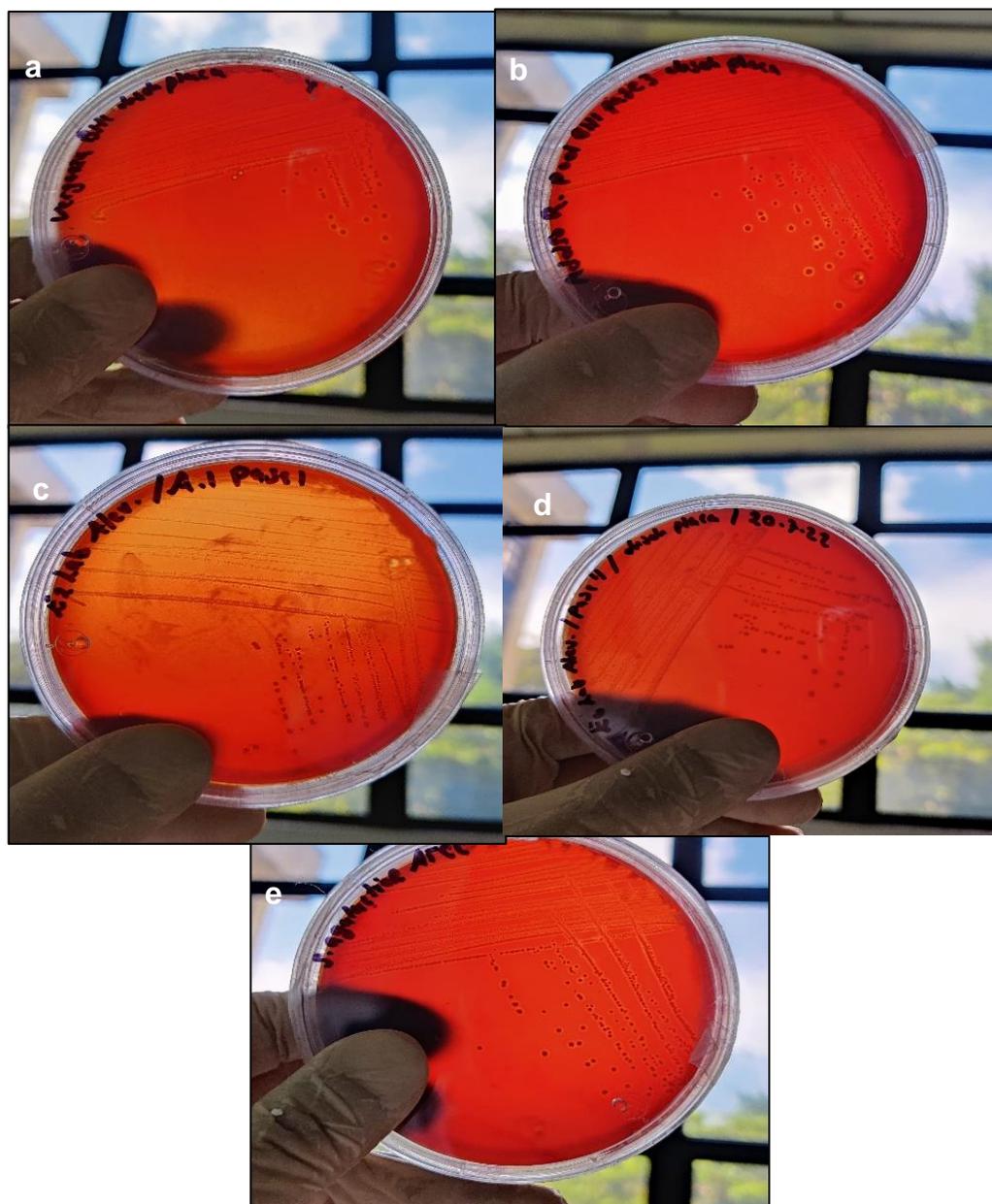


Figura N°14. Características macroscópicas de las colonias presuntivas aisladas a) MVE210-22, b) ARE210-22, c) RAE209-22, d) CPE609-22 y e) control positivo. Fuente: elaboración propia

### 5.1.3 Identificación de *Streptococcus agalactiae* en muestras presuntivas

#### 5.1.3.1 Tinción de Gram

Los resultados obtenidos de la tinción de Gram, representados en la Figura N°15, muestran similitudes en las 4 muestras presuntivas frente al control positivo (*S. agalactiae* ATCC 12386). En todas se presentan cocos grampositivos distribuidos en cadenas al ser observados al microscopio con el objetivo de 100x.

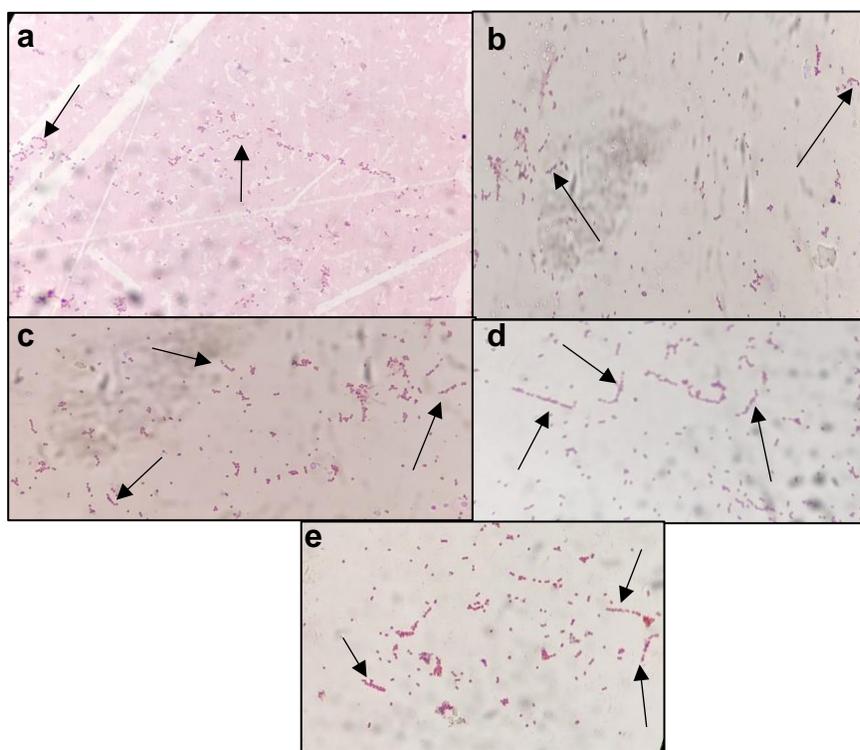


Figura N°15. Tinción de Gram de los casos presuntivos a) MVE210-22, b) ARE210-22, c) RAE209-22, d) CPE609-22 y e) control positivo. Fuente: elaboración propia

#### 5.1.3.2 Prueba de CAMP

Los resultados de la prueba de CAMP que se muestran en la Figura N°16 demuestran que únicamente las muestras presuntivas RAE209-22 y CPE609-22 resultaron positivas a la prueba de CAMP, formándose la zona de hemólisis en forma de punta de flecha característica. Para las demás muestras presuntivas,

incluido el control positivo, la prueba resultó negativa a pesar de realizarse en 3 ocasiones diferentes, obteniéndose el mismo resultado.

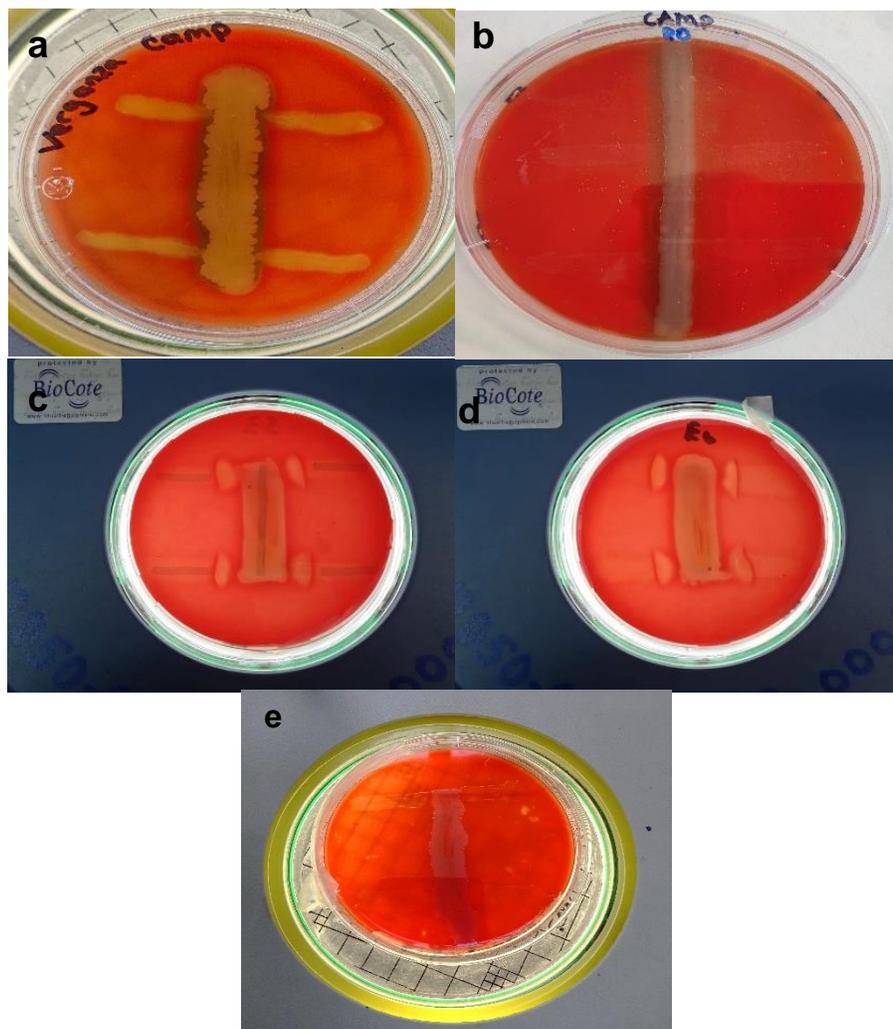


Figura N°16. Resultados prueba de CAMP para los casos presuntivos a) MVE2010-22, b) ARE210-22, c) RAE209-22, d) CPE609-22 y e) control positivo. Fuente: elaboración propia

Los resultados negativos para las muestras presuntivas MVE2010-22, ARE210-22 y el control positivo, puede deberse a factores genéticos/moleculares, en donde los serotipos de *S. agalactiae* encontrados en estas muestras, no expresan el factor CAMP o se exprese de forma reducida de tal modo que no sea posible detectarlo mediante esta prueba, todo ello concordancia a los resultados obtenidos por Guo, D et al. (27), en donde también se demuestran resultados

negativos para la prueba de CAMP de muestras identificadas como *S. agalactiae* y por Hassan, A. et al. (28), en donde se demuestra la expresión reducida del factor CAMP.

### 5.1.3.3 Prueba de sensibilidad/resistencia a antibióticos

Tabla N°6. Resultados para la prueba de sensibilidad/resistencia a bacitracina y vancomicina

Muestra	Halo de inhibición con bacitracina (mm)	Resultado para bacitracina	Halo de inhibición con vancomicina (mm)	Resultado para vancomicina
MVE210-22	11	Resistente	16	Resistente
ARE210-22	9	Resistente	15	Resistente
RAE209-22	10	Resistente	17	Sensible
CPE609-22	13	Resistente	18	Sensible
Control positivo	14	Resistente	23	Sensible
<b>*Resultado esperado</b>	<b>Sensibilidad a bacitracina 0.04 U: 15-20 mm</b>		<b>Sensibilidad a vancomicina 30 µg: 17-21 mm</b>	

\*resultados según ficha técnica del fabricante de ambos antibióticos (HIMEDIA®). Fuente: elaboración propia

Los datos mostrados en la Tabla N°6 y lo visualizado en la Figura N°17, respecto a la prueba con bacitracina, demuestran que tanto las muestras presuntivas como el control positivo son resistentes a dicho antibiótico, descartándose de esa forma, la posibilidad de que se trate de *S. pyogenes*. Con respecto a los resultados obtenidos para el antibiótico vancomicina las muestras RAE209-22, CPE609-22 y el control positivo demostraron sensibilidad esperada al antibiótico lo que indica que estas especies pertenecen al género *Streptococcus*, sin embargo, las muestras MVE2010-22 y ARE210-22 mostraron resistencia al antibiótico, debiéndose esta variable a que ambas muestras presuntivas son resistentes a este antibiótico, a un tiempo insuficiente en incubación o a la cantidad de inóculo utilizada ya que la suspensión fue estandarizada a  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

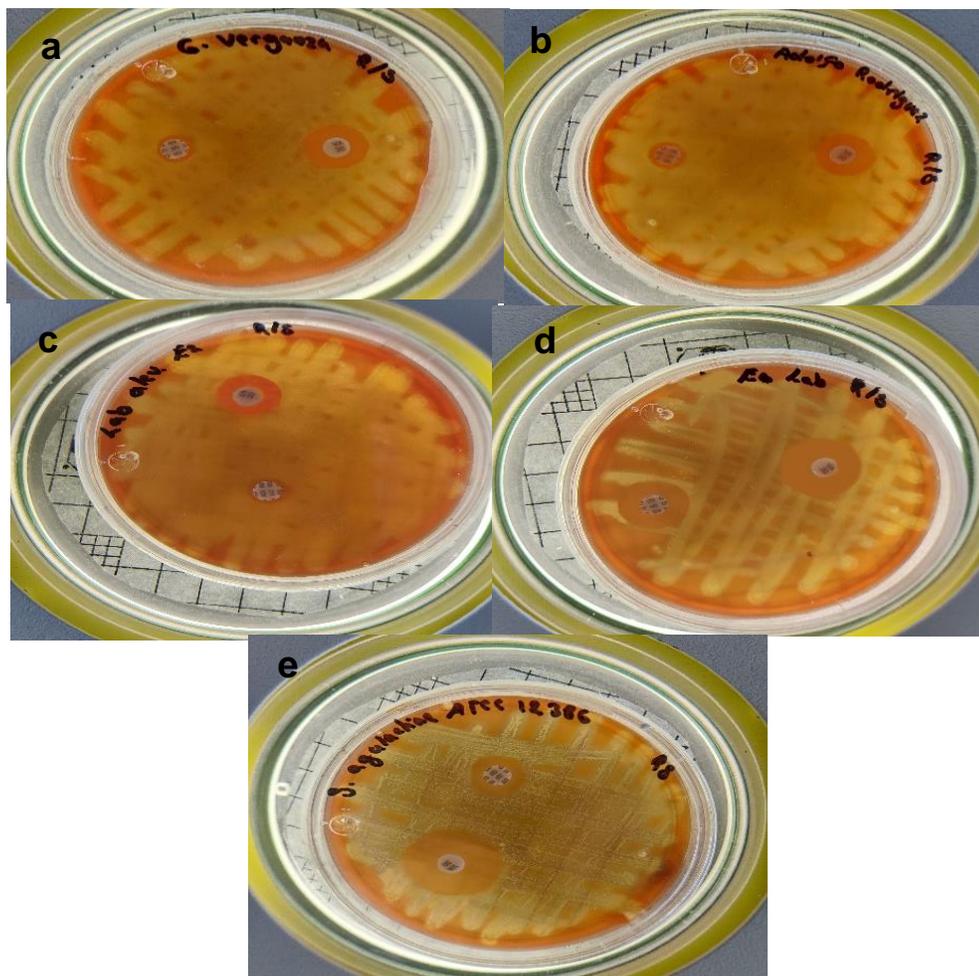


Figura N°17. Resultados prueba de sensibilidad/resistencia a antibióticos a) MVE210-22, b) ARE210-22, c) RAE209-22, d) CPE609-22 y e) control positivo. Fuente: elaboración propia

#### 5.1.3.4 Identificación mediante Microgen® Strep-ID

Tabla N°7. Resultados obtenidos en la identificación con Microgen® Strep-ID

muestra	Código octal generado	Porcentaje de similitud a <i>S. agalactiae</i>
MVE210-22	50111	99.98%
ARE210-22	50111	99.98%
RAE209-22	50111	99.98%
CPE609-22	50111	99.98%
Control positivo	50511	98.86%

Fuente: elaboración propia

Los resultados mostrados en la Figura N°18 indican que todas las muestras presuntivas más el control positivo fueron positivos a las reacciones enzimáticas específicas de: ácido de ribosa (RIB), fosfatasa (PHS) y arginina dihidrolasa (ARG); produciéndose el respectivo cambio de color que se comparó con la tabla de colores proporcionada por el fabricante (Anexo N°13). Sólo el control positivo difirió en una reacción enzimática específica con respecto a las demás, la cual se trataba de la reacción del ácido de lactosa (LAC).

Los resultados obtenidos de esta prueba, junto a la presencia de hemólisis beta de las colonias aisladas y la prueba de hipurato positivas (Figura N°19), fueron utilizados para generar un código octal, el cual fue introducido en el software del fabricante para generar un informe (ver Anexo N°26) donde se especifican los porcentajes de similitud, tal y como se muestran en la Tabla N°7.



Figura N°18. Resultado de las reacciones del kit Microgen® Strep-ID a) ARE210-22, b) MVE210-22, c) control positivo, d) RAE209-22 y e) CPE609-22. Fuente: elaboración propia

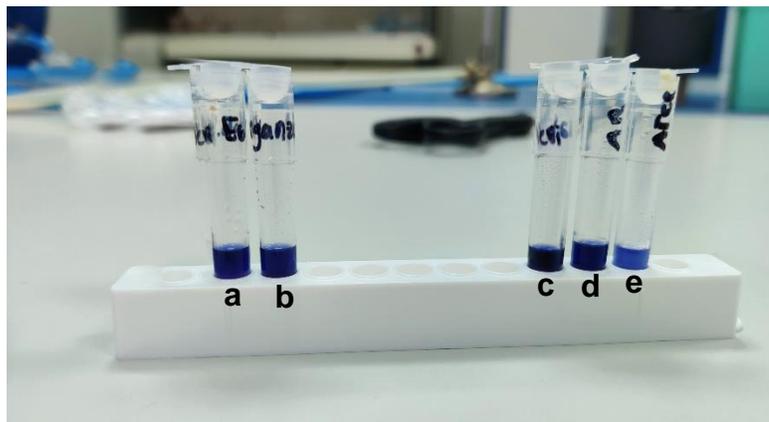


Figura N°19. Resultados de la hidrólisis del hipurato utilizando revelador de ninhidrina al 3% a) CPE609-22, b) MVE210-22, c) RAE209-22, d) ARE210-22 y e) control positivo-22. Fuente: elaboración propia

#### 5.1.3.5 Casos positivos a *Streptococcus agalactiae* en tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*)

Tabla N°8. Resultados finales para la identificación de las muestras presuntivas a *S. agalactiae*

Muestra	RAE209-22	CPE609-22	MVE210-22	ARE210-22	Control positivo
Fecha	26/09/2022	26/09/2022	3/10/2022	6/10/2022	N/A
Morfología macroscópica	Colonias puntiformes, color beige, presencia de beta hemólisis	Colonias puntiformes, color beige, presencia de beta hemólisis	Colonias puntiformes, color beige, presencia de beta hemólisis	Colonias puntiformes, color beige, presencia de beta hemólisis	Colonias puntiformes, color beige, presencia de beta hemólisis
Tinción de Gram	Cocos grampositivos, distribuidos en cadenas				
Prueba de CAMP	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Bacitracina 0.04 U	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
Vancomicina 30 µg	Sensible	Sensible	Resistente	Resistente	Sensible
Resultados Microgen® Strep-ID	99.98% similar a <i>S.agalactiae</i>	98.86% similar a <i>S.agalactiae</i>			
Hidrólisis del hipurato	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Dictamen	Positivo a <i>S.agalactiae</i>	Positivo a <i>S.agalactiae</i>	Positivo a <i>S.agalactiae</i>	Positivo a <i>S.agalactiae</i>	N/A

Fuente: elaboración propia

Lo mostrado en la Tabla N°8 reflejan los resultados finales de todas las pruebas de identificación realizadas a las cuatro muestras presuntivas a *S. agalactiae* encontradas en órganos de tilapias. Los resultados muestran que las muestras MVE210-22 y ARE210-22 difieren en dos pruebas (prueba de CAMP y resistencia a la vancomicina) respecto a las demás, sin embargo, pruebas con mayor sensibilidad y selectividad como la identificación bioquímica mediante el kit Microgen Strep-ID, la hidrólisis del hipurato; además de las características microscópicas y macroscópicas de las muestras presuntivas, permiten identificar a las cuatro muestras aisladas en este estudio como *S. agalactiae*.

## **5.2 Evaluación de los parámetros fisicoquímicos al agua de cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*)**

### 5.2.1 Evaluaciones fisicoquímicas al agua de cultivo

Todos los resultados de las evaluaciones fisicoquímicas corresponden a los datos que fueron recopilados durante todo el muestreo en los instrumentos de recolección (Anexos N°27 y N°28), asimismo los rangos y valores óptimos que se utilizaron de referencia para el cumplimiento y no cumplimiento de las evaluaciones fisicoquímicas corresponden al manual de manejo del cultivo de tilapias de Saavedra-Martínez <sup>(1)</sup>, a excepción de la temperatura, el pH y la concentración de iones nitrato donde se evaluaron criterios extras.

#### 5.2.1.1 Oxígeno disuelto

Los resultados mostrados en la Figura N°20 corresponden a las mediciones de oxígeno disuelto en los estanques muestreados, en donde sólo un 38.5 % de los estanques se encontró dentro del cumplimiento al rango óptimo. De acuerdo a lo expuesto por Amal y Zamri <sup>(29)</sup>, se sabe que las altas densidades de fitoplancton, de siembra de alevines y altas temperaturas (superiores a los 30°C) del agua, conduce a una mayor tasa de consumo de oxígeno, esto en consecuencia reduce

su concentración lo que conlleva a causar problemas en el crecimiento y reducir la resistencia a enfermedades en las tilapias. Esto concuerda con los resultados de esta investigación ya que las mediciones de temperatura de los estanques, obtuvieron un promedio superior a los 30°C lo que pudo haber afectado significativamente a las concentraciones de oxígeno disuelto, por lo que se sugiere que la concentración de oxígeno disuelto no se encuentra en condiciones óptimas en estos estanques.

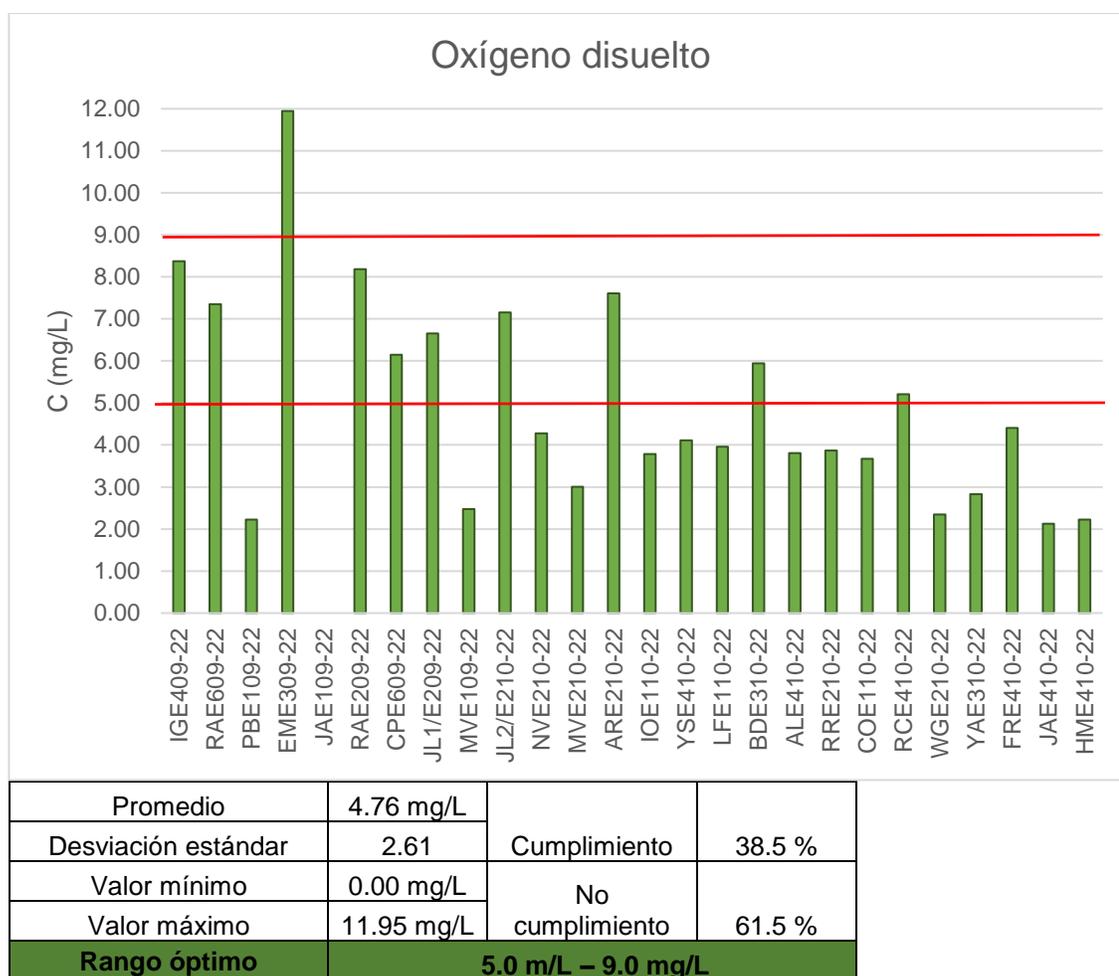


Figura N°20. Evaluaciones de oxígeno disuelto en el agua de cultivo. Fuente: elaboración propia

### 5.2.1.2 pH

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura N°21, se visualiza una aparente uniformidad de los datos referentes al pH en los estanques muestreados, evidenciando que el 100% presentó cumplimiento al rango óptimo, sin embargo, al considerar la información proporcionada por el Informe de la Calidad de Agua de los Ríos (ICAR) en El Salvador <sup>(30)</sup>, en donde el valor límite máximo para pH es de 8.4, sólo se consiguió un porcentaje de cumplimiento del 30.78% de estos estanques, además de que los valores tienden a la alcalinidad, lo cual sugiere cierto nivel de alerta.

Se sabe que las variaciones de pH están muy relacionadas a la presencia del fitoplancton en los estanques, los cuales constituyen uno de los sistemas de amortiguación. Una sobrepoblación de fitoplancton conlleva a que se presenten una mayor utilización del CO<sub>2</sub> (disuelto en el agua) durante el día lo cual tiende a la alcalinidad de las aguas, asimismo un pH alcalino en las aguas provoca signos clínicos en los peces como secreción de moco, aletas desgastadas, daño ocular, natación errática y por supuesto, volver susceptible al pez a enfermedades. <sup>(31)</sup> Ante toda esta información, se sugiere que el pH en estos estanques no se encuentra en condiciones óptimas.

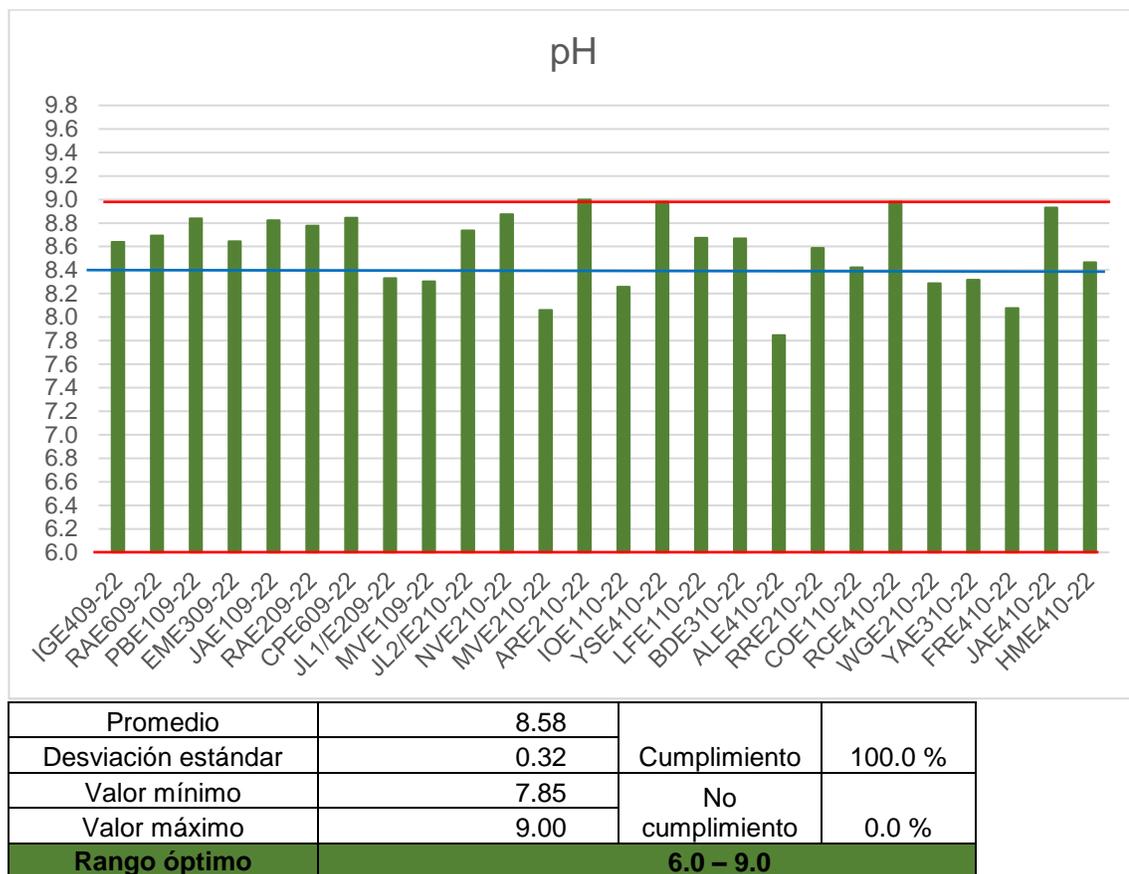


Figura N°21. Evaluaciones de pH en el agua de cultivo, línea roja representa rango óptimo, línea azul representa el valor del ICAR. Fuente: elaboración propia

### 5.2.1.3 Temperatura

Los datos visualizados en la Figura N°22, muestran las evaluaciones de temperatura del agua de cultivo en los estanques muestreados. Se observa cómo el 65.4 % de los estanques presentaron valores de temperaturas superiores al límite máximo de 30°C siendo este valor de temperatura, reportado por Nurul-Izzarul et al; <sup>(15)</sup> Sapugahawatte et al. <sup>(19)</sup> y Pei-Chi et al. <sup>(32)</sup> como una condición desfavorable en el agua de cultivo de peces. Además de los efectos de las altas temperaturas sobre la concentración del oxígeno disuelto, las altas temperatura también aumenta la actividad hemolítica de las tilapias lo que predispone a las infecciones bacterianas y es por ello, que se sugiere que la temperatura no se encuentra en condiciones óptimas en estos estanques.

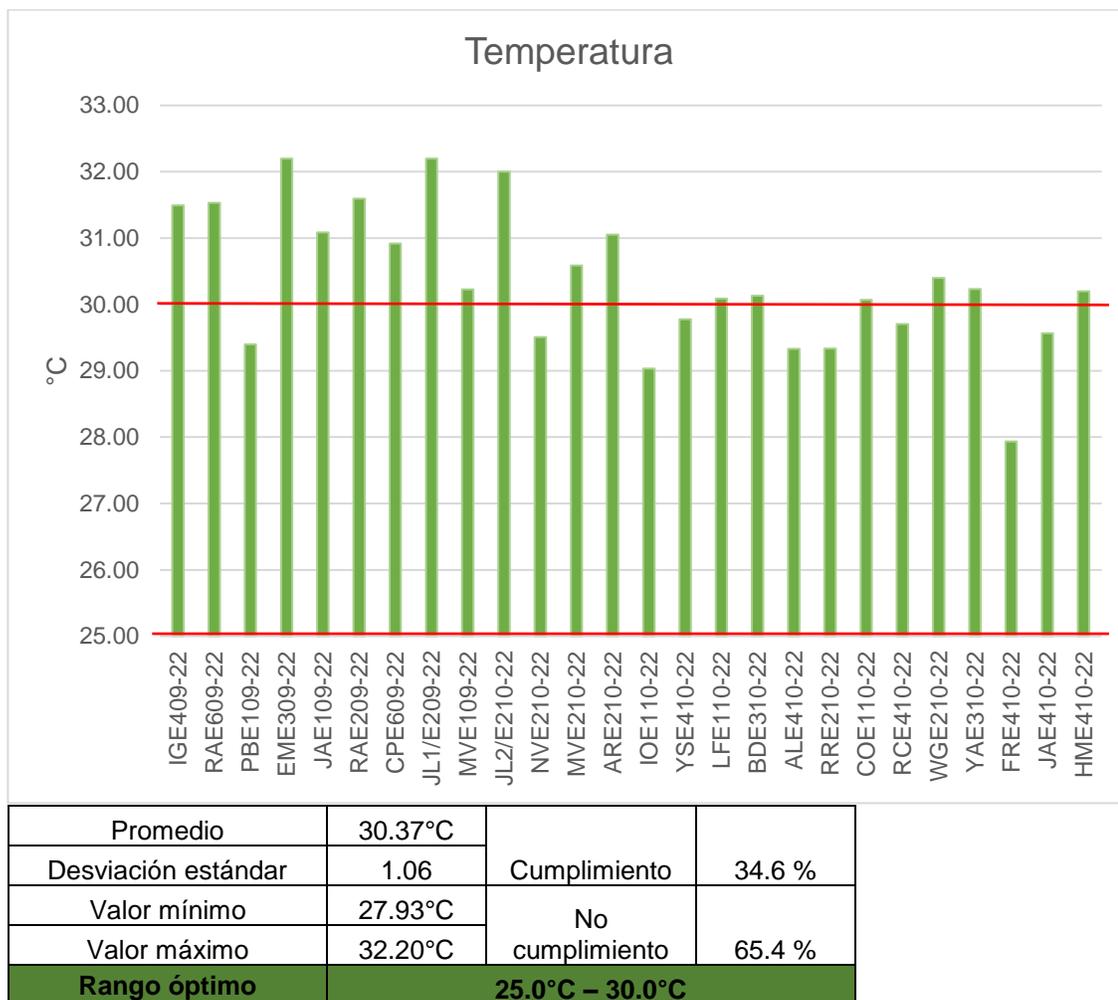


Figura N°22. Evaluaciones de temperatura en el agua de cultivo. Fuente: elaboración propia

#### 5.2.1.4 Alcalinidad y Dureza

Los resultados representados en la Figura N°23 corresponden a las evaluaciones de alcalinidad realizadas. Se puede visualizar como el 100 % de los estanques sobrepasaron el valor de 150.0 mg/L el cual corresponde al límite máximo del rango óptimo para el cultivo de tilapias. En el caso de los resultados de dureza presentados en la Figura N°24, Se observa también que el 100% de las evaluaciones se encontraron fuera del rango óptimo de 80 a 110 mg/L de dureza.

Se sabe que la alta alcalinidad y dureza de estas aguas tiene origen en su naturaleza no potable ya que son aguas de uso exclusivo para riego,

provenientes de ríos, sin embargo, es importante mencionar que tanto para el parámetro de alcalinidad como para la dureza, aún no existe evidencia de que altas concentraciones de dichos parámetros sean perjudiciales para los peces, de hecho, de acuerdo al estudio de Cavalcante et al <sup>(33)</sup>., una relación de dureza/alcalinidad mayor a 1 ( $CH/TA > 1$ ) resulta inofensiva para los peces ya que dichas aguas proveen de los minerales (calcio) esenciales para la osmorregulación, además de funcionar como otro sistema de amortiguación ante cambios bruscos de pH.

Al aplicar el criterio de Cavalcante et al <sup>(33)</sup>., a los valores promedios de dureza y alcalinidad de los 26 estanques, se obtiene un valor de 1.16 (270.62/232.95) por lo que se sugiere que la dureza y la alcalinidad se encuentran en condiciones que no representan un problema para la salud de los peces en estos estanques.

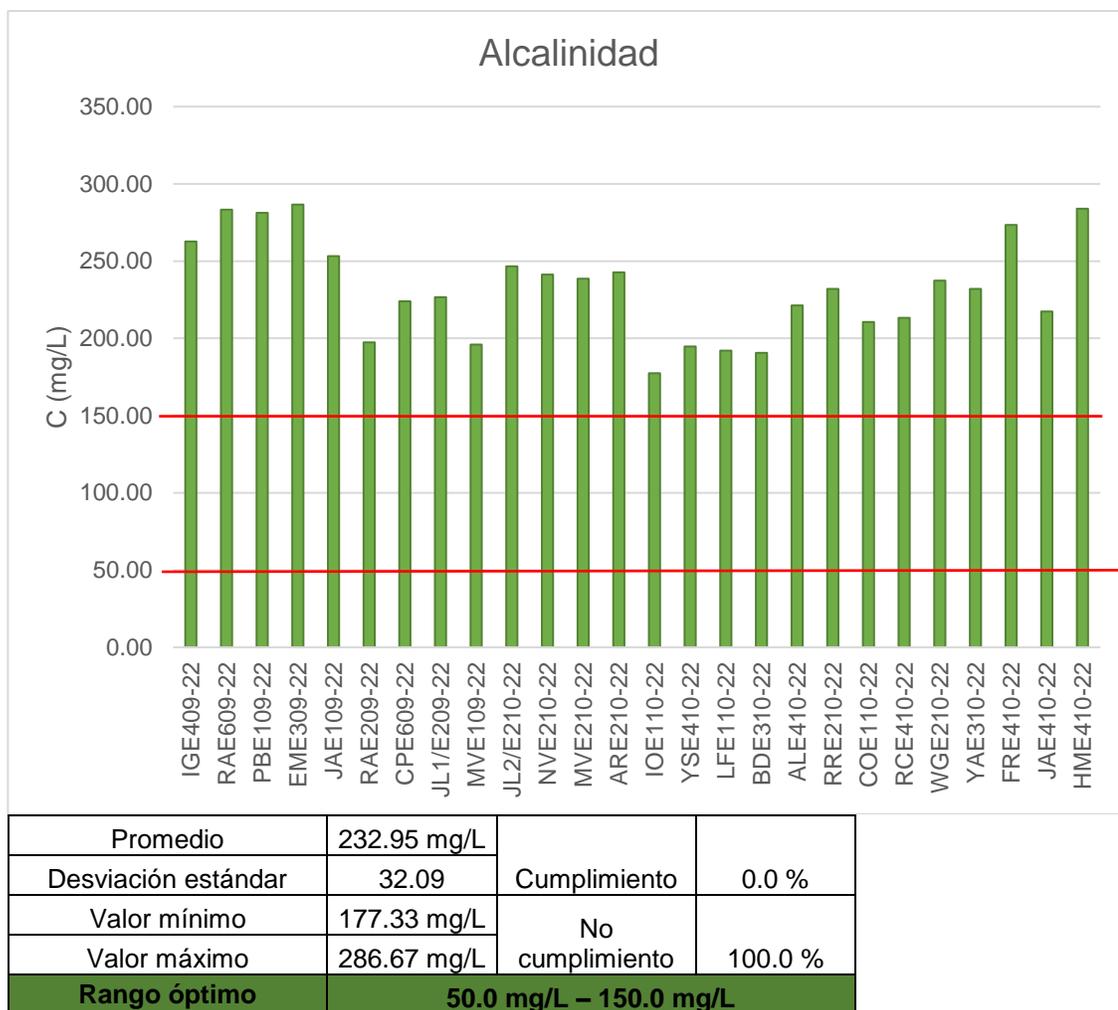


Figura N°23. Evaluaciones de la alcalinidad en el agua de cultivo. Fuente: elaboración propia

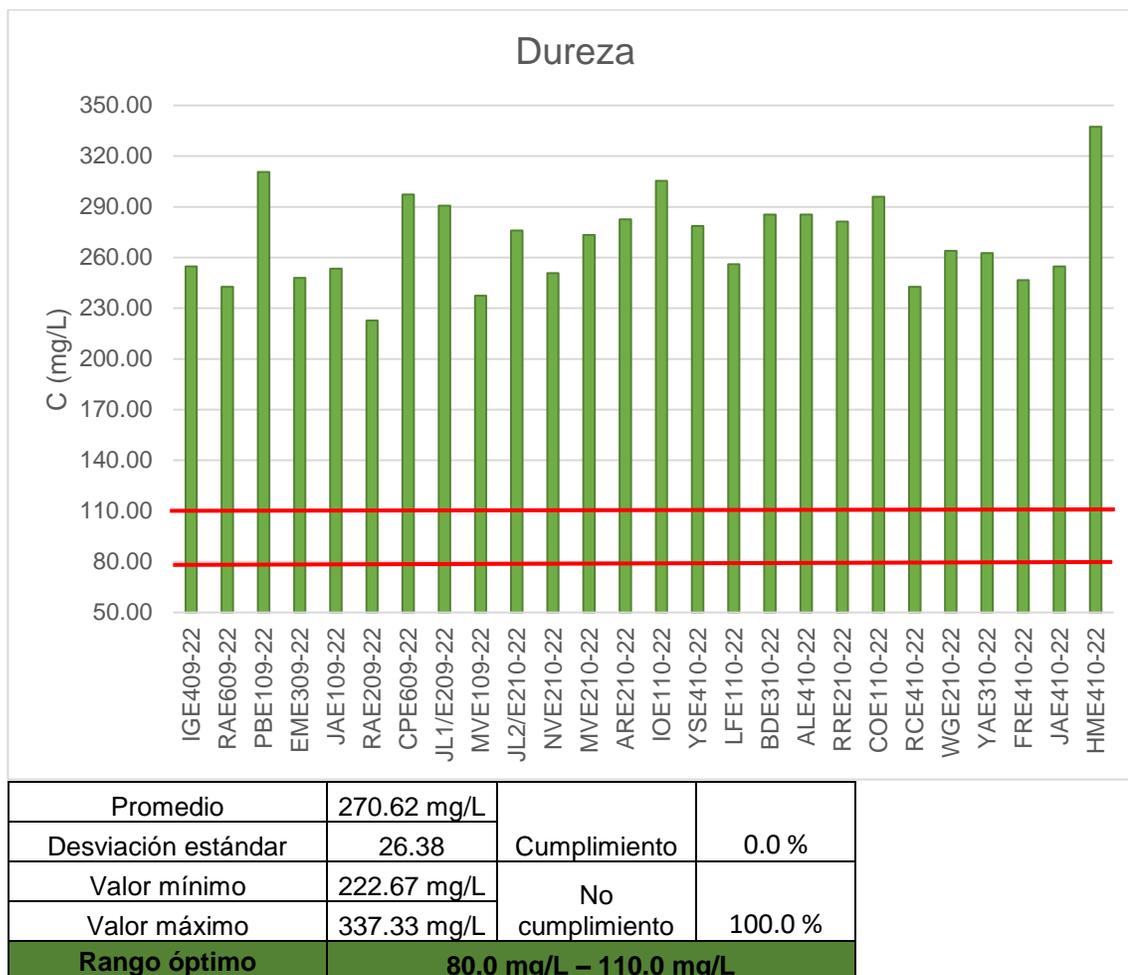


Figura N°24. Evaluaciones de la dureza en el agua de cultivo. Fuente: elaboración propia

#### 5.2.1.5 Concentración de iones nitrato

Se sabe que la concentración de nitratos en agua es inherente de ella, sin embargo un aumento en estas concentración se debe principalmente a la contaminación dispersa por el vertido de compuestos nitrogenados de origen industrial, agrario y urbano <sup>(14)</sup> y tal como se observa en la Figura N°25 los resultados obtenidos respecto a la concentración de iones nitrato en el agua de cultivo, demuestran que un 30.8% de los estanques muestreados se evaluaron fuera del cumplimiento al rango óptimo, sin embargo al realizar la comparación de los resultados frente al valor proporcionado por el Informe de la Calidad del

Agua de Ríos (ICAR), donde se indica que el agua debe poseer un valor menor o igual a 5 mg/L de iones nitrato, se logra un 100% del cumplimiento, sumado a ello, el estudio de Monsees et al <sup>(34)</sup>., demostró que concentraciones inferiores a 500 mg/L de iones nitrato no afectan negativamente el estado de salud de las tilapias, por ende, se sugiere que la concentración de iones nitratos se encuentra en condiciones que no representa un factor de estrés hacia los peces.

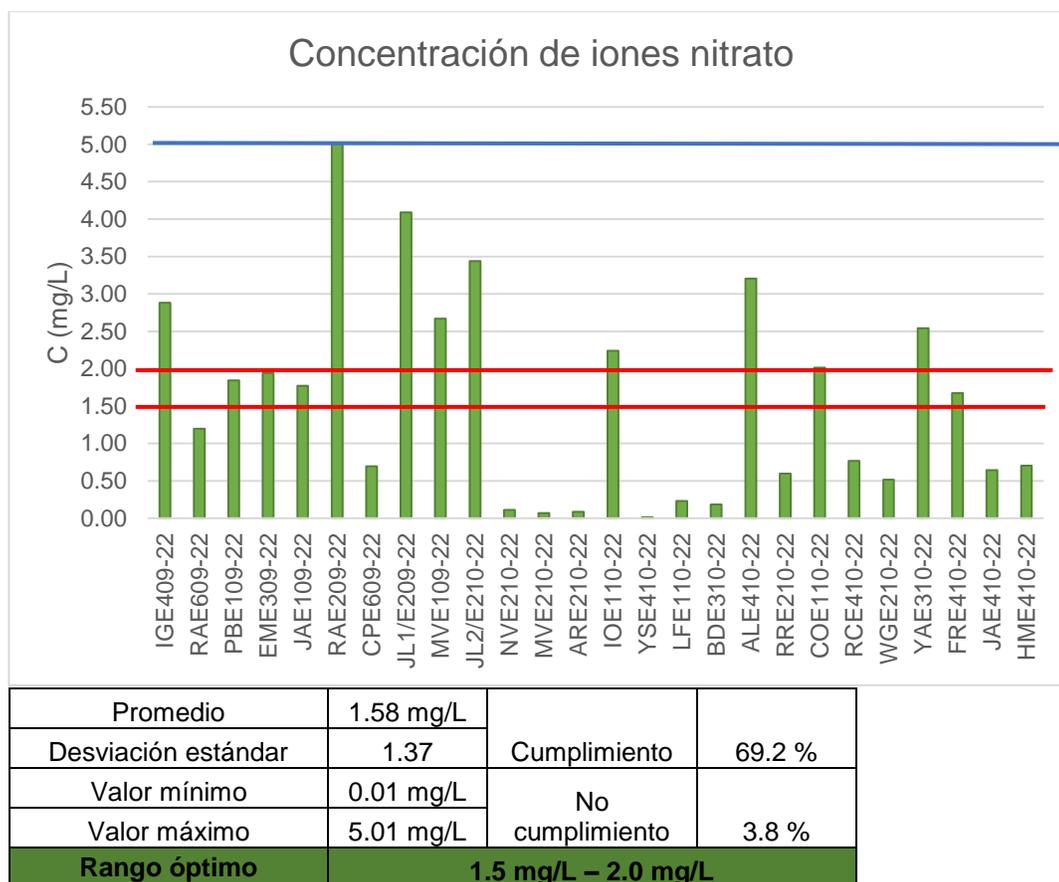


Figura N°25. Evaluaciones de las concentraciones de iones nitrato en el agua de cultivo, línea roja representa rango óptimo, línea azul representa al valor del ICAR óptimo. Fuente: elaboración propia

#### 5.2.1.6 Concentración de iones nitrato

Respecto a las concentraciones de iones nitrato, es importante mencionar que uno de los factores habituales en piscicultura que aumenta dicho parámetro, es el exceso de materia orgánica en el agua (por sobrealimentación de los peces)

lo que genera un aumento en los procesos de nitrificación, además de acuerdo a lo expuesto por Amal y Zamri <sup>(29)</sup>, respecto al nitrito, éste es altamente tóxico debido a que causa dificultad respiratoria en las tilapias, al interferir en el transporte de oxígeno por parte de la hemoglobina.

En lo que respecta a los resultados de esta investigación, la Figura N°26 muestra que un 96.1% de los estanques mostraron una concentración menor al valor óptimo de 0.1 mg/L, sólo siendo la excepción, un estanque que mostró una concentración de 0.2 mg/, ante esto, se sugiere que la concentración de iones nitrito se encuentra en condiciones óptimas en estos estanques (a excepción del estanque YAE310-22).

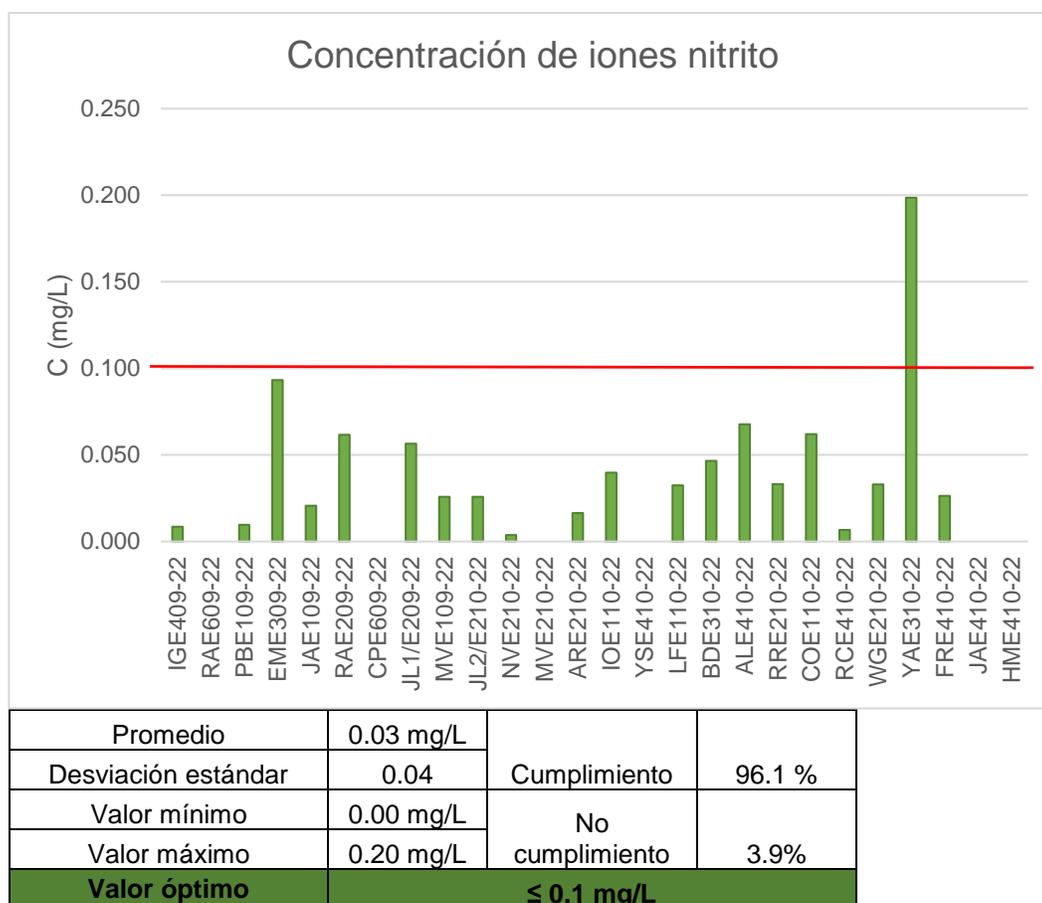


Figura N°26. Evaluaciones de las concentraciones de iones nitrito en el agua de cultivo. Fuente: elaboración propia

#### 5.2.1.7 Concentración de iones fosfato y amonio

La Figura N°27 muestra los resultados obtenidos referidos a las concentraciones de iones fosfato en los estanques muestreados. El 100% de ellos presentaron concentraciones de iones fosfato arriba del límite máximo de 0.2 mg/L, encontrándose valores tan elevados de hasta 4.90 mg/L en una granja; mientras que, para el caso de la concentración de amonio, la Figura N°28 muestra que sólo un 23.1% de los estanques cumplieron con las concentraciones de amonio inferiores o iguales a 0.1 mg/L.

La explicación para las elevadas concentraciones de dichos parámetros se basa en las investigaciones de Bueno et al <sup>(35)</sup>., y Félix-Cuenca et al <sup>(36)</sup>., quienes exponen que los aumentos en dichos parámetros se deben a factores como: la frecuencia y la cantidad de alimento que se entrega a los peces, la tasa de conversión alimenticia y las escorrentías que arrastran los fertilizantes al sistema de riego; lo que finalmente produce la degradación de la calidad del agua por eutrofización, conllevando a la muerte de los peces por hipoxia. Ante todo, esto y de acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que tanto la concentración de iones fosfato como la de amonio, no se encuentran en condiciones óptimas en estos estanques.

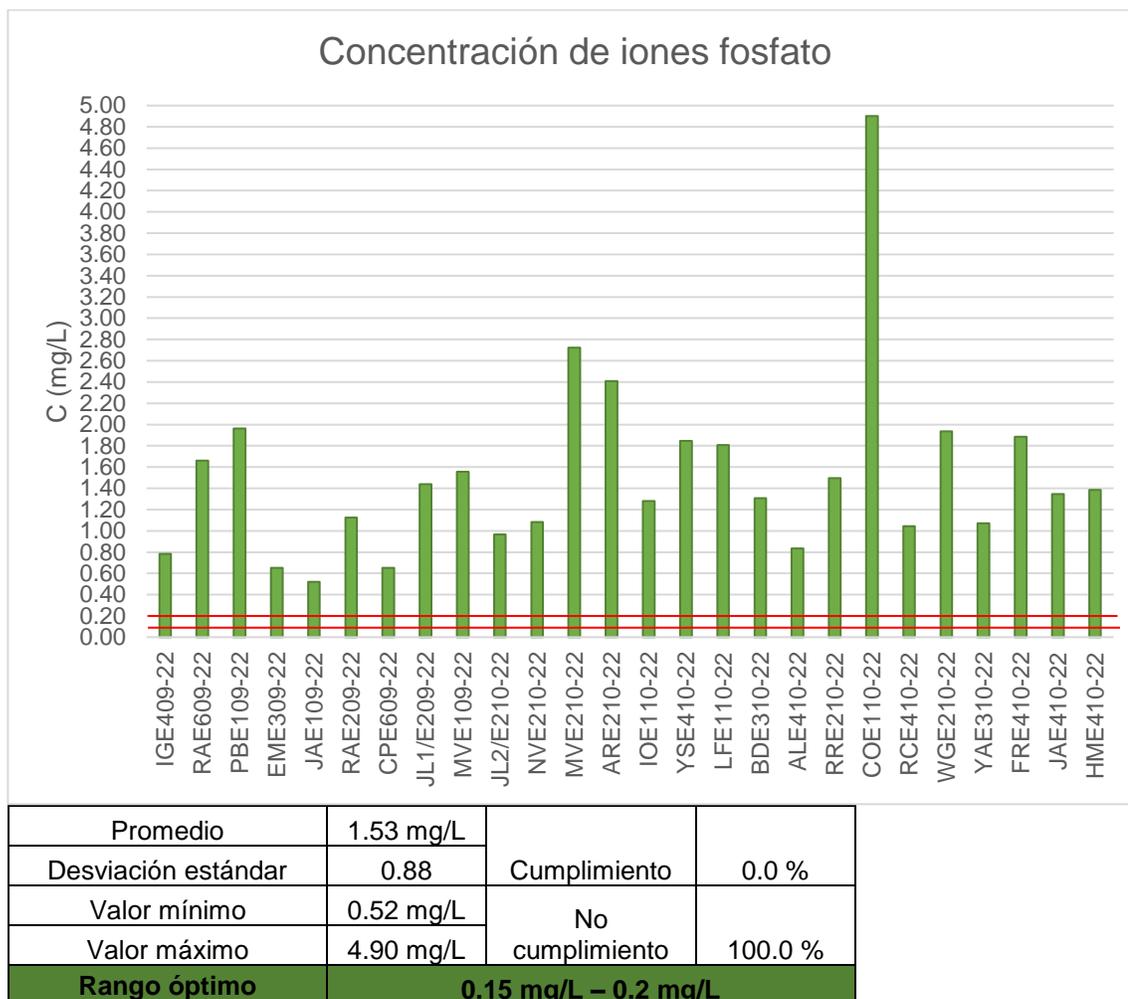


Figura N°27. Evaluaciones de las concentraciones de iones fosfato en el agua de cultivo. Fuente: elaboración propia

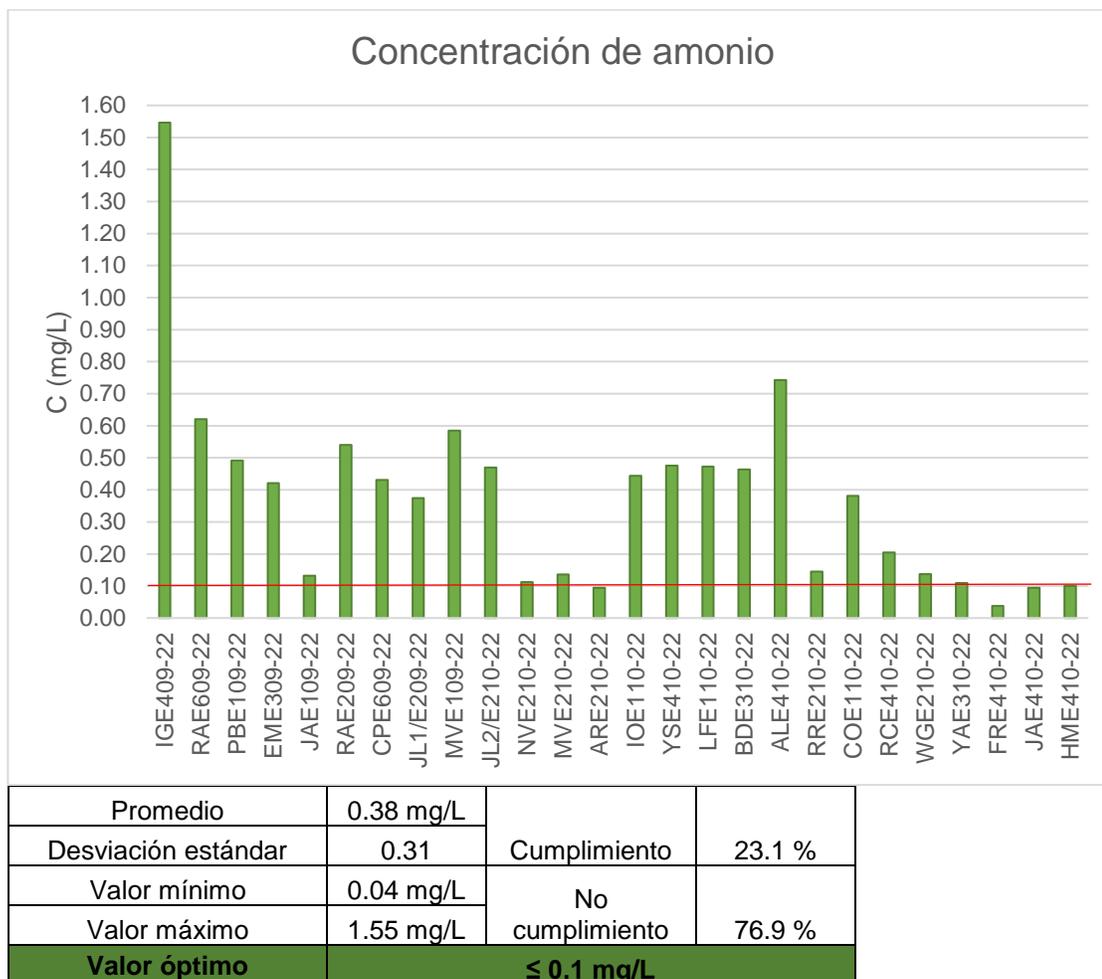


Figura N°28. Evaluaciones de las concentraciones de amonio en agua de cultivo. Fuente: elaboración propia

### 5.2.2 Evaluaciones fisicoquímicas al agua de cultivo en función a los casos positivos de *Streptococcus agalactiae*

Para poder establecer una asociación entre los parámetros fisicoquímicos del agua de estanque, causantes de estrés en las tilapias, con los casos positivos a *S. agalactiae*, es importante mencionar que tres de las granjas que resultaron positivas (RAE209-22, MVE210-22 y ARE210-22), se ubican dentro del Cantón Las Pavas en San Pablo Tacachico y cuyo recurso hídrico principal corresponde al Río Lempa, mientras que la granja CPE609-22 se encuentra ubicada dentro del

Cantón Atiocoyo, siendo su suministro hídrico el tramo del canal RSL3 el cual deriva del Río Sucio (ver Anexo N°29). Esta información, además de permitirnos asociar las variables en este estudio, nos permite establecer un antecedente sobre una posible vinculación de la calidad del agua proveniente del Río Lempa con la presencia de *S. agalactiae*.

#### 5.2.2.1 Oxígeno disuelto, pH y temperatura

De acuerdo a lo visualizado en la Figura N°29 para el parámetro de oxígeno disuelto, se observa como el estanque MV210-22 mostró niveles muy por debajo del valor óptimo mínimo de 5.0 mg/L por lo que, bajo estas condiciones, se considera que la baja concentración de oxígeno disuelto es un factor de estrés para las tilapias que se cultivan en ese estanque.

En el caso del parámetro de pH, al utilizar el valor máximo óptimo de 8.4, referido por el Informe de la Calidad de Aguas de Ríos (ICAR) <sup>(30)</sup>, se observa que los estanques RAE209-22, CPE609-22 y ARE210-22 no mostraron mediciones en condiciones óptimas respecto a dicho parámetro ya que se encuentran por encima del valor de 8.4, por lo que, en estos estanques, el pH alcalino se considera un factor de estrés para estas tilapias. Finalmente, para el parámetro de temperatura, se evidencia que todas las evaluaciones se encontraron por encima del valor máximo óptimo que corresponde a los 30°C, por lo que también se considera que las altas temperaturas del agua son otro factor de estrés en estos estanques.

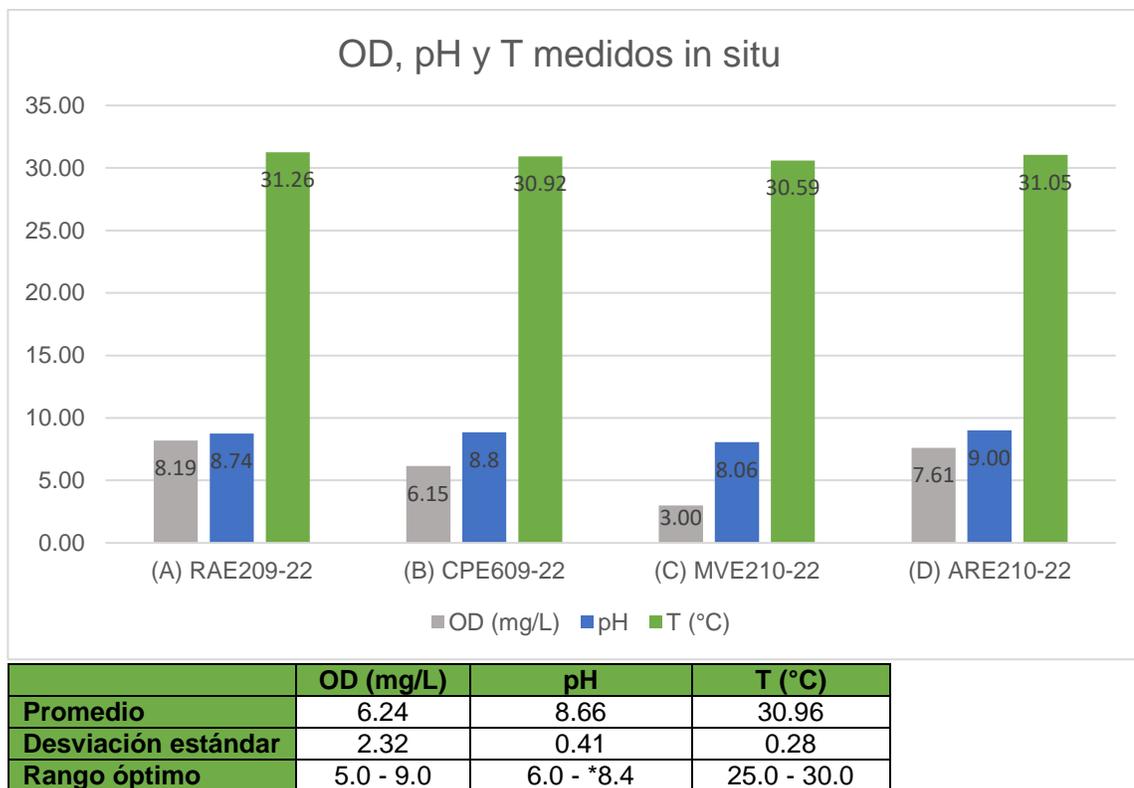


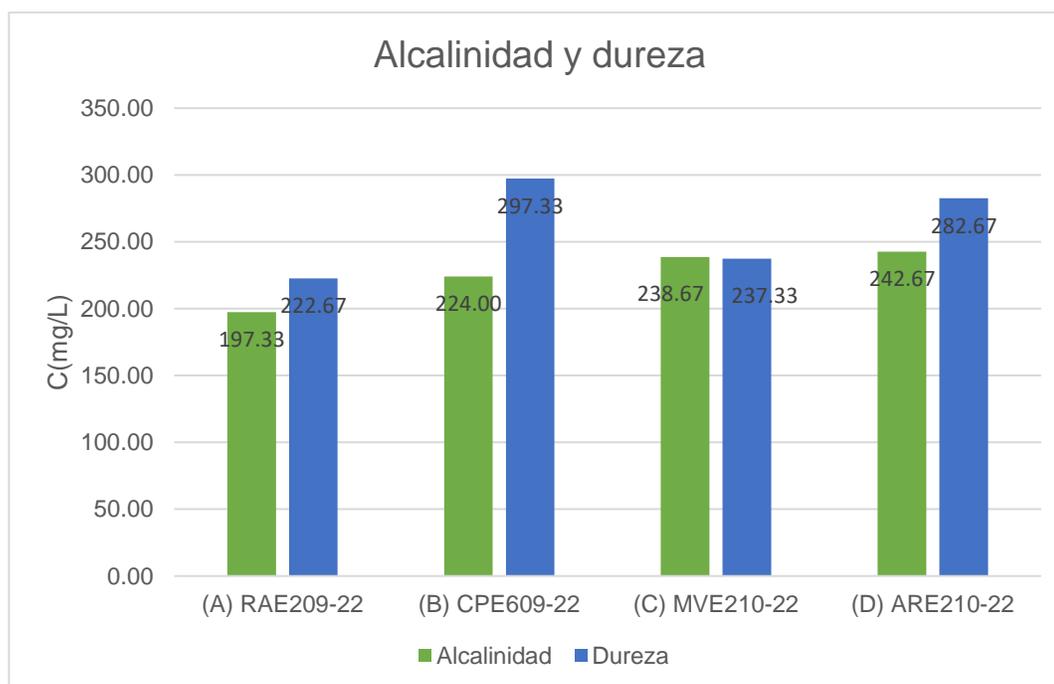
Figura N°29. Oxígeno disuelto (OD), pH y temperatura (T) en los estanques positivos a *S. agalactiae*, A) RAE209-22, B) CPE609-22, C) MVE210-22 y D) ARE210-22. \*valor referido de acuerdo al ICAR temperatura. Fuente: elaboración propia



Figura N°30. Evaluación de oxígeno disuelto, pH y temperatura in situ. Fuente: elaboración propia

### 5.2.2.2 Alcalinidad y Dureza

Según los datos mostrados en la Figura N°31, para el parámetro de alcalinidad, todos los estanques sobrepasaron el nivel máximo óptimo de 150 mg/L, ya sea si se evalúan los datos de forma individual o su promedio; el mismo caso sucedió con respecto al parámetro de dureza, donde todos los valores se encontraron arriba del límite máximo de 110 mg/L, sin embargo, en base a la investigación de Cavalcante et al. (33)., la relación de dureza/alcalinidad de estos estanques correspondió a un valor mayor a 1 ( $D/A \geq 1$ ) por lo que, esta relación no afectaría negativamente la salud de estos peces, por lo que bajo este criterio, las altas concentraciones de alcalinidad y dureza no se consideran factores de estrés para las tilapias cultivadas en estos estanques.



	Alcalinidad (mg/L)	Dureza(mg/L)
<b>Promedio</b>	225.67	260.00
<b>Desviación estándar</b>	20.53	35.66
<b>Rango óptimo</b>	50.0 - 150.0	80.0 - 110.0
<b>*Relación D/A</b>	(260.0/225.67) = 1.15	

Figura N°31. Alcalinidad y dureza en los estanques positivos a *S. agalactiae*, A) RAE209-22, B) CPE609-22, C) MVE210-22 y D) ARE210-22, \*de acuerdo a Cavalcante et al. (33).

Fuente: elaboración propia

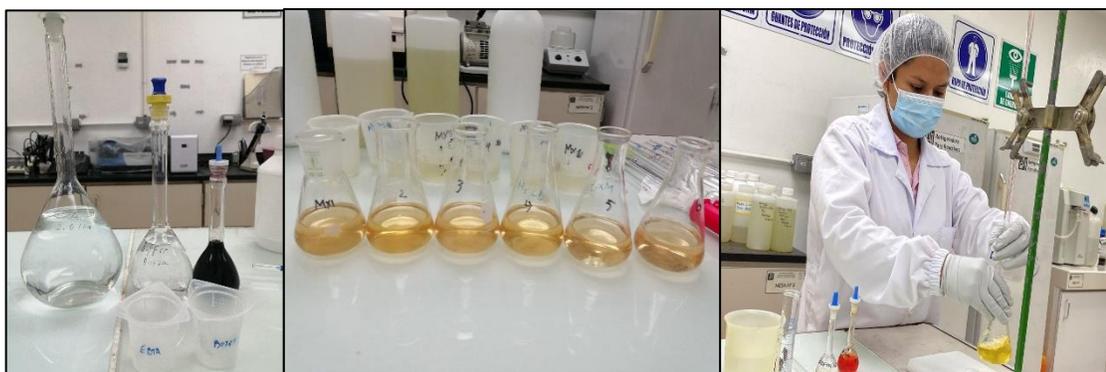


Figura N°32. Resultados del análisis volumétrico para determinar alcalinidad. Fuente: elaboración propia



Figura N°33. Resultados del análisis volumétrico para determinar dureza. Fuente: elaboración propia

### 5.2.2.3 Nitrito y fosfato

Respecto a las mediciones de iones nitrito, los datos que se reflejan en la Figura N°34 evidencian que la evaluación de dicho parámetro para el estanque RAE209-22 no se encontró dentro del rango óptimo para el cultivo de tilapias, si se considera el valor límite de 5.0 mg/L el cual es referido por el ICAR, sin embargo, dado al hecho de que la concentración en este estanque no supera los 10 mg/L, se considera que no afecta negativamente la salud de las tilapias de acuerdo a los estudios de Monsees et al <sup>(34)</sup>., por lo tanto la concentración de iones nitrito no se considera un factor de estrés en estos estanques.

Para el caso de la concentración de iones fosfato, tanto el valor promedio de las evaluaciones como sus valores individuales se encontraron por encima del valor máximo óptimo de 0.20 mg/L, por lo que se considera que la alta concentración de iones fosfato es un factor de estrés en estos estanques.

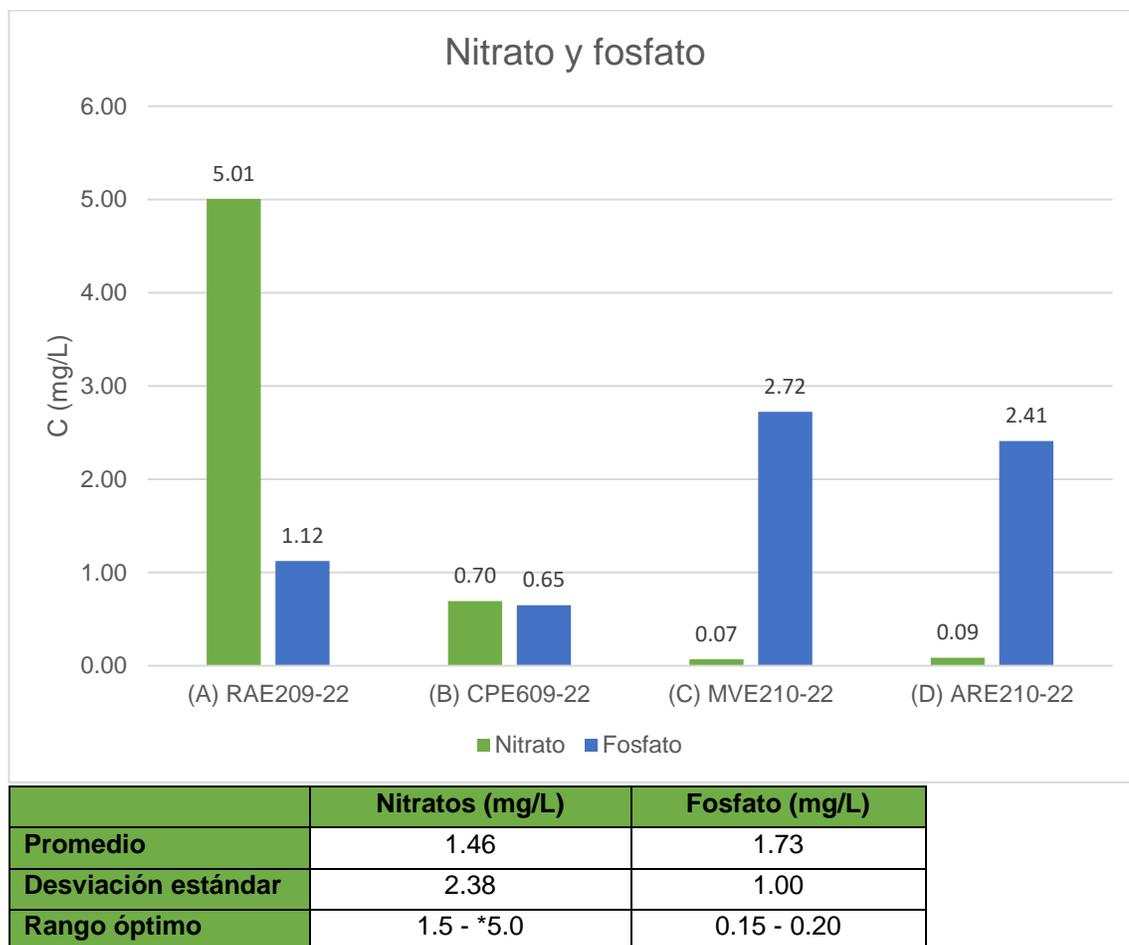


Figura N°34. Concentración de iones nitrato en los estanques positivos a *S. agalactiae*, A) RAE209-22, B) CPE609-22, C) MVE210-22 y D) ARE210-22. \*valor referido de acuerdo al ICAR. Fuente: elaboración propia

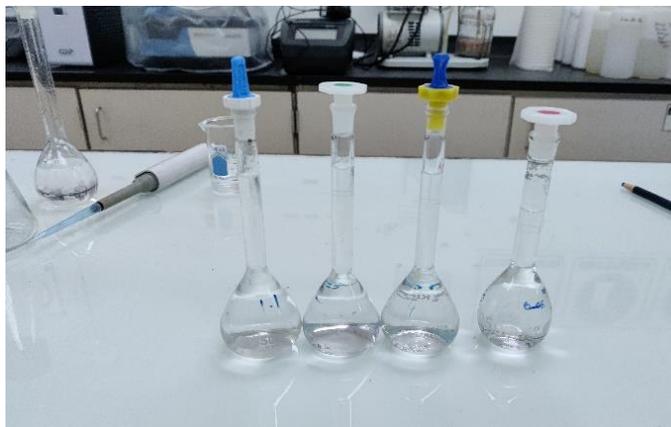


Figura N°35. Resultados del análisis espectrofotométrico para determinar iones nitrato. Fuente: elaboración propia

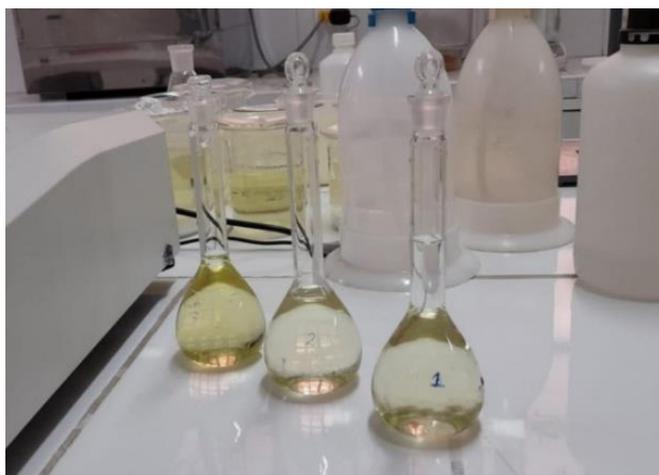


Figura N°36. Resultados del método colorimétrico para determinar iones fosfato. Fuente: elaboración propia

#### 5.2.2.4 Nitrito

Los datos presentados en la Figura N°37, sugieren que las evaluaciones de iones nitrito para las cuatro muestras, se encontraron dentro del rango óptimo para el cultivo de tilapias tanto en sus valores individuales como en su valor promedio, también es importante mencionar que las muestras correspondientes a los

estanques CPE609-22 y MVE210-22 mostraron concentraciones menores que el valor más bajo del estándar utilizado para la curva de calibración ( $< 0.01$  mg/L), por lo que se considera finalmente que las concentraciones de iones nitrito no son un factor de estrés en estos estanques de tilapias.

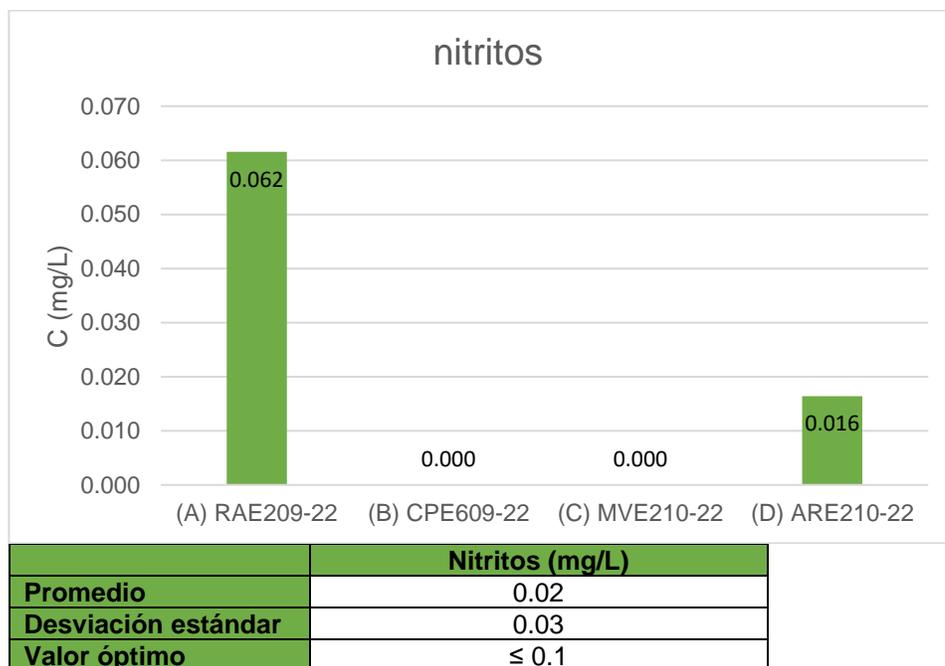


Figura N°37. Concentración de iones nitrito en los estanques positivos a *S. agalactiae*, A) RAE209-22, B) CPE609-22, C) MVE210-22 y D) ARE210-22. Fuente: elaboración propia

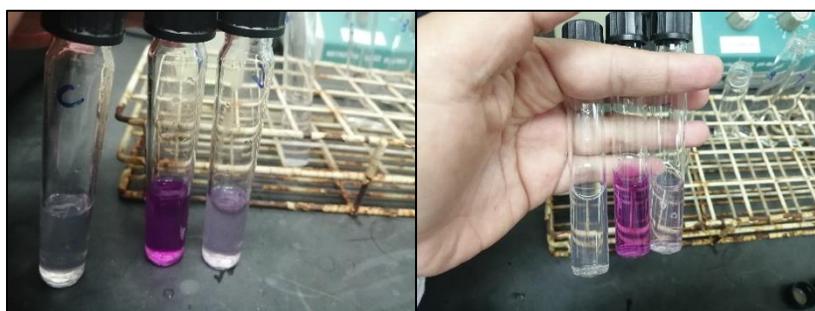


Figura N°38. Resultados del análisis fotométrico para determinar iones nitrito. Fuente: elaboración propia

### 5.2.2.5 Amonio

Los resultados mostrados en la Figura N°39, evidencian que sólo la concentración de amonio del estanque ARE210-22 se encontró por debajo del valor óptimo de 0.10 mg/L, aunque por una mínima diferencia; del mismo modo, las variables estadísticas sugieren que los datos se encuentran muy cercanos al valor que representa el promedio, por lo que en base a esto, se considera que la concentración de amonio es un factor de estrés en estos estanques.

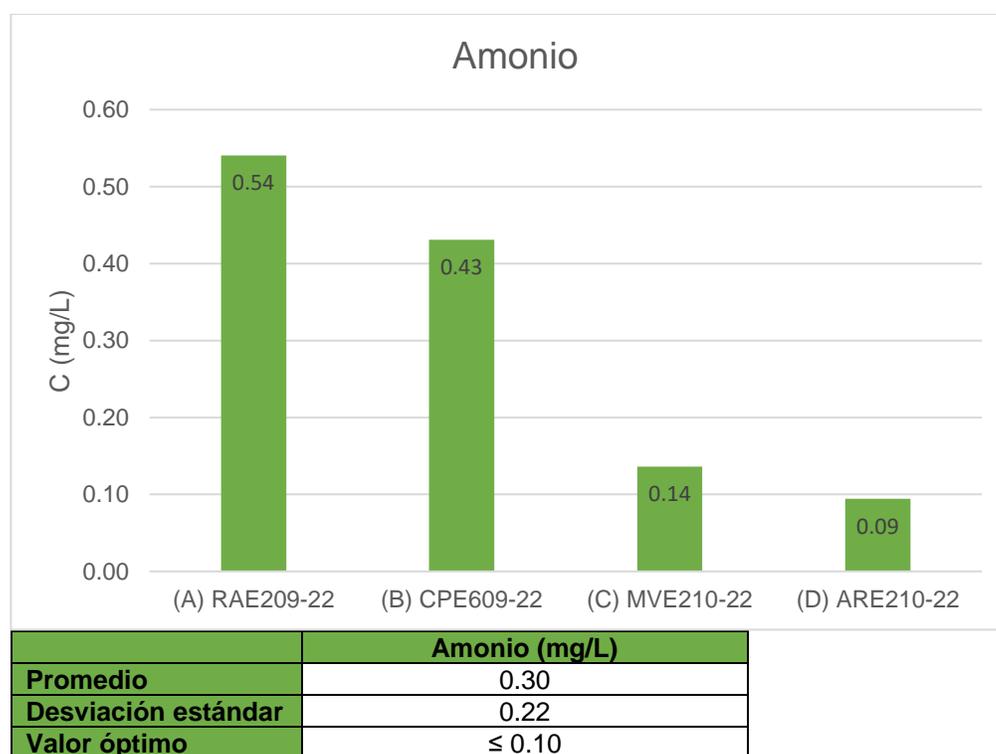


Figura N°39. Concentración de amonio en los estanques positivos a *S. agalactiae*, A) RAE209-22, B) CPE609-22, C) MVE210-22 y D) ARE210-22. Fuente: elaboración propia



Figura N°40. Resultados del análisis fotométrico para determinación de amonio. Fuente: elaboración propia

### 5.3 Correlación de los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo con la presencia de *Streptococcus agalactiae*

A continuación, se presentan todos los resultados referentes a la correlación de los parámetros fisicoquímicos del agua con la presencia de *S. agalactiae*. Es importante mencionar en este apartado, que las evaluaciones fisicoquímicas presentadas corresponden a los promedios de las granjas muestreadas por semana (6 semanas en total, de 4 a 5 granjas muestreadas por semana) y que la correlación realizada es en base al hecho de que las calidades desfavorables del agua de cultivo generan estrés en los peces, lo que afecta la respuesta inmune y aumenta la susceptibilidad al patógeno. (9), (29)

#### 5.3.1 Oxígeno disuelto y pH

Según los datos mostrados en la Figura N°41, se representan las variables de temperatura y pH frente a los casos positivos a *S. agalactiae*. Para el parámetro de pH, se observa que todas las mediciones superaron el límite máximo de 8.4 sin embargo, dicha información es insuficiente debido al número de aislamientos que se obtuvo, por lo que se concluye que la correlación entre el pH y la presencia de *S. agalactiae* es indeterminada. En lo que respecta a la variable de oxígeno

disuelto (OD) se observa como a partir de la segunda semana de muestreo, los valores obtenidos se encontraron por debajo del límite óptimo de 5.0 mg/L, a excepción de la tercera semana donde se evaluó un mínimo incremento hacia un valor de 5.17 mg/L. Dado el hecho de que las mediciones de oxígeno disuelto disminuyeron en las semanas donde se aislaron los casos positivos a *S. agalactiae*, se sugiere una correlación entre la baja concentración del oxígeno disuelto con la presencia de *S. agalactiae*.

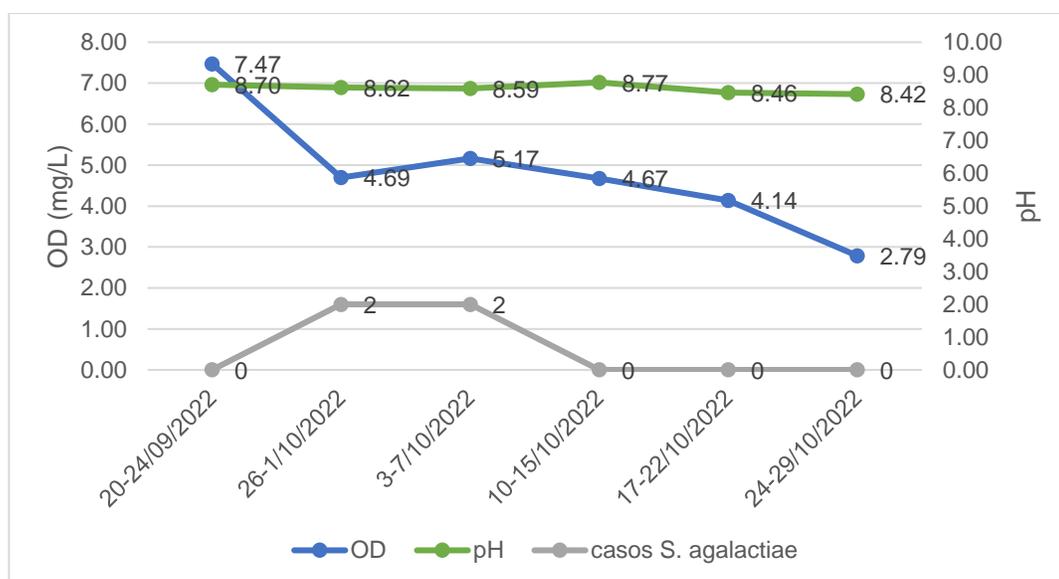


Figura N°41. Correlación entre las variables oxígeno disuelto (OD) y pH con la presencia de *S. agalactiae*. Fuente: elaboración propia

### 5.3.2 Temperatura y lluvia acumulada

De acuerdo a lo presentado en la Figura N°42, se asociaron las variables de temperatura y lluvia acumulada promedio frente a la presencia de *S. agalactiae*. En lo que respecta a la temperatura, las evaluaciones en las primeras tres semanas, se encontraron superando el límite máximo de 30.0 °C, lo que coincide con los aislamientos de la bacteria, luego, a partir de la cuarta semana de muestreo hasta el final, las temperaturas disminuyeron levemente sin

encontrarse más aislamientos, por lo que se sugiere una correlación entre la temperatura y la presencia de *S. agalactiae*.

En lo que respecta a la variable lluvia acumulada, los datos de las precipitaciones por hora fueron tomados y recopilados de los reportes diarios del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de El Salvador (MARN) para la Zona Central de país ([www.marn.gob.sv](http://www.marn.gob.sv)). Según la tendencia presentada, se registraron lluvias de moderada (2.1 – 15 mm/h) a fuerte intensidad (15.1 – 30 mm/h) durante todo el muestreo, registrando en la primera semana de muestreo, lluvias de 4.5 mm/h, para luego registrar una disminución de ellas (2.5 mm/h) en la segunda y tercera semana de muestreo, siendo ambas semanas donde se reportaron los casos de *S. agalactiae*.

En la cuarta semana de muestreo se registraron lluvias de fuerte intensidad (20 mm/h) pero sin el aislamiento exitoso de más casos positivos de *S. agalactiae*, para luego en la quinta semana tener otro descenso en las lluvias hasta 3 mm/h. Estos datos sugieren que la correlación entre la presencia de lluvias con la identificación de *S. agalactiae* es indeterminada para este estudio ya que, además, los valores de precipitaciones estuvieron por debajo de lo reportado por Sapugahawatte et al. <sup>(12)</sup> (>400 mm) y sin que se obtuvieran más casos positivos.

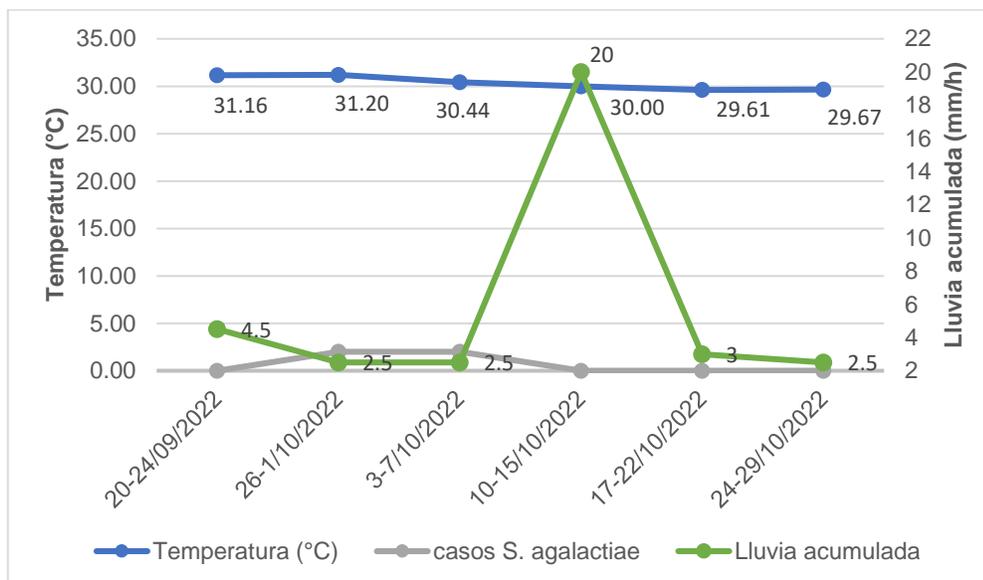


Figura N°42. Correlación entre las variables temperatura y lluvia acumulada con la presencia de *S. agalactiae*. Fuente: elaboración propia

### 5.3.3 Alcalinidad y dureza

La Figura N°43 muestra los datos relacionados a las variables de alcalinidad y dureza respecto a los casos positivos de *S. agalactiae*. En relación a la variable dureza, se observa como los valores incrementaron a partir de la segunda semana de muestreo, lo que coincidiendo con los aislamientos de *S. agalactiae*, y se mantuvieron así hasta el final del muestreo, también se evidencia que todos los valores de dureza reportados, duplicaron el valor máximo óptimo de 110 mg/L, mientras que para la variable de alcalinidad, los valores aumentaron, igualmente, a partir de la segunda semana de muestreo, y que además, todos los valores de alcalinidad reportados son superiores al valor máximo de 150 mg/L.

A pesar de que los datos de ambos parámetros sugieren correlación frente a la presencia de *S. agalactiae*, se concluye que ésta es indeterminada debido a que la información obtenida es insuficiente respecto a los casos positivos encontrados en esta investigación y también, por el hecho de que la relación dureza/alcalinidad fue mayor a 1, lo que sugiere que las altas concentraciones

de ambos parámetros resultan inofensivas para la salud de las tilapias a pesar de no estar en las condiciones óptimas, sin embargo para ambos casos es necesario realizar futuras investigaciones orientadas a estudiar esta situación en particular.

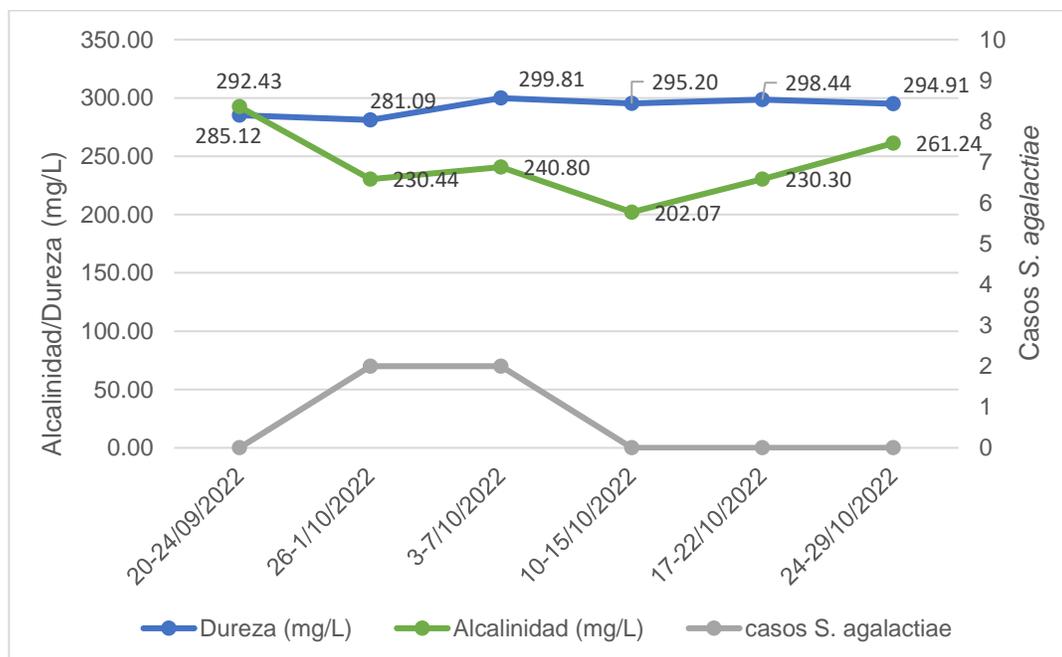


Figura N°43. Correlación entre las variables alcalinidad y dureza con la presencia de *S. agalactiae*. Fuente: elaboración propia

#### 5.3.4 Nitrato y fosfato

Los datos mostrados en la Figura N°44, reflejan primeramente la variable de iones nitrato frente a los casos positivos de *S. agalactiae*. La mayoría de los valores obtenidos estuvieron dentro del rango óptimo de 1.5 a 5.0 mg/L, siendo la excepción el valor de 0.14 mg/L obtenido en la cuarta semana, aunque no se identificaron más casos positivos en esa semana, por lo que se sugiere que no existe correlación entre la concentración de iones nitrato frente a la presencia de *S. agalactiae*.

Para la variable de iones fosfato, se observa que los valores aumentaron progresivamente a partir de la segunda semana, teniendo sólo una leve disminución al final del muestreo, además, todos los valores reportados se encuentran arriba del límite máximo óptimo de 0.2 mg/L por lo que, bajo este hecho, se sugiere una correlación entre la alta concentración de iones fosfato y la presencia de *S. agalactiae*.

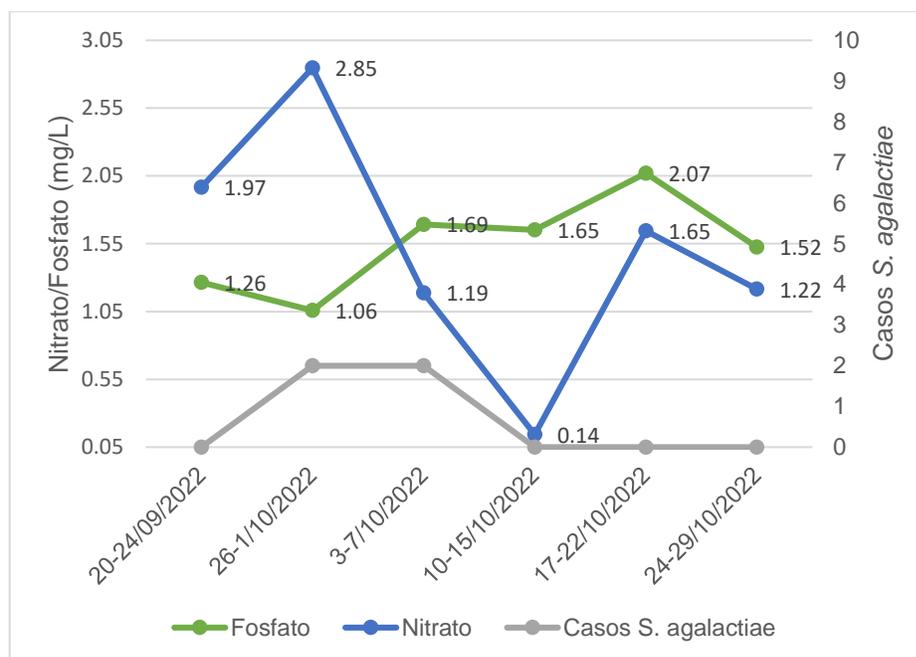


Figura N°44. Correlación entre las variables concentración de iones fosfato y nitrato con la presencia de *S. agalactiae*. Fuente: elaboración propia

### 5.3.5 Nitrito

Los datos reflejados en la Figura N°45 muestran las diferentes concentraciones de iones nitrito evaluadas durante las semanas de muestreo frente a los casos positivos de *S. agalactiae*. Se observa que los valores aumentan luego de la primera semana de muestreo, teniendo un descenso en la segunda semana de muestreo, que fue donde se aislaron los primeros casos positivos, para luego reportar otro aumento en los valores partir de la tercera semana de muestreo y

hasta el final de este, sin embargo todos los valores se encuentran inferiores al valor óptimo el cual corresponde a 0.10 mg/L de iones nitrito, por lo que se sugiere que no existe correlación entre la concentración de iones nitrito y la presencia de *S. agalactiae*.

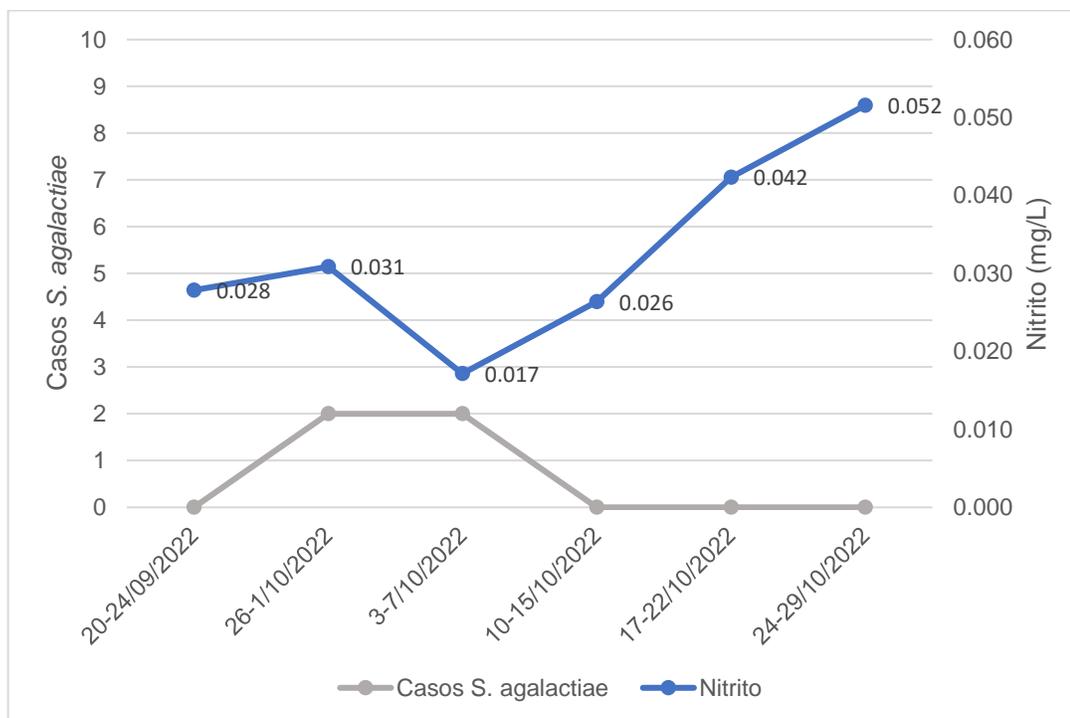


Figura N°45. Correlación entre la variable concentración de iones nitrito con la presencia de *S. agalactiae*. Fuente: elaboración propia

### 5.3.6 Amonio

Respecto a los resultados presentados en la Figura N°46, para la variable concentración de amonio se reportó una disminución de 0.77 mg/L en la primer semana hasta un valor de 0.25 mg/L en la tercera semana de muestreo y que coincide con los segundos aislamientos de la bacteria, luego en la última semana de muestreo se reportó el valor más bajo de todos que corresponde a 0.1 mg/L el cual es el único que se considera dentro de las condiciones óptimas. Debido a los valores de amonio tan dispersos obtenidos y al hecho de según lo reportado por Alicorp en su manual de cultivo de tilapia (Nicovita) <sup>(14)</sup> “niveles cercanos a 2.0

mg/L de amonio total son considerados crítico, siendo también la toxicidad del amonio no ionizado influenciada por las variables de oxígeno disuelto, temperatura y pH” se concluye que la correlación entre la presencia de *S. agalactiae* y la concentración de amonio es indeterminada para este estudio.

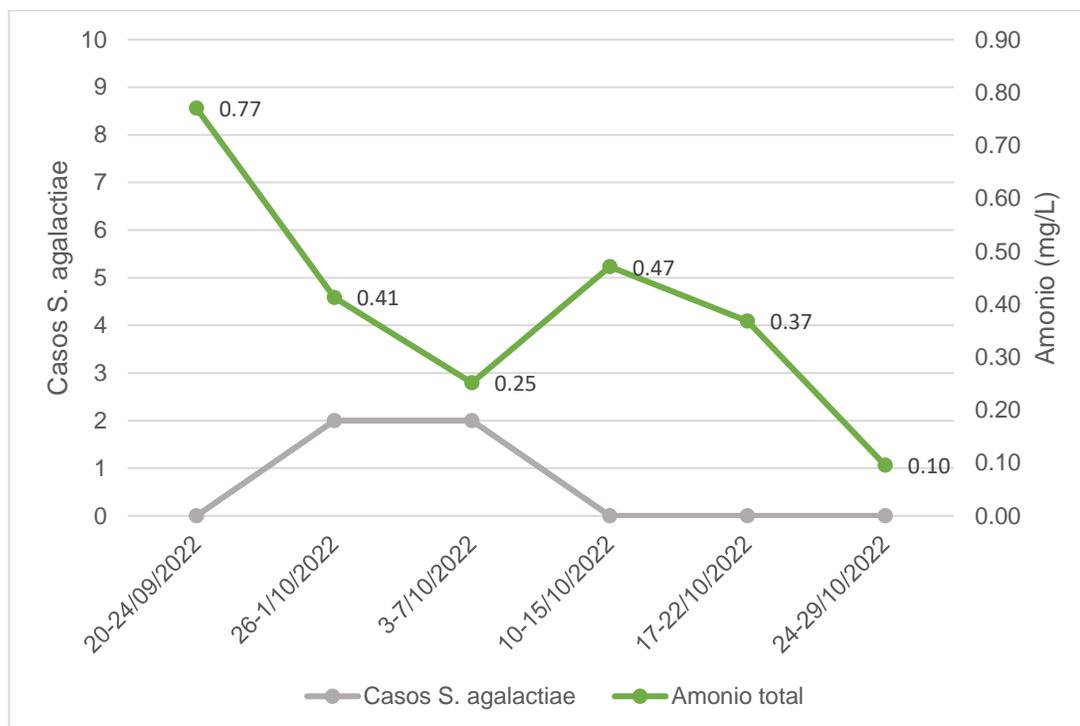


Figura N°46. Correlación entre la variable concentración de amonio con la presencia de *S. agalactiae*. Fuente: elaboración propia

Con base a todos los resultados de esta investigación respecto a las evaluaciones fisicoquímicas del agua de cultivo y su influencia como factores de estrés que afectan la salud de las tilapias y predisponen a la infección por *S. agalactiae*, se sugiere que los parámetros que se vinculan a este hecho son la temperatura y la concentración de iones fosfatos. Para el caso de la temperatura, se obtuvieron valores superiores a los 30°C, los cuales son consistentes a los reportes que han demostrado una fuerte correlacionan con la infección por estreptococosis. Las altas temperaturas tienen diversos efectos sobre otras variables como la reducción del oxígeno disuelto durante el día, el aumento en

su consumo por parte de los peces, el aumento de la actividad hemolítica que predispone a facilitar la infección y las intoxicaciones por amonio y nitritos, y además de que muchos factores de virulencia se sobre expresan a altas temperaturas. <sup>(16), (32)</sup>

Para el caso de la concentración de iones fosfatos, los valores obtenidos para esta investigación superan los 0.2 mg/L, el cual concuerda con lo reportado como exceso de este elemento en los sistemas de acuicultura, ya sea por la actividad agrícola, industrial o por la actividad metabólica de los propios peces. Un exceso de fosfatos conlleva a la eutrofización del sistema de riego, produciendo una mayor demanda bioquímica de oxígeno que a su vez disminuye el oxígeno disponible y que finalmente produce el deterioro en la salud de los peces. <sup>(35)</sup>

Finalmente, se expone la necesidad de orientar a la evaluación de la calidad del agua de forma exhaustiva y así poder establecer medidas que busquen la resolución del problema relacionada a las altas mortalidades en tilapias, como puede ser la implementación de sistemas de ventilación/aireación en los estanques para controlar la temperatura, así como también la adición de caliza y el recambio frecuente del agua para la eliminación del exceso de fosfatos <sup>(14)</sup>; sin embargo también se expresa la necesidad de continuar la problemática con futuras investigaciones que puedan ofrecer mayor información respecto al respecto.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 Conclusiones

1. Se aislaron e identificaron cuatro muestras de *Streptococcus agalactiae* en muestras de tilapia fresca, fenotípicamente similares al control positivo en pruebas como la tinción de Gram, prueba de sensibilidad/resistencia a antibióticos y el uso del kit Microgen® Strep-ID.
2. No fue posible la identificación de *Streptococcus agalactiae* a partir de las muestras de agua de cultivo debido a la ausencia de crecimientos característicos de la bacteria en los medios de cultivo utilizado para tal fin.
3. Los parámetros fisicoquímicos de oxígeno disuelto, pH, temperatura, concentración de iones fosfato y amonio se encontraron fuera del rango óptimo para el cultivo de tilapias en alrededor del 70% de los estanques muestreados.
4. En los cuatro estanques donde se logró aislar *Streptococcus agalactiae*, se encontraron altos valores de pH, temperatura, concentración de iones fosfato y amonio, los cuales se consideran potenciales factores de estrés para las tilapias que ahí se cultivan.
5. Los valores analizados en conjunto sugieren correlación entre las altas temperaturas y las altas concentraciones de iones fosfato con la presencia de *Streptococcus agalactiae* como factores estresantes que aumentan la susceptibilidad al patógeno.
6. La correlación entre la presencia de *Streptococcus agalactiae* con los niveles de pH, la presencia de lluvias, la alta alcalinidad y dureza, y la alta

concentración de amonio, resultó indeterminada para este estudio debido a que la información es insuficiente respecto al número de casos positivos de *Streptococcus agalactiae*.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 Recomendaciones

Al Ministerio del Medio Ambiente y Recurso Naturales, Ministerio de Agricultura y Ganadería, y la Asociación de Regantes de Atiocoyo Sur:

1. Que contemplen la posibilidad de implementar programas de gestión agrícolas y de desechos destinados a reducir la contaminación del sistema de riego hídrico del lugar.
2. Establecer procedimientos de monitoreo y evaluación de tendencias ante los casos tempranos de estreptococosis en las tilapias.
3. Que se desarrollen estrategias orientadas a la evaluación, monitoreo y mantenimiento de la calidad fisicoquímica del agua que se utiliza en acuicultura.

A futuras investigaciones:

4. Que se contemplen la posibilidad de utilizar un medio de enriquecimiento selectivo para *Streptococcus agalactiae* como lo son el caldo Todd-Hewitt suplementado y medios cromogénicos.
5. Que se dé seguimiento a los parámetros fisicoquímicos como indicadores de eutrofización del agua de cultivo, haciendo énfasis en aquellas condiciones relacionadas a la proliferación del patógeno y que puedan ser controladas para así, resolver de una mejor manera los casos de mortalidad en tilapias.

6. Que se desarrollen nuevas metodologías para evaluar la correlación de *Streptococcus agalactiae* con la calidad fisicoquímica del agua, asimismo el uso de técnicas moleculares para la identificación del patógeno.
7. Que se realicen nuevos estudios en donde se determine la presencia dicho patógeno en un tiempo más prologado de investigación, en diferentes épocas del año y con un mayor número de muestras de tilapia.

## Bibliografía

1. Saavedra-Martínez, M. Manejo del cultivo de tilapia [internet]. 2006 [Consultado 13 de abril de 2022]. Disponible en [http://repositorio.uca.edu.ni/2554/1/2006\\_manejo\\_del\\_cultivo\\_de\\_tilapia.pdf](http://repositorio.uca.edu.ni/2554/1/2006_manejo_del_cultivo_de_tilapia.pdf)
2. Alianza Campo, FUNPROVER, SAGARPA. Manual de producción de tilapias con especificaciones de calidad e inocuidad [internet].2010. [consultado 24 de abril de 2022]. 1(1). Disponible en: [https://www.academia.edu/26570361/Manual\\_de\\_Producci%C3%B3n\\_de\\_Tilapia\\_con\\_Especificaciones\\_de\\_Calidad\\_e\\_Inocuidad](https://www.academia.edu/26570361/Manual_de_Producci%C3%B3n_de_Tilapia_con_Especificaciones_de_Calidad_e_Inocuidad)
3. Ze Z, Jiangfeng L, Yuhui L, Mingiang H, Angen Y, Jie Z, Shun W. The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in tilapia [internet]. Microbial Pathogenesis. 2018 [Consultado 29 de marzo de 2022].39 (1). DOI: doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.053. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29859291/>
4. Ortega-Ascencio, Y. Enfermedades bacterianas de importancia en tilapias sp de cultivo [Pregrado]. 2011 [Consultado 29 de marzo de 2022]. 2-3, 50-53. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Disponible en: Enfermedades bacterianas de importancia en Tilapias sp. (*Oreochromis* sp) de cultivo (unmsm.edu.pe)
5. Vásquez-Machado, G. Caracterización morfológica de la adherencia e invasión de *Streptococcus agalactiae* a la mucosa intestinal de la tilapia *Oreochromis* sp., modelo in vitro [pregrado].2019 [Consultado 5 de abril de

- 2022]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Disponible en <http://bdigital.unal.edu.co/70593/2/GerssonM.V%C3%A1squezMachado.2019.pdf>
6. Microgen Bioproducts. Microgen ® strep-ID: instrucciones de uso [internet]. 2009. Microgen Bioproducts Ltd. WF6724/2009/02 [consultado 4 de julio de 2022]. Disponible en: [www.bioser.com/productos/microgen-strep-id-364p/](http://www.bioser.com/productos/microgen-strep-id-364p/)
  7. García-Osorio, G. Evaluación de las características fisicoquímicas del agua en la piscícola de Asonjuncal-Huila, asociados al ciclo de producción de la tilapia roja [Pregrado]. 2018 [consultado 11 de abril de 2022]. Neiva: Universidad Nacional Abierta y A Distancia. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/20945/gegarciao.pdf;jsessionid=E29A81DB4548130663A59F84B7113F17.jvm1?sequence=1>
  8. Hsien-Tsang S, Quintanilla M. Manual sobre reproducción y cultivo de tilapia [internet]. 2008 [Consultado 13 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.transparencia.gob.sv/institutions/mag/documents/119824/download>
  9. Oviedo-Bolaños K, Rodríguez-Rodríguez J, Sancho-Blanco C, et al. Molecular identification of *Streptococcus* sp and antibiotic resistance genes present in tilapia farms (*Oreochromis niloticus*) from the Northern Pacific region, Costa Rica. *Aquacult.* [internet]. 2021 [consultado 24 de marzo de 2022]. Int 29 (2337-2355). Disponible en [https://www.researchgate.net/figure/The-most-common-clinical-signs-compatible-with-streptococcosis-observed-in-tilapia\\_fig1\\_353437904](https://www.researchgate.net/figure/The-most-common-clinical-signs-compatible-with-streptococcosis-observed-in-tilapia_fig1_353437904).

10. Ze Z, Jiangfeng L, Yuhui L, Mingiang H, Angen Y, Jie Z, Shun W. The pathogenic and antimicrobial characteristics of an emerging *Streptococcus agalactiae* serotype IX in tilapia [internet]. Microbial Pathogenesis. 2018 [Consultado 29 de marzo de 2022]. 39 (1). DOI: doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.053. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29859291/>
11. Valenzuela R, Martínez P, Arévalo J. Evaluación preliminar de un sistema de recirculación de aguas para un prototipo implementado en la producción de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). Rev Cient Edit USCO. Ingeniería y Región. 2017 [consultado 18 de abril de 2022]. 18(2): doi: <https://doi.org/10.25054/22161325.1737>. Disponible en: <https://journalusco.edu.co/index.php/iregion/article/view/1737/2923>
12. Covarrubias-Bautista J, Ruiz-Velazco-Arce J. Calidad de agua para el cultivo de tilapia en tanques de geomembrana [Pregrado]. 2011 [Consultado 15 de abril de 2022]. Dirección de Fortalecimiento a la Investigación: Universidad Autónoma de Nayarit Disponible en: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/2.pdf>
13. MAG, CENDEPESCA, OSPESCA. Plan estratégico de acuicultura 2015-2020 [internet]. 2015 [consultado 7 de abril de 2022]. Disponible en: [https://www.mag.gob.sv/wpcontent/uploads/2021/06/2Politica\\_Nacional\\_de\\_Pesca\\_y\\_Acuicultura\\_2015\\_ULTIMA\\_VERSION-1.pdf](https://www.mag.gob.sv/wpcontent/uploads/2021/06/2Politica_Nacional_de_Pesca_y_Acuicultura_2015_ULTIMA_VERSION-1.pdf)
14. Industria Acuícola, Alicorp. Manual de crianza de tilapias, Nicovita [internet]. 2013 [Consultado 26 de abril de 2022]. 2(1). Disponible en: <http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Tilapia/Manual%20de%20crianza%20de%20tilapia.pdf>

15. Nurul I., Aliya I., Mohammad N., Azmai A., Shamarina S., Mohd-Zamri S., Siti Z. Associations of water quality and bacteria presence in cage cultured red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*. *Aquacult Reports* [internet]. 2016 [consultado 25 de marzo de 2022]. 4: doi <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.06.004>. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513416300540>.
16. Towers, L. Water quality: a priority for successful aquaculture. [Internet]. 2 de junio de 2015 [revisado 27 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://thefishsite.com/articles/water-quality-a-priority-for-successful-aquaculture>.
17. Ortíz-Castro A. Identificación y caracterización de patógenos bacterianos aislados de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivada en la prensa de El Gallo, Guerrero, México [Pregrado]. 2020 [consultado 26 de abril de 2022]. Michoacán: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Disponible en [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB\\_UMICH/2834/FB-M-20201202.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/2834/FB-M-20201202.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
18. FDA. Bacteriological analytical manual [internet]. 2018 [Consultado 9 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
19. Sapugahawatte D.N., Li C., Dharmaratne P, Zhu C., Yeoh Y.K., Yang J., Lo NWS, Wong K.T., Ip M. Prevalence and Characteristics of *Streptococcus agalactiae* from Freshwater Fish and Pork in Hong Kong Wet Markets. *Antibiotics*. [Internet]. 16 de marzo de 2022; 11(3):397. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030397>.

20. Romero-Monge M, Romero-Rivera M. Determinación del perfil bacteriológico de *Oreochromis niloticus* (tilapia) fresca y su respectiva agua de estanque proveniente del Cantón Atiocoyo, municipio de San Pablo Tacachico, La Libertad [Pregrado].2012 [consultado 20 de abril de 2022]. San Salvador: Universidad de El Salvador.
21. Koneman E, Wester A, Janda S, Schereckenberg P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Edit medic panam. 2006 [consultado 28 de abril de 2022]. 2006; 6(1): 634-662.
22. FDA. Bacteriological analytical manual [interne].2018 [Consultado 9 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
23. Koneman E, Wester A, Janda S, Schereckenberg P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Edit medic panam. 2006 [consultado 28 de abril de 2022]. 2006; 6(1): 634-662.
24. Microgen Bioproducts. Microgen<sup>®</sup> strep-ID: instrucciones de uso [internet]. 2009. Microgen Bioproducts Ltd. WF6724/2009/02 [consultado 4 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.kemitekskimya.com.tr/files/10119fd2684683.pdf>
25. American Public Health Association. Métodos normalizados para el análisis de agua potable y residuales. 2017 [consultado 28 de abril de 2022]. Edit Am Public Hea Assoc. 2017, 23 (1) ISSN 55-1979: 475-478, 561-570, 819-822, 901-903, 1103-1109, 1232-1240.

26. Hernández-González F, Nolasco-Tovar E, Salguero Sandoval M. Determinación del índice de calidad del agua NSF y modelación del cromo hexavalente en la parte alta del río Suquiapa, Santa Ana, El Salvador [Pregrado]. 2016 [Consultado 2 de mayo de 2022]. San Salvador: Universidad de El Salvador.
27. Guo, D., Xi, Y., Wang, S. *et al.* Is a positive Christie-Atkinson-Munch-Peterson (CAMP) test sensitive enough for the identification of *Streptococcus agalactiae*?. *BMC Infect Dis* 19, 7 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3561-3>.
28. Hassan AA, Akineden O, Lämmle C, Huber-Schlenstedt R. Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2002 Jun;49(5):257-9. doi: 10.1046/j.1439-0450.2002.00553.x. PMID: 12121048.
29. Amal, MNA y Zamri-Saad, M. (2011). Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 34(2): 195-206. [Consultado, 22 de septiembre de 2022]. Disponible en [www.researchgate.net/publication/220038538\\_1\\_Amal\\_MNA\\_and\\_ZamriSaad\\_M\\_2011\\_Streptococcosis\\_in\\_Tilapia\\_Oreochromis\\_niloticus\\_A\\_Review\\_PERTANIKA\\_Journal\\_of\\_Tropical\\_Agricultural\\_Science\\_342\\_195-206](http://www.researchgate.net/publication/220038538_1_Amal_MNA_and_ZamriSaad_M_2011_Streptococcosis_in_Tilapia_Oreochromis_niloticus_A_Review_PERTANIKA_Journal_of_Tropical_Agricultural_Science_342_195-206)
30. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Informe de la calidad de agua de los ríos en El Salvador. [internet]. 2020 [consultado 10 de marzo de 2023]. Disponible en: [www.cidoc.marn.gob.sv/documentos/informe-de-calidad-de-agua-de-los-rios-de-el-salvador-ano-2020/](http://www.cidoc.marn.gob.sv/documentos/informe-de-calidad-de-agua-de-los-rios-de-el-salvador-ano-2020/)

31. Rebouças, V., Lima, F., Cavalcante, D., Carmo e Sá, M. (2016). Reassessment of the suitable range of water pH for culture of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. in eutrophic water. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. 38. 361. 10.4025. Doi: 10.4025/actascianimsci.v38i4.32051
32. Pei-Chih, L., Yi-Lun, T., Yao-Chung, C., Pei-Chi, W., Shu-Chu, L., and Shih-Chu, C. (2020). Analysis of Streptococcal Infection and Correlation with Climatic Factors in Cultured Tilapia *Oreochromis* spp. in Taiwan. *Applied Sciences* 10, no. 11: 4018. <https://doi.org/10.3390/app10114018>.
33. Cavalcante, D., Caldini, N. N., da Silva, J. L. S., dos Santos Lima, F. R., & do Carmo, M. V. (2014). Imbalances in the hardness/alkalinity ratio of water and Nile tilapia's growth performance. *Acta Scientiarum. Technology*, 36(1), 49-54. Doi: 10.4025/actascitechnol.v36i1.18995
34. Monsees, H., Klatt, L., Kloas, W. and Wuertz, S. (2017), Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. *Aquac Res*, 48: 3482-3492. <https://doi.org/10.1111/are.13174>
35. Bueno, G. W., Mattos, B. O. D., Neu, D. H., David, F. S., Feiden, A., & Boscolo, W. R. (2019). Stability and phosphorus leaching of tilapia feed in water. *Ciência Rural*, 49. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180429>
36. Félix-Cuencas, L., García-Trejo, J. F., López-Tejeida, S., de León-Ramírez, J. J., Gutiérrez-Antonio, C., & Feregrino-Pérez, A. A. (2021). Nitrogen and phosphorus flux in wastewater from three productive stages in a

hyperintensive tilapia culture. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 11(3), 520-530. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.02116>

37. Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador (MAG). Distritos de riego y avenamiento de El Salvador, C.A. [interne].2012 [consultado 7 de abril de 2022]. Disponible en: [www.mag.gob.sv/wp-content/uploads/2021/06/2distritos-de-riego-y-avenamiento-de-El Salvador.pdf](http://www.mag.gob.sv/wp-content/uploads/2021/06/2distritos-de-riego-y-avenamiento-de-El-Salvador.pdf)

38. De Blas, I., Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. Working In Epidemiology. [servidor web].2006 [consultado 10 de marzo de 2022]. Disponible en: [www.winepi.net/sp/index.htm](http://www.winepi.net/sp/index.htm)

**ANEXOS**

# ANEXO N°1

## DISTRITO DE RIEGO DE ATIOCOYO SUR, SAN PABLO TACACHICO, LA LIBERTAD

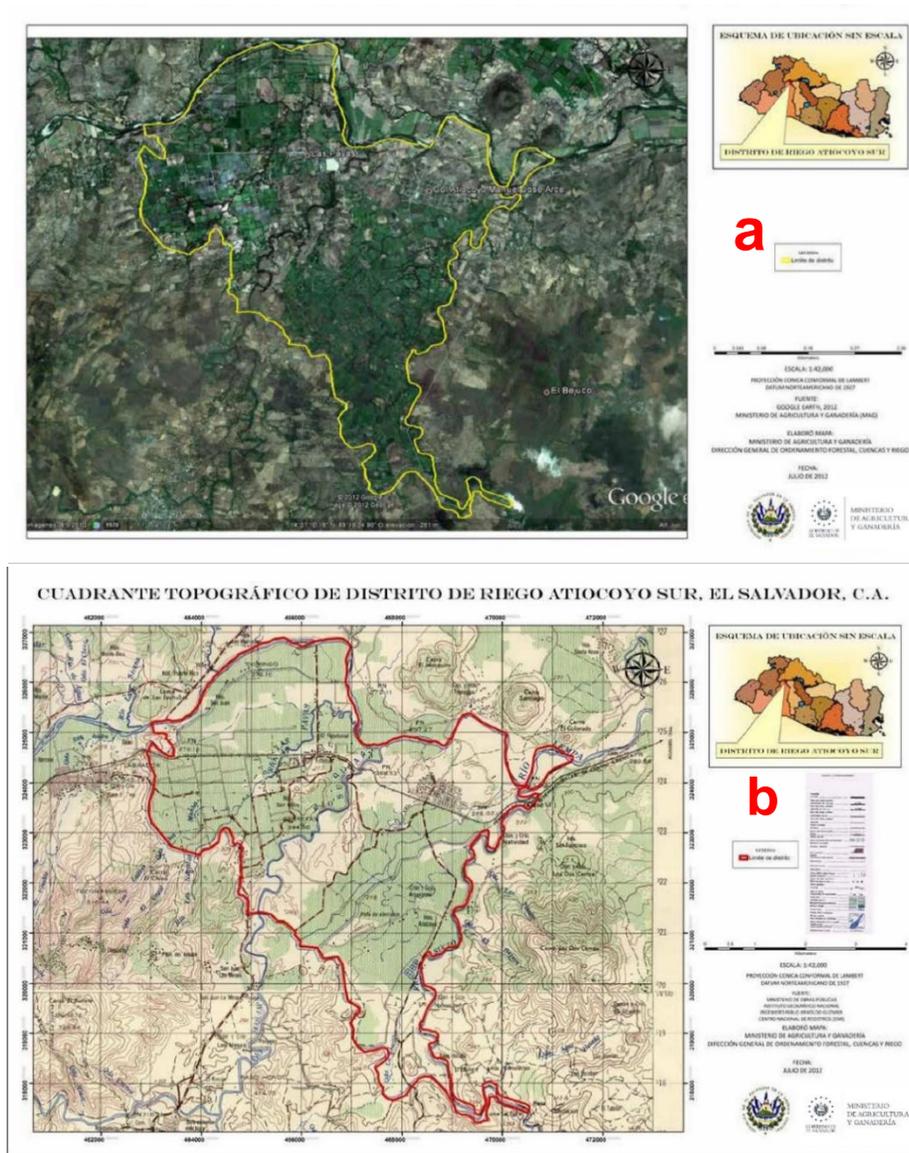


Figura N°1. Distrito de Riego de Atiocooyo Sur, a) ubicación geográfica, b) cuadrante topográfico y distribución hídrica (37)

## ANEXO N°2

### CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA A PARTIR DEL SERVIDOR WEB WINEPI

#### 3 Tamaño de muestra: Detectar enfermedad (muestreo aleatorio y diagnóstico perfecto)

**Datos disponibles**

Introduzca los siguientes datos para determinar el tamaño de muestra mínimo necesario para detectar una enfermedad (infección) en una población:

Nivel de confianza:  %

Tamaño de la población:

Prevalencia mínima esperada:  %

**Resultados**

Se debe seleccionar una muestra con al menos **26 individuos** para detectar, con un nivel de confianza del 95%, si en una población de 150 individuos hay al menos un individuo enfermo asumiendo una prevalencia mínima esperada del 10%.

Tamaño de muestra: 26

Fracción de muestreo: 17.3%

N° de enfermos a detectar: 15

Figura N°2. Cálculo de muestra mediante WinEpi (38)

## ANEXO N°3

### FORMATO DE LA HOJA DE RECOLECCION DE DATOS IN SITU

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA		
Determinaciones fisicoquímicas y presencia de <i>S. agalactiae</i> en granjas de tilapia ( <i>O. niloticus</i> )			
Código de muestra:			
Mes		Departamento	
Día		Municipio	
Año		Cantón	
Hora		Caserío	
Nombre granja/propietario		N° de estanque	

Parámetro	1°	2°	3°	Promedio
Oxígeno disuelto (mg/L)				
Potencial de hidrógeno (pH)				
Temperatura (°C)				
Condición climática				
Observaciones				

Figura N°3. Hoja de recolección de datos para las evaluaciones *in situ*. Fuente: elaboración propia

## ANEXO N°4

### EQUIPOS UTILIZADOS PARA EL ANALISIS FISICOQUIMICO



Figura N°4. Equipo para evaluaciones fisicoquímicas del agua de cultivo, a) Sonda Sonda multiparámetros Aquaread AP-700, b) Espectrofotómetro Shimadzu UV/VIS, c) Fotómetro HACH DR2700

**ANEXO N°5**

**PREPARACION DE LA MUESTRA DE TILAPIA PARA ANALISIS  
MICROBIOLOGICO**

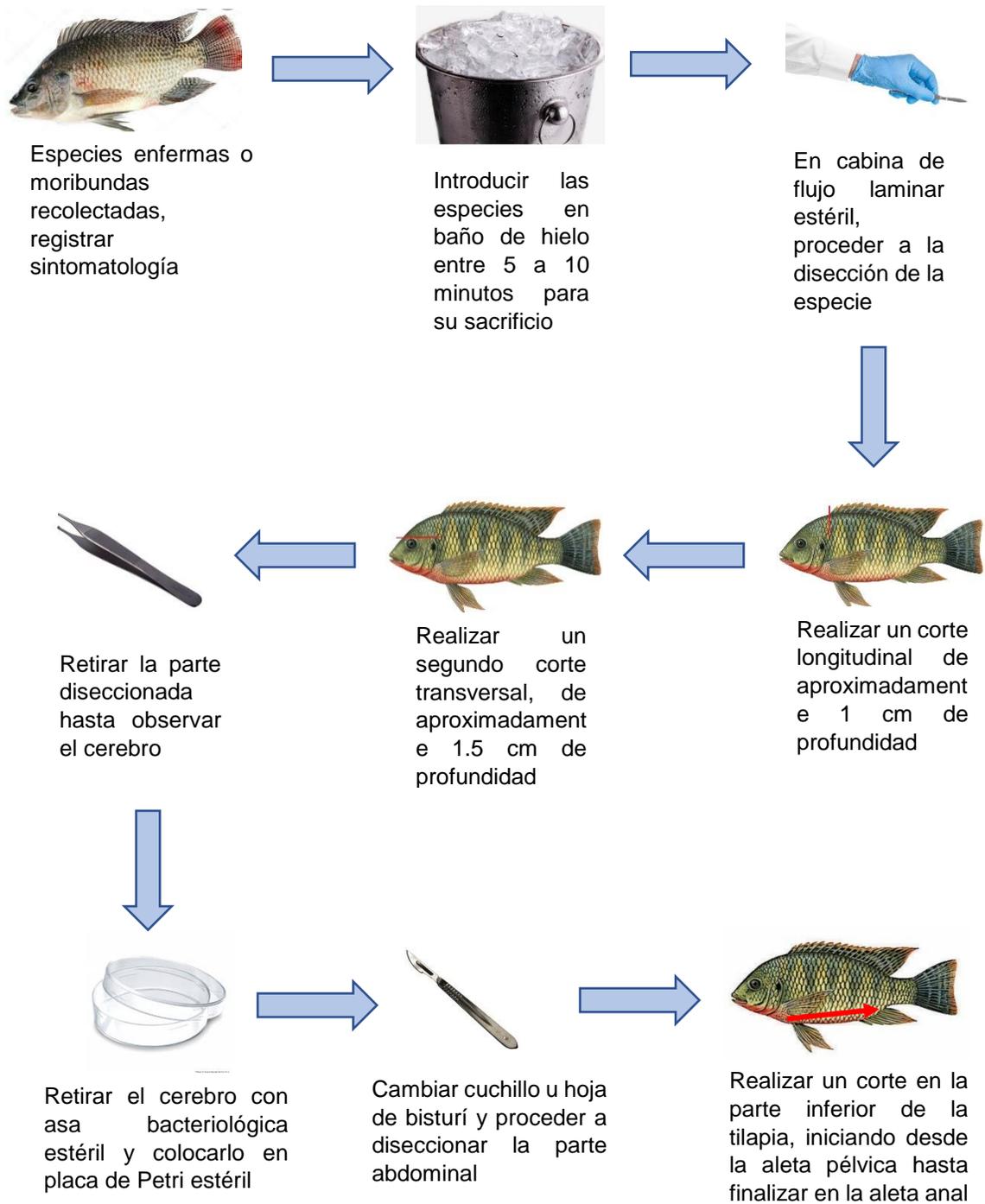


Figura N°5. Procedimiento para la preparación de la muestra de tilapia. Fuente: elaboración propia

Figura N°5 (Continuación)

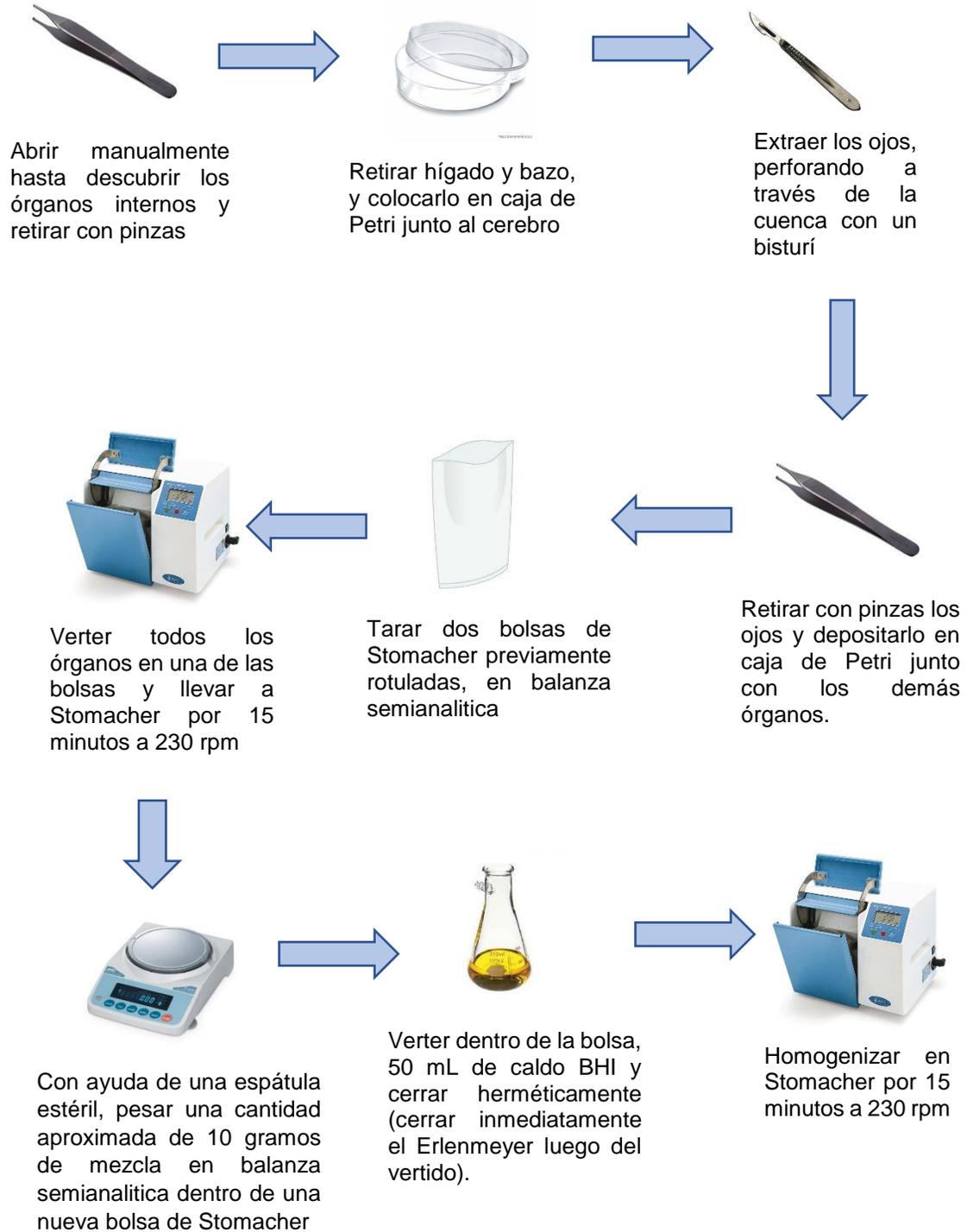
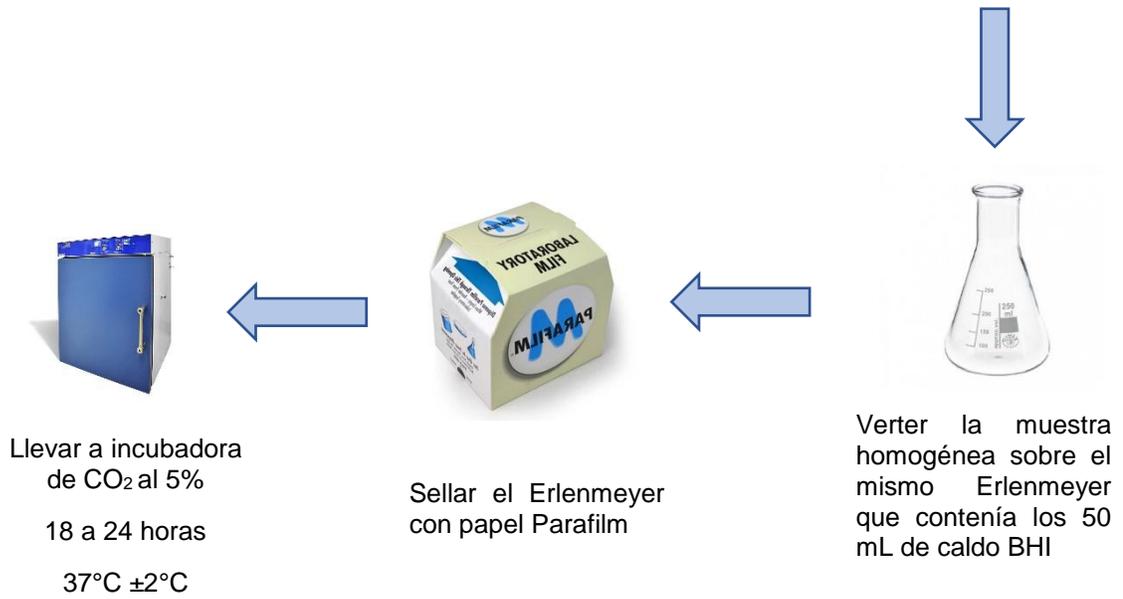


Figura N°5 (Continuación)



## ANEXO N°6

### HOJA DE COTEJO PARA SINTOMATOLOGIA EXTERNA DE LAS ESPECIES RECOLECTADAS

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA		
Determinaciones fisicoquímicas y presencia de <i>S. agalactiae</i> en granjas de tilapia ( <i>O. niloticus</i> )			
Código de muestra:			
Fecha:		Hora:	
Departamento:			
Municipio:			
Cantón/Caserío:			
Número de especies capturadas:			
Nombre de la granja/propietario:			
Número de estanque:			
SINTOMATOLOGÍA EXTERNA REFERENTE A INFECCIÓN POR <i>Streptococcus spp.</i> Rellenar de acuerdo al número de especies positivas (i) entre el número de especies capturadas (T): i/T			
Especies que presentaron natación errática:			
Especies que presentan exoftalmo		unilateral:	bilateral:
Especies que presentan opacidad ocular:			
Especies que presentan lesiones y/o hemorragias:			
Especies muertas durante el transporte:			
Otras observaciones:			

Figura N°6. Hoja de cotejo utilizada para registrar la sintomatología referente a estreptococosis.  
Fuente: elaboración propia

## ANEXO N°7

### AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE *Streptococcus agalactiae* OBTENIDO DE TILAPIAS

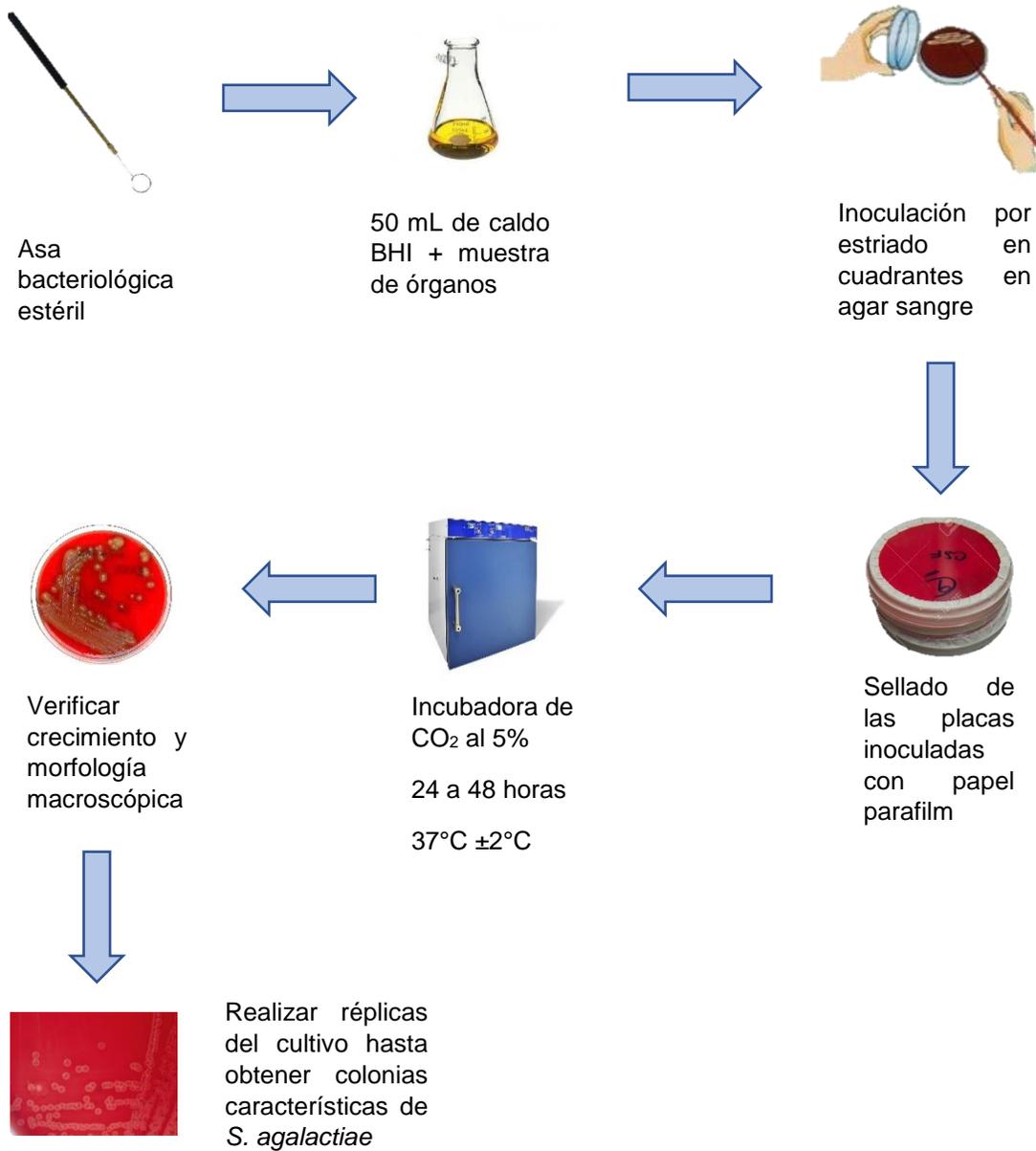


Figura N°7. Procedimiento para el aislamiento y purificación de *S. agalactiae* en tilapias. Fuente: elaboración propia

**ANEXO N°8**

**AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE *Streptococcus agalactiae*  
OBTENIDO DE AGUA DE ESTANQUE**

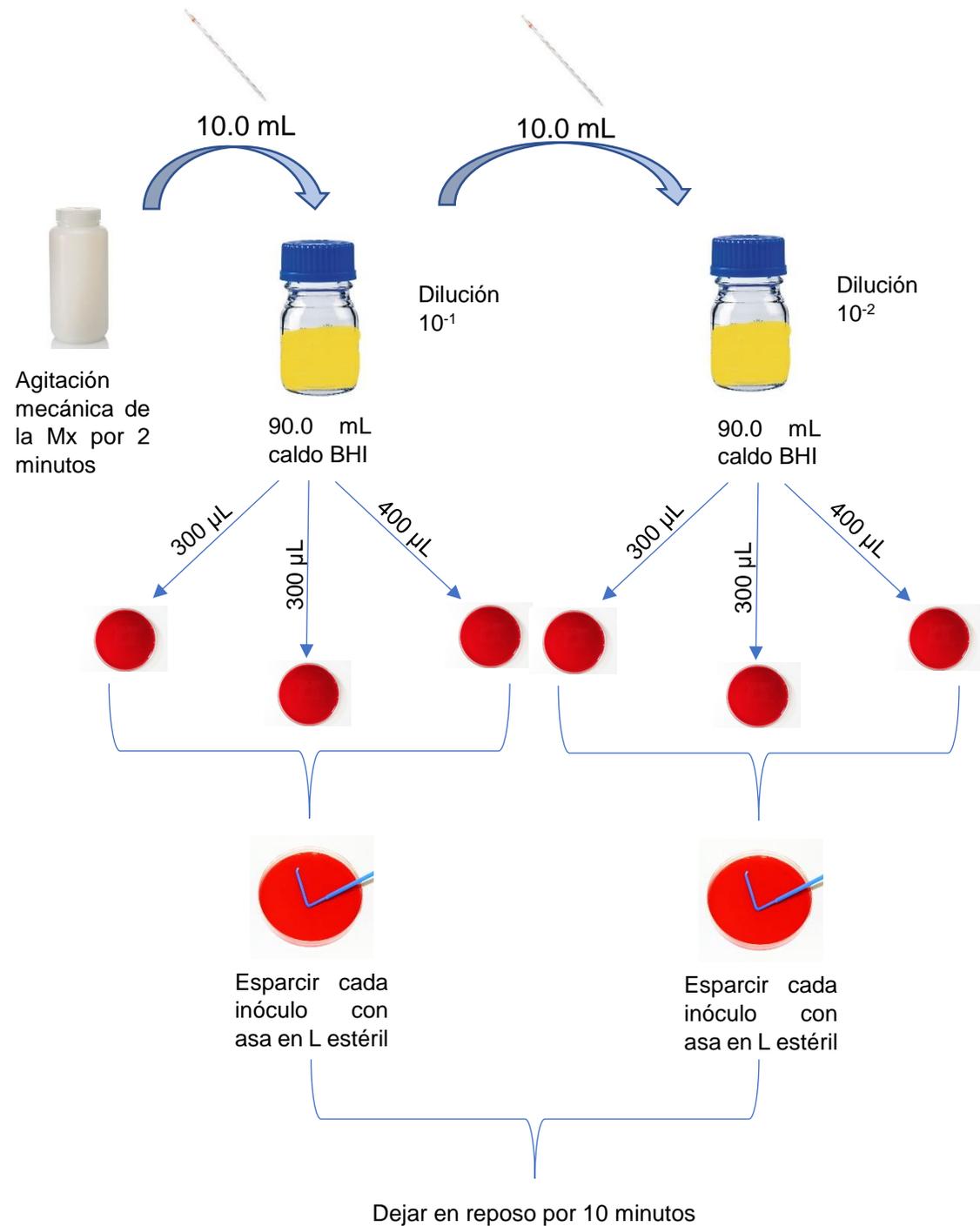


Figura N°8. Procedimiento el aislamiento y purificación de *S. agalactiae* en muestras de agua.  
 Fuente: elaboración propia

Figura N°8 (continuación)



Sellar con parafilm



Sellar con parafilm



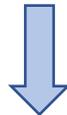
Incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%

37°C ± 2°C

24- 48 horas



Verificar crecimiento y morfología  
macroscópica



Realizar réplicas del cultivo  
hasta obtener colonias  
características de *S.*  
*agalactiae*

## ANEXO N°9

### PROCEDIMIENTO PARA LA TINCION DE GRAM

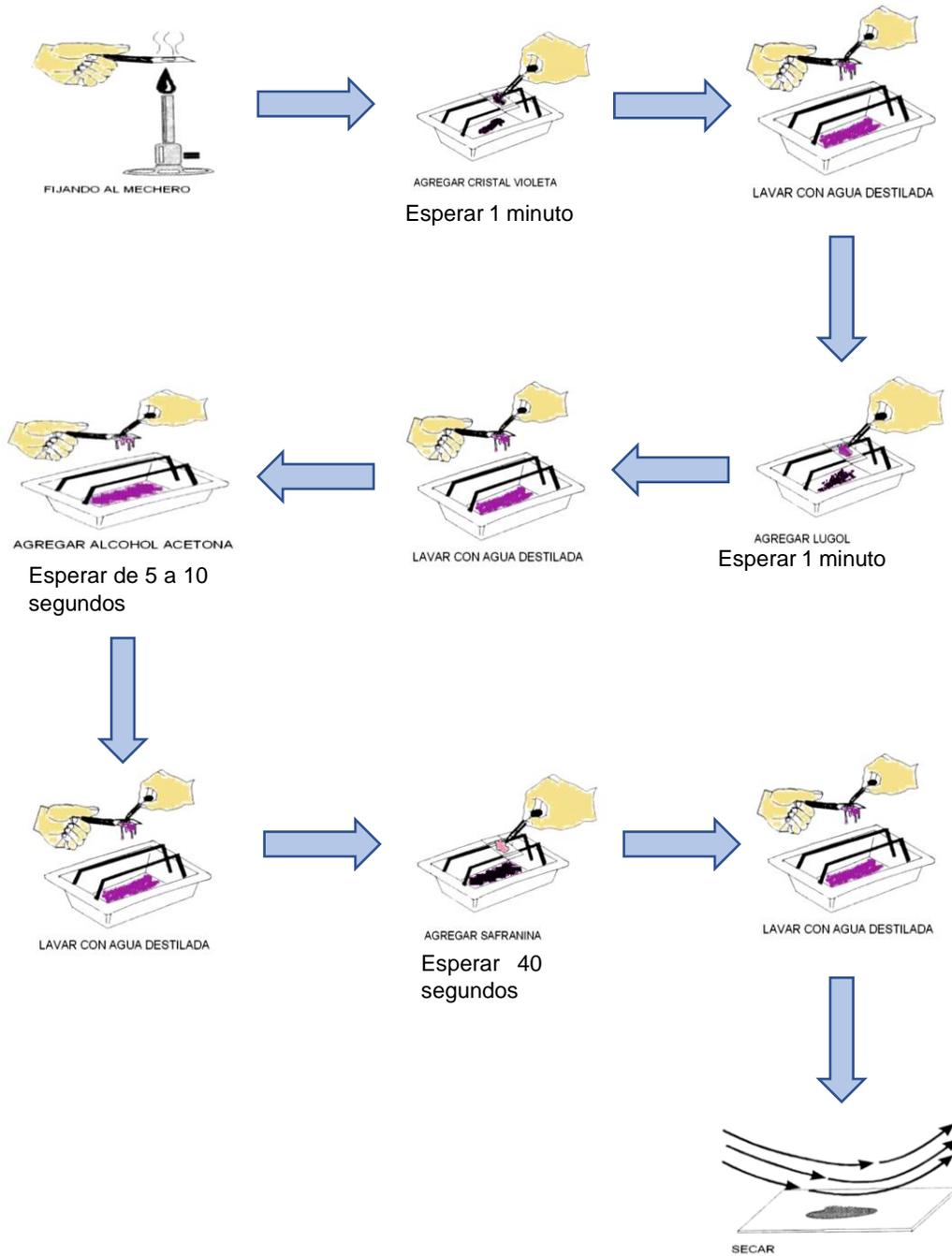


Figura N°9. Procedimiento para la tinción de GRAM (22)

**ANEXO N°10**  
**PRUEBA DE CAMP**

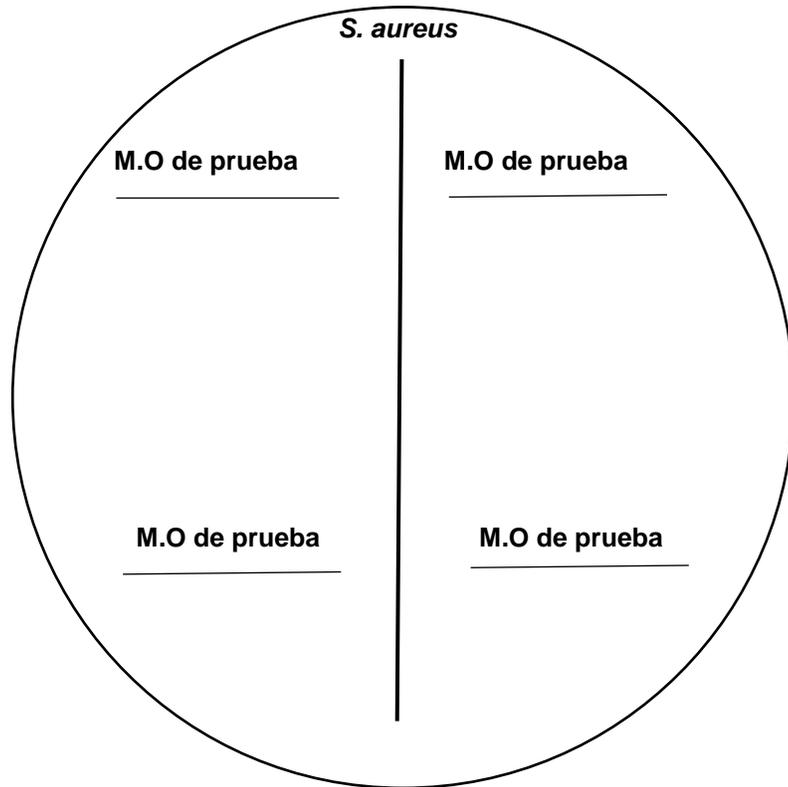


Figura N°10. procedimiento para la prueba de CAMP. Fuente: elaboración propia

**ANEXO N°11**

**ESQUEMA PARA LA PRUEBA DE RESISTENCIA/SENSIBILIDAD A**

**ANTIBIOTICOS**

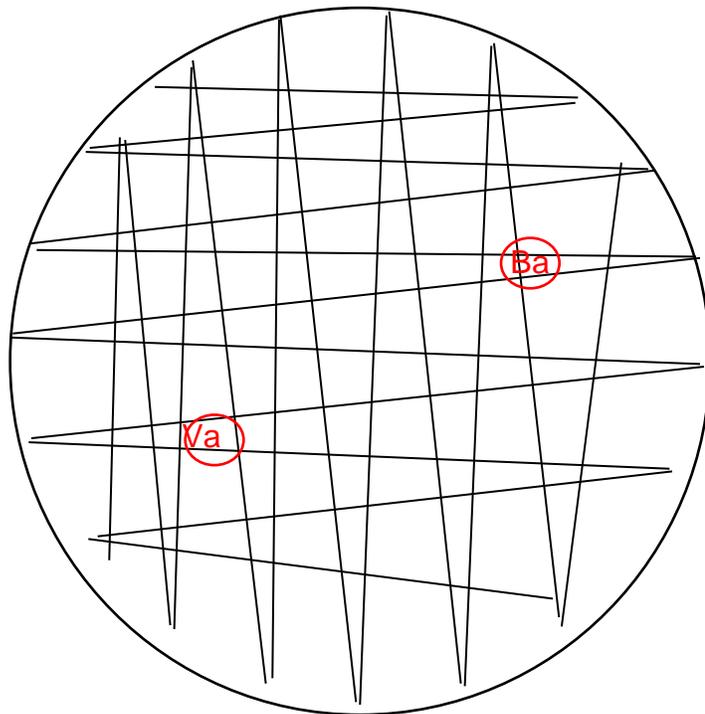


Figura N°11. Procedimiento para la colocación de los discos de antibióticos. Fuente: elaboración propia

**ANEXO N°12**

**IDENTIFICACION MEDIANTE MICROGEN® STREP-ID**

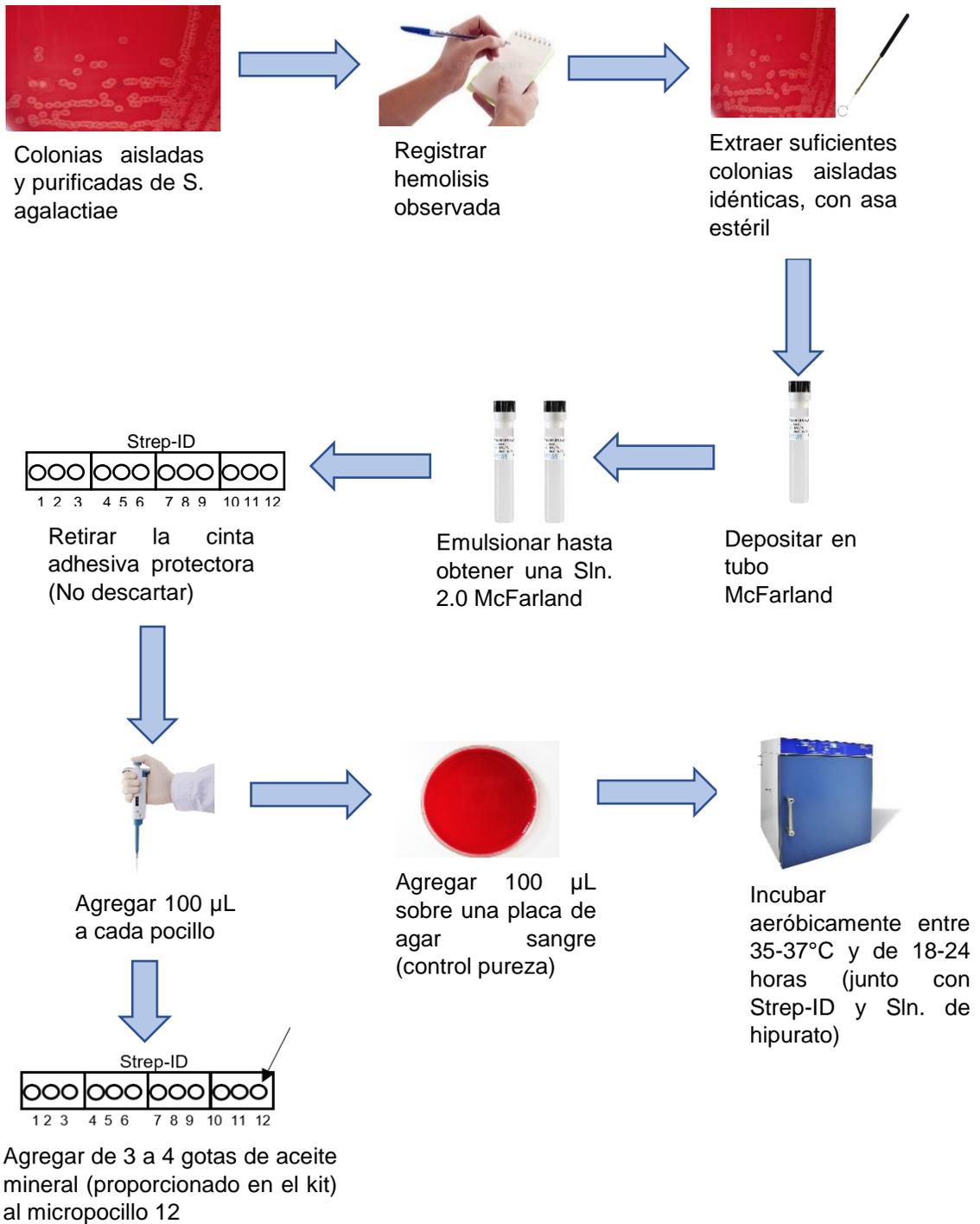
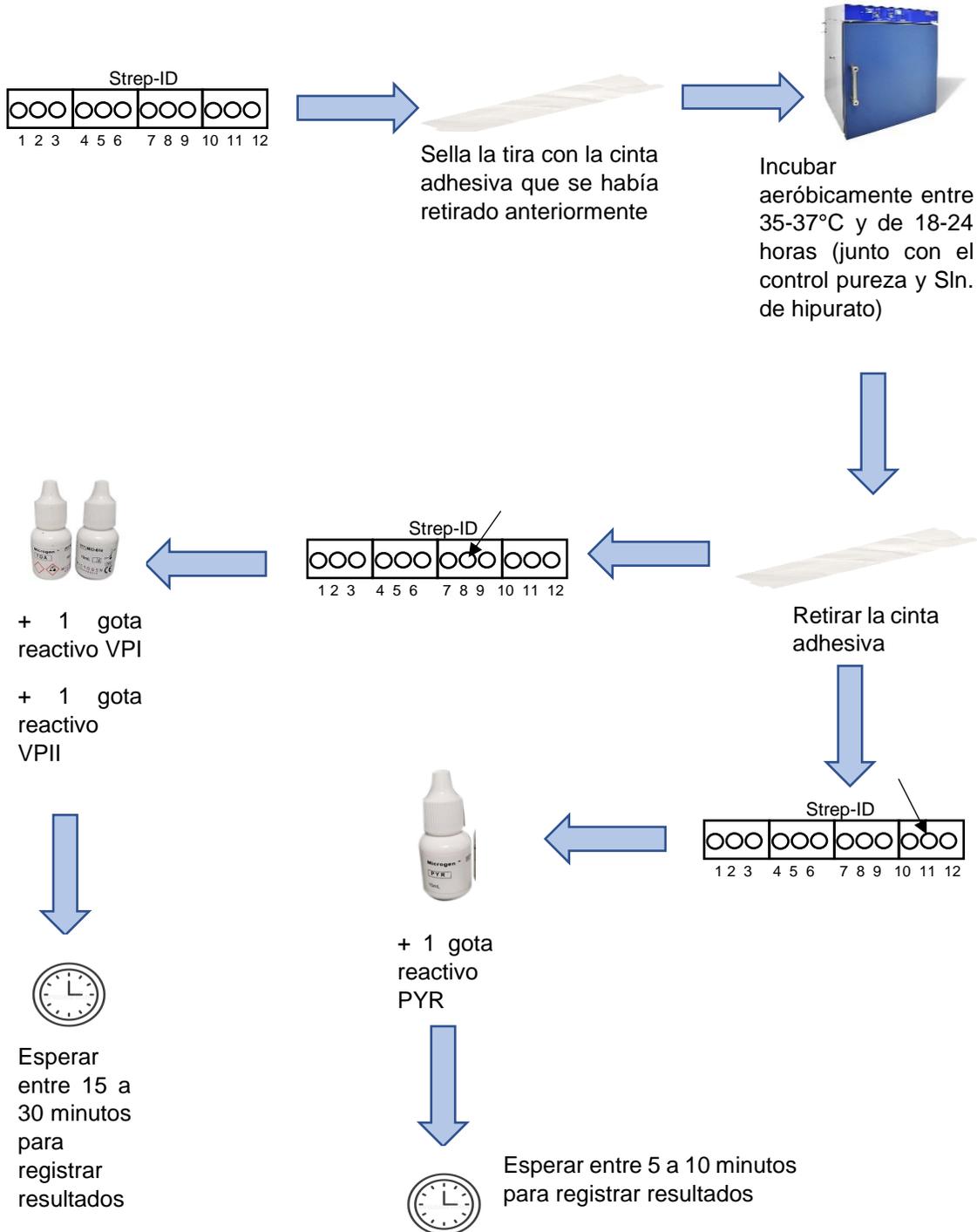


Figura N°12. Procedimiento para identificación con Microgen® Strep-ID. Fuente: elaboración propia

Figura N°12 (Continuación)





## ANEXO N°13

### TABLA DE COLORES Y FORMULARIO PARA RESULTADOS DE MICROGEN® STREP-ID

POZO/NAPPHEN /GODET	1 a 6	7	8	9 a 10	11	12	
Reacción	Carbohidrato Fermentación	esculina	Voges Proskauer	PHS, βGA	PYR	Arginina	hipurato
Negativo		 					
Positivo	 		 	 	 	 	

MICROGEN STREP-ID

REPORT FORM

Lab. No.

Specimen Type: \_\_\_\_\_  
Date: \_\_\_\_\_



Well Number	Strep-ID														
	HIP	AHE	BHE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reaction				MEL	SOR	INU	LAC	ARA	RIB	ESC	VP	PHS	βGA	PYR	ARG
24 hours															
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of positive reactions															

Profile No. \_\_\_\_\_ Final identification: \_\_\_\_\_

Figura N°13. Complementos del kit Microgen® Strep-ID, a) tabla de colores para reacciones positivas/negativas, b) formulario para reporte (6)

## ANEXO N°14

### PRUEBA COMPLEMENTARIA PARA MICROGEN® STREP-ID (HIDROLISIS DEL HIPURATO)

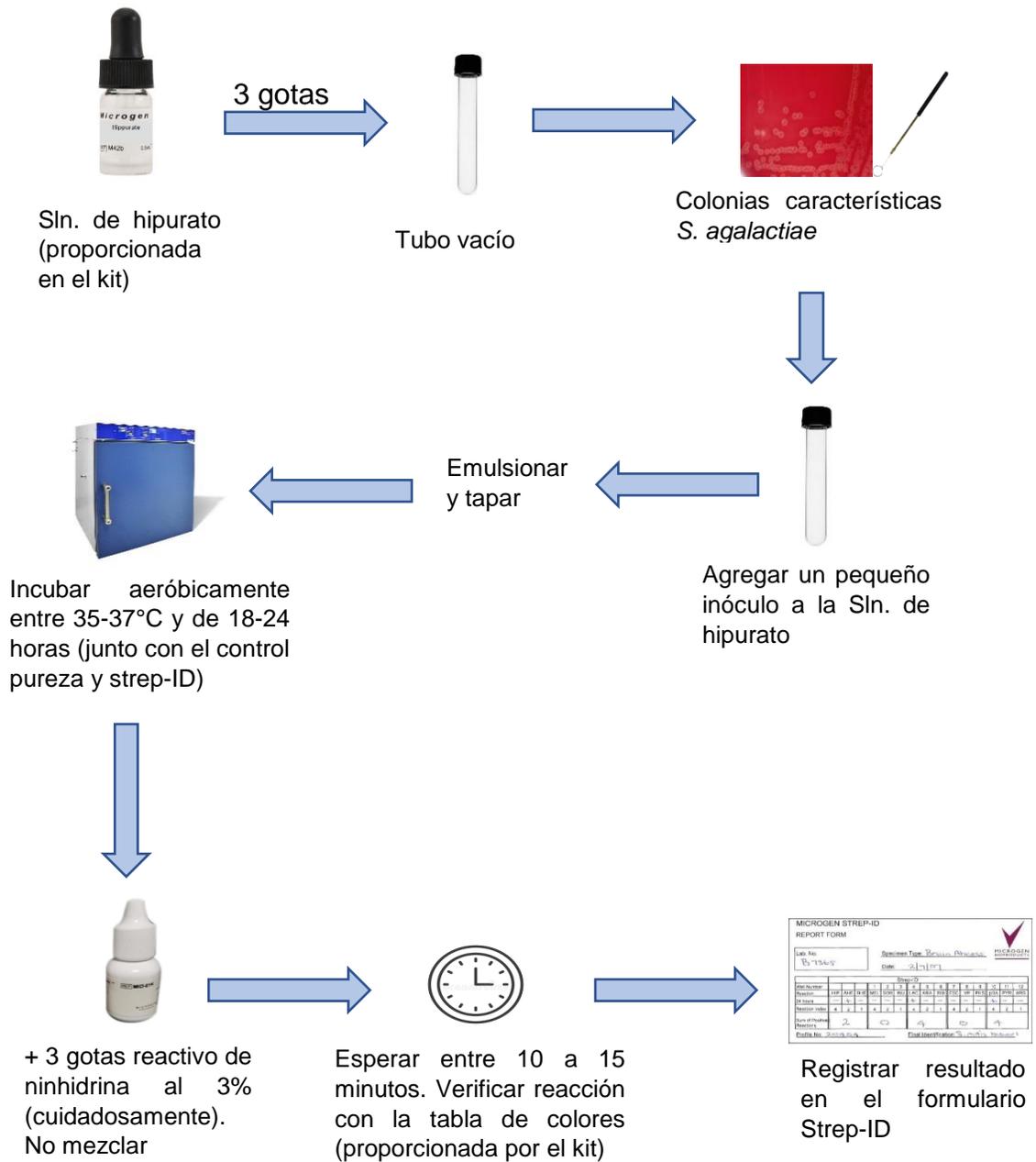
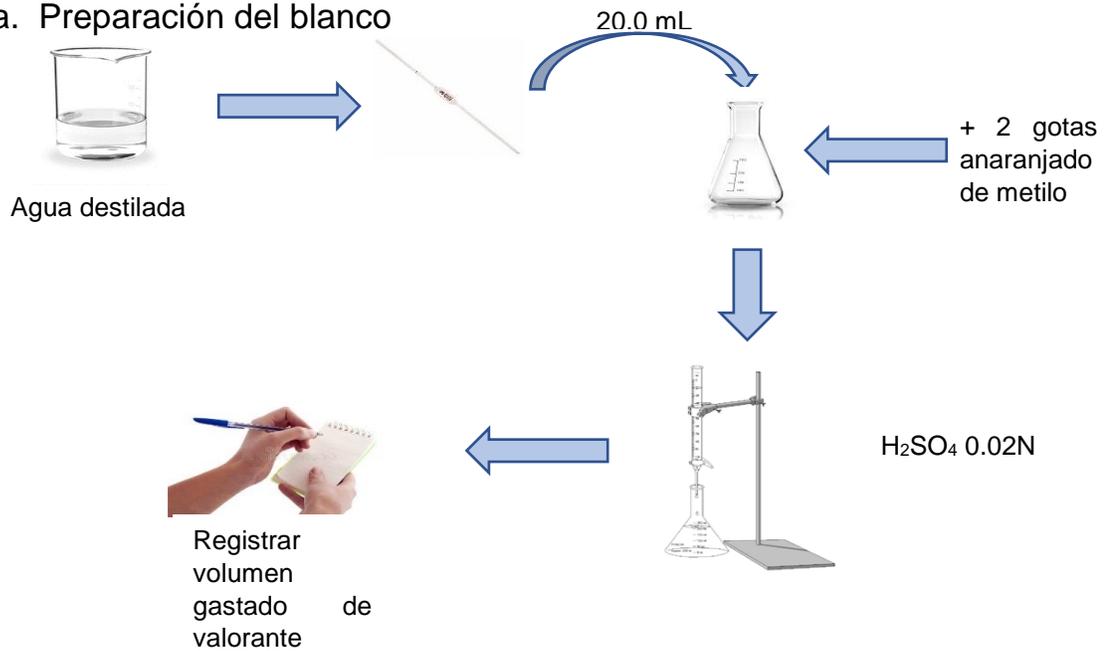


Figura N°14. Procedimiento para la hidrólisis del hipurato. Fuente: elaboración propia

## ANEXO N°15

### DETERMINACION DE LA ALCALINIDAD EN EL AGUA DE ESTANQUE

#### a. Preparación del blanco



#### b. análisis de la muestra

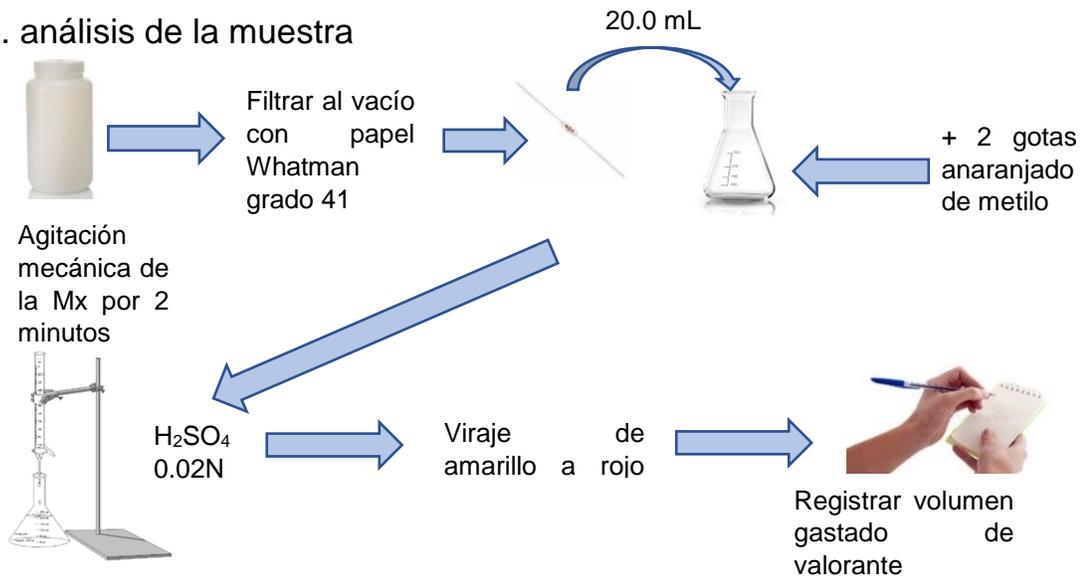
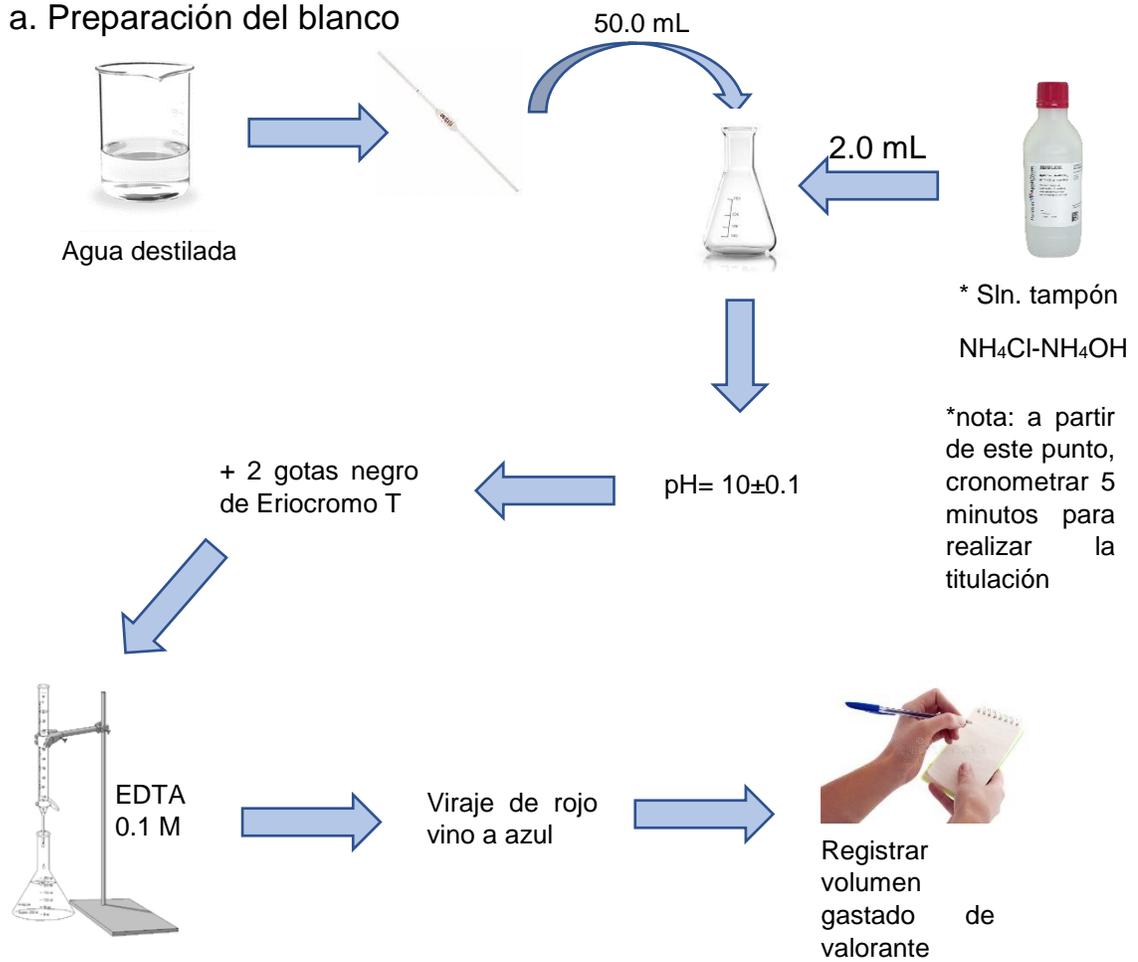


Figura N°15. Procedimiento para determinar alcalinidad en muestras de agua. Fuente: elaboración propia

**ANEXO N°16**

**DETERMINACION DE LA DUREZA EN EL AGUA DE ESTANQUE**

### a. Preparación del blanco



### b. análisis de la muestra

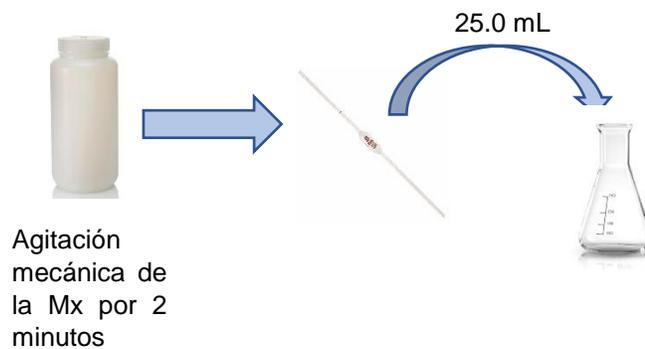
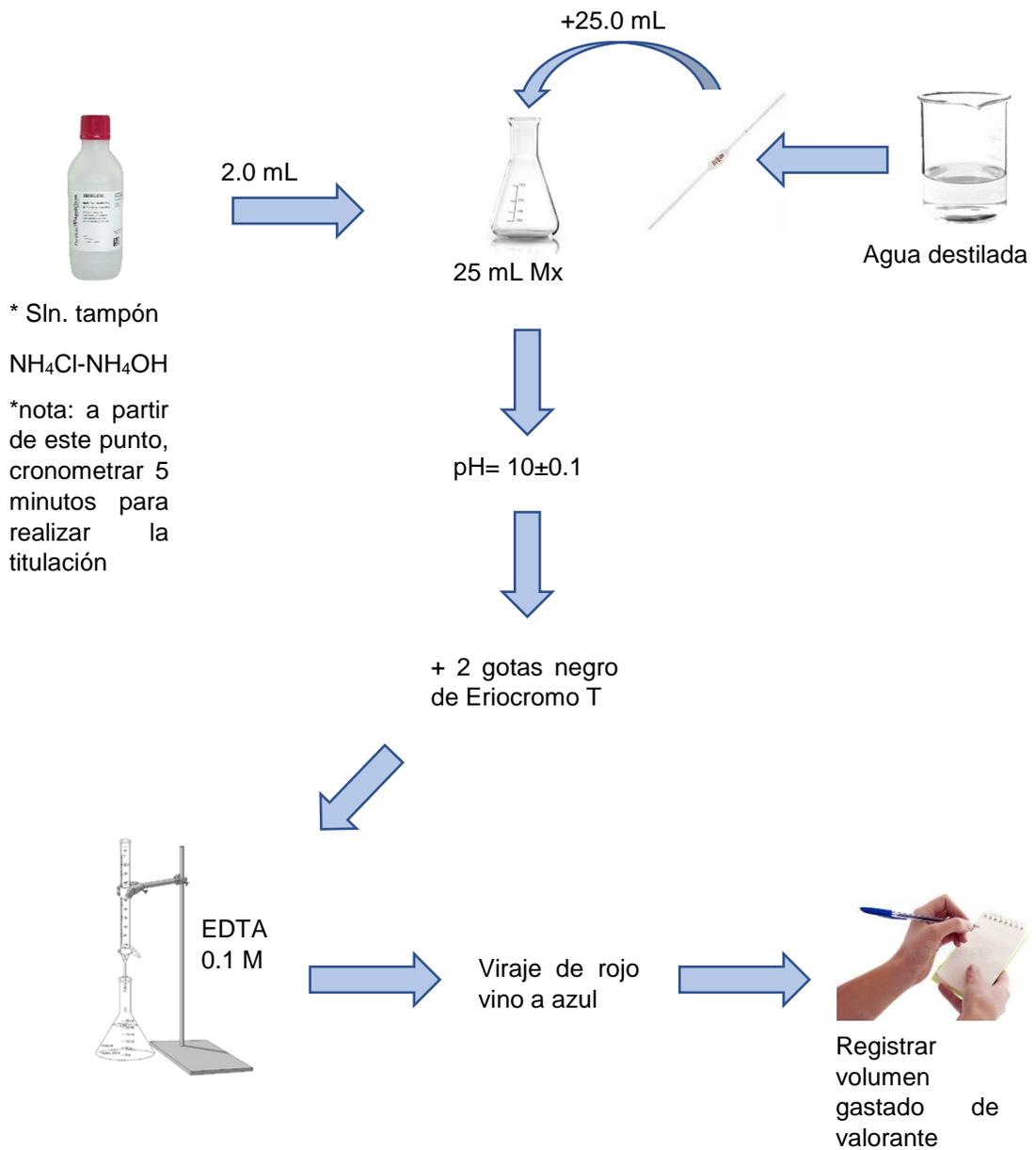


Figura N°16. Procedimiento para determinar dureza en muestras de agua. Fuente: elaboración propia

Figura N°16 (continuación)

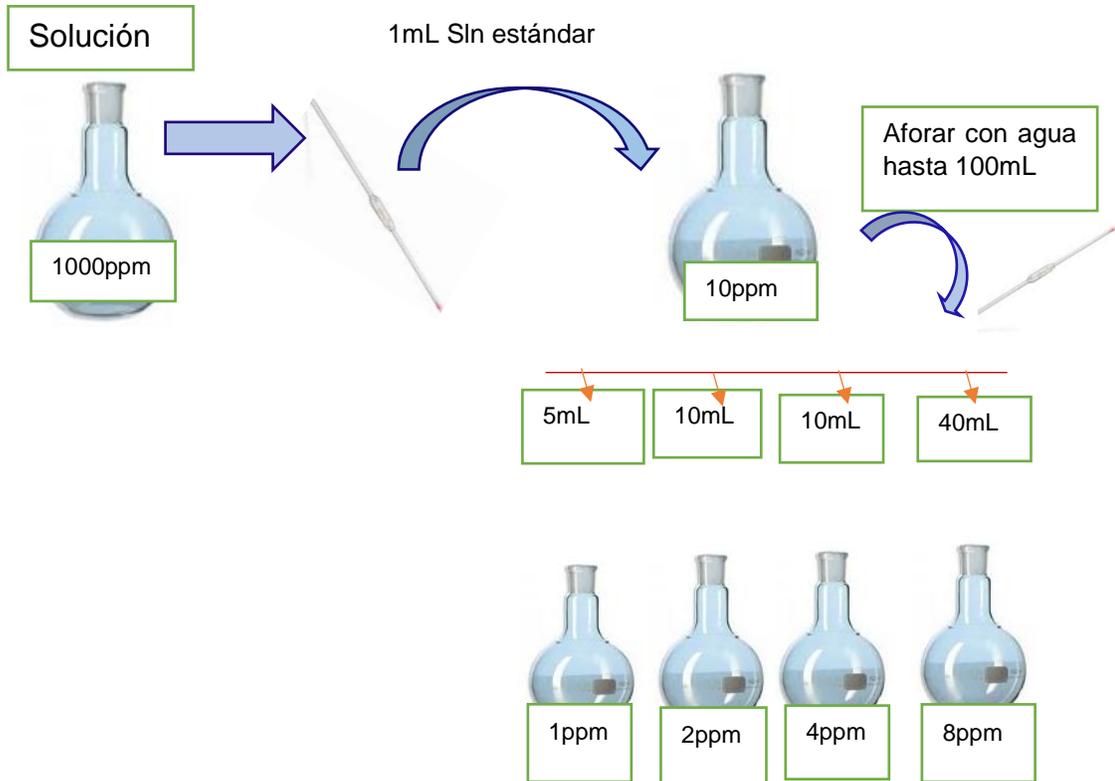
b. análisis de la muestra



**ANEXO N°17**

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE IONES NITRATO EN  
EL AGUA DE ESTANQUE**

### a. preparación de la curva de calibración



### b. análisis de la muestra

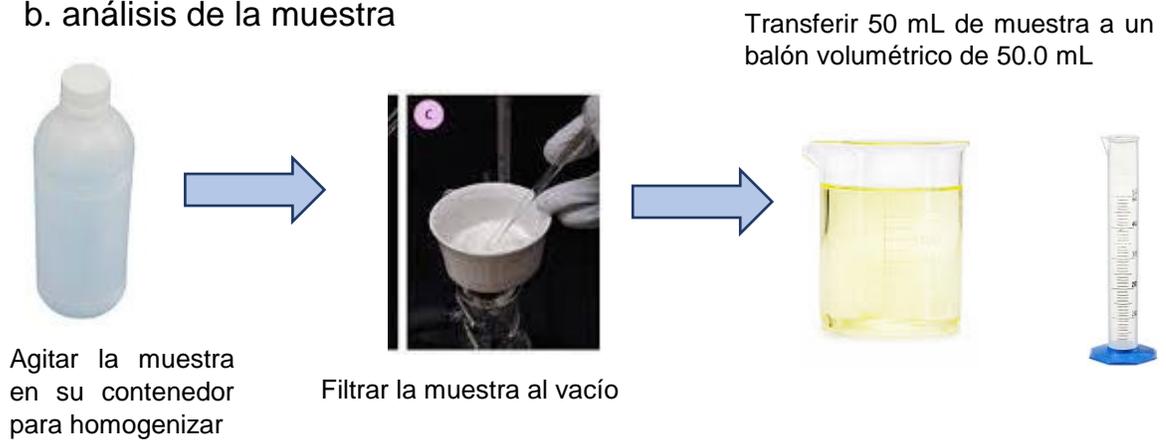
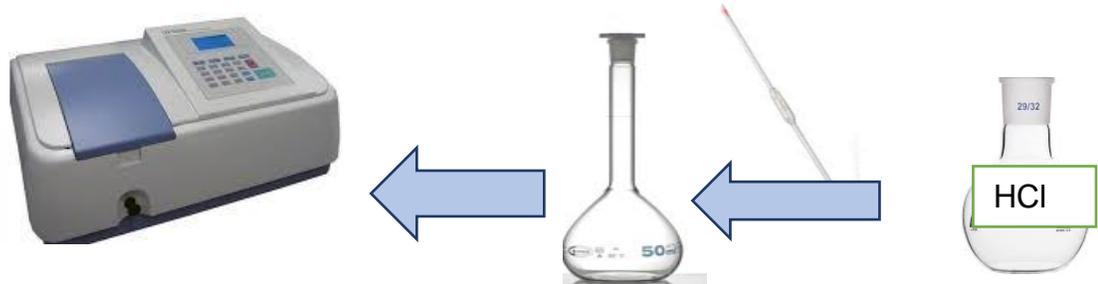


Figura N°17. Procedimiento para determinar nitratos en muestras de agua. Fuente: elaboración propia

Figura N°17 (Continuación)



Leer la absorbancia a 220nm y a 275nm

Agregar 1 mL de HCl 1 N a los 50.0 mL de Mx y mezclar

## ANEXO N°18

### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE IONES NITRITO



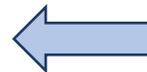
Lavar los tubos de ensayo con agua desmineralizada



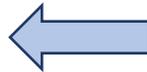
Tomar 5 mL de la muestra filtrada y traspasarla a un tubo de ensayo



Agregar una microcucharad a del reactivo  $\text{NO}_2^-$  y agitar



Dejar reposar por 10 minutos



Leer la muestra a una longitud de onda de 540 nm

Figura N°18. Procedimiento para determinar nitritos en muestras de agua. Fuente: elaboración propia

## ANEXO N°19

### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE IONES FOSFATO

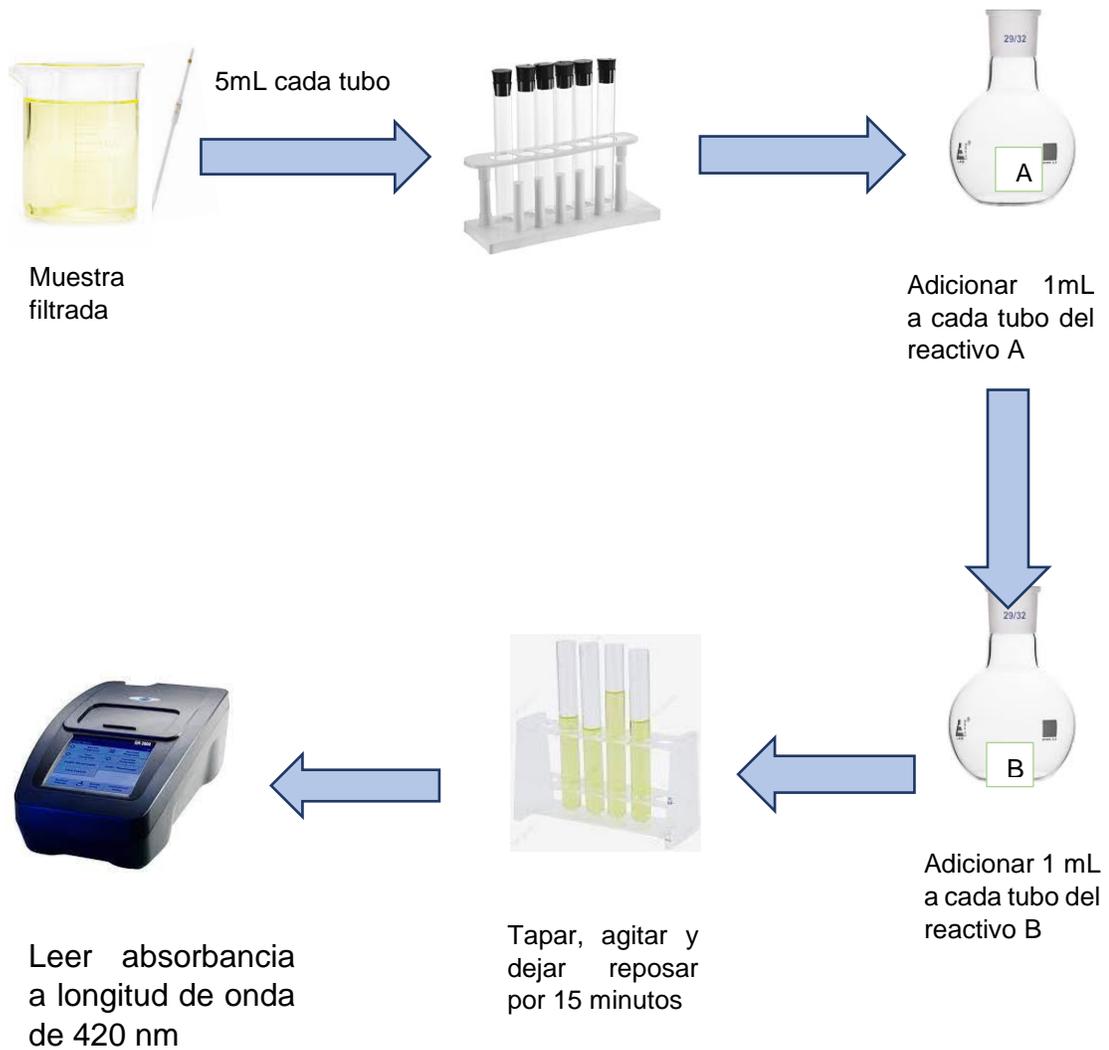


Figura N°19. Procedimiento para determinar fosfatos en muestras de agua. Fuente: elaboración propia

## ANEXO N°20

### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE IONES AMONIO

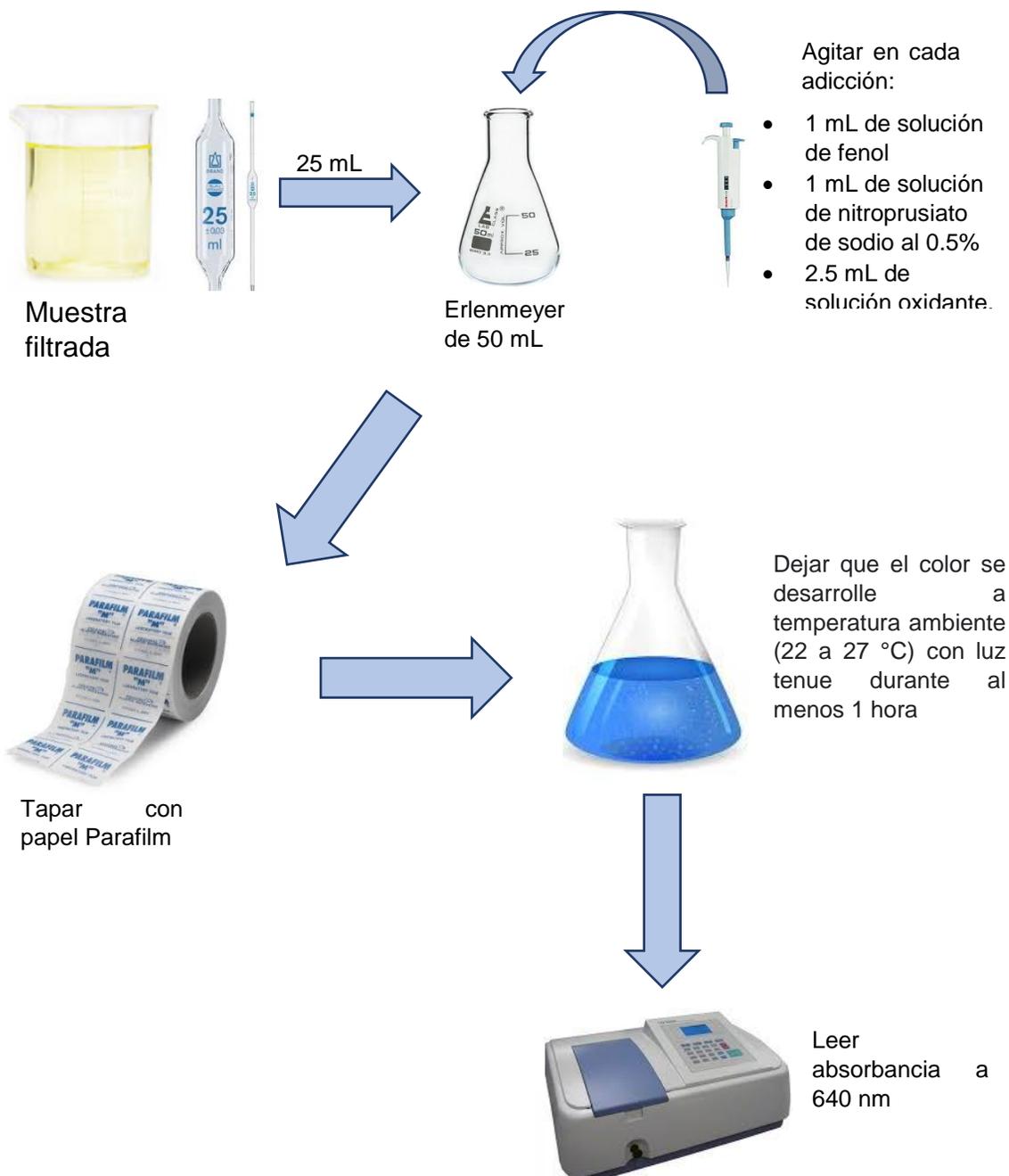


Figura N°20. Procedimiento para determinar nitritos en muestras de agua. Fuente: elaboración propia

**ANEXO N°21**

**PREPARACION DE REACTIVOS PARA ANALISIS QUIMICO**

## **1. Reactivos para la determinación de la alcalinidad por método volumétrico**

Solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0.05 N

- Secar de 3 a 5 g de estándar primario de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a  $250\text{ }^\circ\text{C}$  durante 4 horas y enfriar en un desecador. Pesar  $2.5 \pm 0.2$  g, transferir a un matraz aforado de 1 L, llenar el matraz hasta la marca con agua destilada, mezclar y disolver el reactivo. No conservar más de 1 semana.

Solución de ácido sulfúrico al 0.02 N

- Diluir 200.0 mL de ácido sulfúrico concentrado (pureza=97%,  $\rho=1.18$  g/mL) en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Estandarizar por titulación potenciométrica de 15.0 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.05N. 1 mL equivale a 1.00 mg de  $\text{CaCO}_3$ .

## **2. Reactivos para la determinación de la dureza por método volumétrico**

Solución Buffer

- Disolver 16.9 g de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) en 143 mL de hidróxido de amonio concentrado ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Agregar 1.25 g de sal magnésica de EDTA (disponible comercialmente) y diluir a 250 mL con agua destilada.

Indicador negro de Eriocromo T

- Disolver 0.5 g de negro de Eriocromo T (calidad reactivo) en 100 mL de trietanolamina o etilenglicol.

### **3. Reactivos para la determinación de la concentración de iones nitratos**

Solución madre de nitrato

- Secar nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) en horno a  $103\text{-}105^\circ\text{C}$  durante 24 horas, luego disolver  $0.7218\text{g} \pm 0.005\text{g}$  en agua y diluir a 1000 mL. Agregar 2 ml de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) para conservar la solución la cual puede permanecer estable hasta 6 meses.

Solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 N

- Diluir 83 mL de ácido clorhídrico concentrado en 1000 mL de agua destilada. Conservar en recipiente de polietileno de alta densidad. La solución puede permanecer estable durante 1 año si se mantiene cerrada.

### **4. Reactivos para la determinación de la concentración de iones fosfato**

Solución A

- Disolver 25 g de molibdato de amonio,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , en 300 mL de agua destilada.

Solución B

- Disolver 1,25 g de metavanadato de amonio,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , por calentamiento a ebullición en 300 mL de agua destilada. Frio y agregue 330 mL de HCl concentrado. Enfríe la Solución B a temperatura ambiente, vierta la Solución A en la Solución B, mezcle y diluya a un litro.

Solución estándar de fosfato

- Disolver en agua destilada 219,5 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhidro y diluir a 1000 mL.

## 5. Reactivos para la determinación de la concentración de iones amonio

### Solución de fenol

- Mezcle 11.1 mL de fenol licuado (89 %) con alcohol etílico al 95% v/v hasta un volumen final de 100 mL. Preparar semanalmente.

### Nitroprusiato de sodio, 0,5 % p/v

- Disolver 0,5 g de sodio nitroprusiato en 100 mL de agua desionizada. Almacenar en botella ámbar hasta por 1 mes.

### Citrato alcalino

- Disolver 200 g de citrato trisódico y 10 g hidróxido de sodio en agua desionizada. Diluir a 1000 mL.

### Hipoclorito de sodio, solución comercial, alrededor del 5%

- Esta solución se descompone lentamente una vez que el sello de la tapa de la botella es roto. Reemplace aproximadamente cada 2 meses.

### Solución oxidante

- Mezclar 100 mL de solución de citrato alcalino con 25 mL de hipoclorito de sodio. Preparar fresco todos los días.

### Solución de amonio común

- Disolver 3.819 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  anhidro (secado a 100 °C) en agua y diluir hasta 1000 mL.

## ANEXO N°22

### EVALUACIONES PRELIMINARES HECHAS AL DISTRITO DE RIEGO DE ATIOCOYO SUR



Figura N°22. Distrito de Riego de Atiocooyo Sur y su grado de contaminación. Fuente: elaboración propia

## ANEXO N°23

### RECOLECCION Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS



Figura N°23. Recolección y transporte de muestras, a) agua para análisis microbiológico b) tilapias frescas, c) muestras de aguas para análisis fisicoquímico. Fuente: elaboración propia

**ANEXO N°24**

**PREPARACION DE LA MUESTRA DE TILAPIAS (POOL DE ORGANOS)**

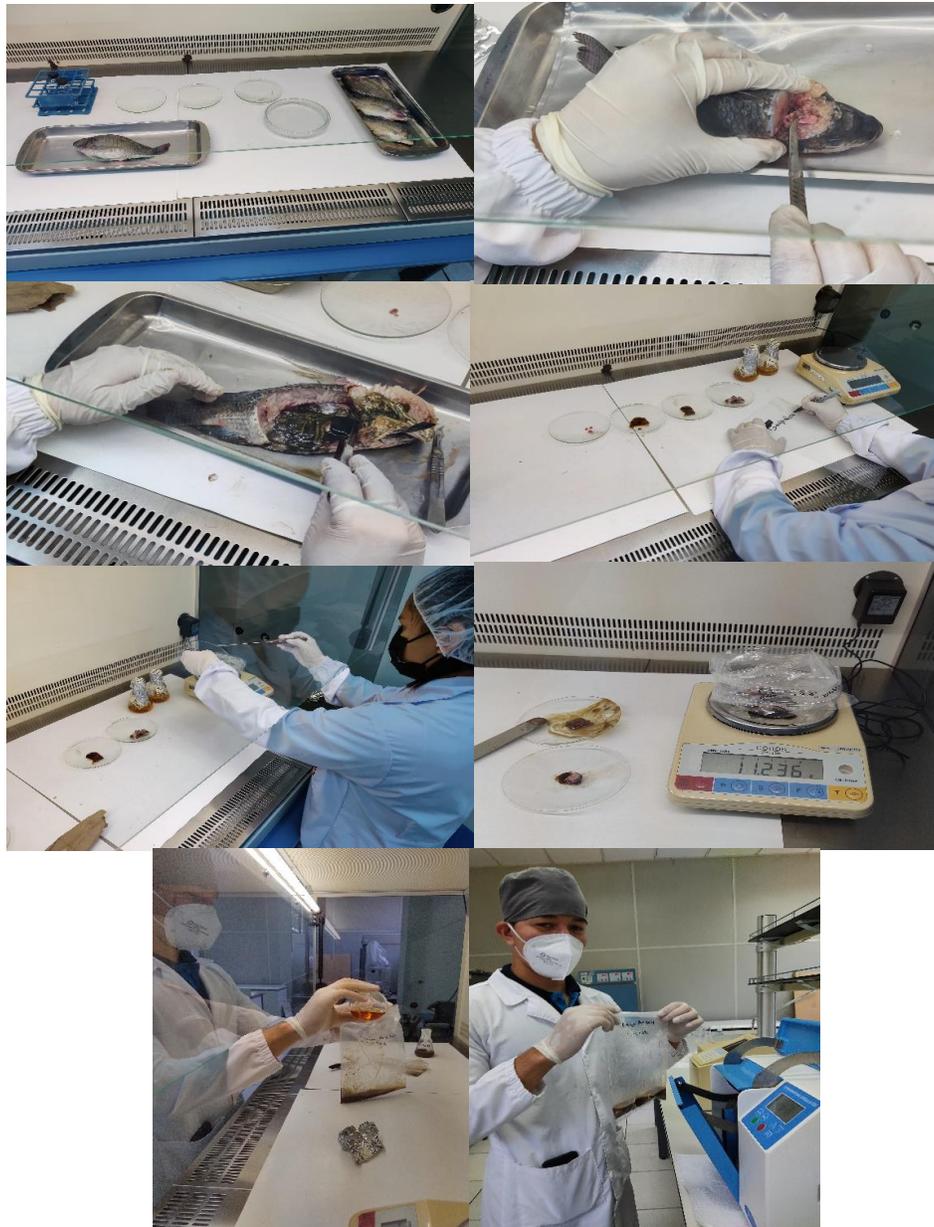


Figura N°24. Procedimiento para la preparación de la muestra de tilapia fresca. Fuente: elaboración propia

**ANEXO N°25**

**HOJAS DE COTEJO REFERENTE A LA SINTOMATOLOGIA  
EXTERNA POR ESTREPTOCOCOSIS EN LAS TILAPIAS CAPTURAS**



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> PBE109-22		
<b>Fecha:</b> 22/9/22	<b>Hora:</b> 09:47	
<b>Departamento:</b> La Libertad	<b>Lat:</b> N 14°01.6218'	
<b>Municipio:</b> San Pablo Tacachico	<b>Lon:</b> W 089°19.4428'	
<b>Cantón/Caserío:</b> Atiocoyo		
<b>Número de especies capturadas:</b> 4		
<b>Nombre de la granja/propietario:</b> el pelibuey		
<b>Número de estanque:</b> 1		
<b>SINTOMATOLOGÍA EXTERNA REFERENTE A INFECCIÓN POR <i>Streptococcus spp.</i></b> Rellenar de acuerdo al número de especies positivas (i) entre el número de especies capturadas (T): i/T		
<b>Especies que presentaron natación errática:</b> 1/4		
<b>Especies que presentan exoftalmo</b>	<b>unilateral:</b> 0/4	<b>bilateral:</b> 1/4
<b>Especies que presentan opacidad ocular:</b> 1/4		
<b>Especies que presentan lesiones y/o hemorragias:</b> 0/4		
<b>Especies muertas durante el transporte:</b> 0/4		
<b>Otras observaciones:</b>		

Figura N°25. Hoja para la toma de sintomatología por estreptococosis, PBE109-22. Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> RAE209-22		
<b>Fecha:</b> 26/9/22	<b>Hora:</b> 11:07	
<b>Departamento:</b> La Libertad	<b>Lat:</b> N 14°01.5130'	
<b>Municipio:</b> San Pablo Tacachico	<b>Lon:</b> W 089°19.4763'	
<b>Cantón/Caserío:</b> Atiocoyo		
<b>Número de especies capturadas:</b> 4		
<b>Nombre de la granja/propietario:</b> Atiocoyo		
<b>Número de estanque:</b> 2		
<b>SINTOMATOLOGÍA EXTERNA REFERENTE A INFECCIÓN POR <i>Streptococcus spp.</i></b> Rellenar de acuerdo al número de especies positivas (i) entre el número de especies capturadas (T): i/T		
<b>Especies que presentaron natación errática:</b> 3/4		
<b>Especies que presentan exoftalmo</b>	<b>unilateral:</b> 0/4	<b>bilateral:</b> 2/4
<b>Especies que presentan opacidad ocular:</b> 1/4		
<b>Especies que presentan lesiones y/o hemorragias:</b> 2/4		
<b>Especies muertas durante el transporte:</b> 1/4		
<b>Otras observaciones:</b>		

Figura N°26. Hoja para la toma de sintomatología por estreptococosis, granja RAE209-22.

Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> CPE609-22		
<b>Fecha:</b> 26/9/22	<b>Hora:</b> 13:00	
<b>Departamento:</b> La Libertad	<b>Lat:</b> N 14°00.3773'	
<b>Municipio:</b> San Pablo Tacachico	<b>Lon:</b> W 089°17.5961'	
<b>Cantón/Caserío:</b> Atiocoyo		
<b>Número de especies capturadas:</b> 4		
<b>Nombre de la granja/propietario:</b> CENDEPESCA		
<b>Número de estanque:</b> 6		
<b>SINTOMATOLOGÍA EXTERNA REFERENTE A INFECCIÓN POR <i>Streptococcus spp.</i></b> Rellenar de acuerdo al número de especies positivas (i) entre el número de especies capturadas (T): i/T		
<b>Especies que presentaron natación errática:</b> 1/4		
<b>Especies que presentan exoftalmo</b>	<b>unilateral:</b> 0/4	<b>bilateral:</b> 1/4
<b>Especies que presentan opacidad ocular:</b> 1/4		
<b>Especies que presentan lesiones y/o hemorragias:</b> 0/4		
<b>Especies muertas durante el transporte:</b> 0/4		
<b>Otras observaciones:</b>		

Figura N°27. Hoja para la toma de sintomatología por estreptococosis, granja CPE609-22.

Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> MVE210-22		
<b>Fecha:</b> 3/10/22	<b>Hora:</b> 12:00	
<b>Departamento:</b> La Libertad	<b>Lat:</b> N 14°02.4221'	
<b>Municipio:</b> San Pablo Tacachico	<b>Lon:</b> W 089°18.7842'	
<b>Cantón/Caserío:</b> Atiocoyo		
<b>Número de especies capturadas:</b> 4		
<b>Nombre de la granja/propietario:</b> Manuel Verganza		
<b>Número de estanque:</b> 2		
<b>SINTOMATOLOGÍA EXTERNA REFERENTE A INFECCIÓN POR <i>Streptococcus spp.</i></b> Rellenar de acuerdo al número de especies positivas (i) entre el número de especies capturadas (T): i/T		
<b>Especies que presentaron natación errática:</b> 3/4		
<b>Especies que presentan exoftalmo</b>	<b>unilateral:</b> 0/4	<b>bilateral:</b> 0/4
<b>Especies que presentan opacidad ocular:</b> 0/4		
<b>Especies que presentan lesiones y/o hemorragias:</b> 1/4		
<b>Especies muertas durante el transporte:</b> 0/4		
<b>Otras observaciones:</b>		

Figura N°28. Hoja para la toma de sintomatología por estreptocosis, granja MVE210-22.

Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> ARE210-22		
<b>Fecha:</b> 6/10/22	<b>Hora:</b> 9:03	
<b>Departamento:</b> La Libertad	<b>Lat:</b> N 14°02.3283'	
<b>Municipio:</b> San Pablo Tacachico	<b>Lon:</b> W 089°20.0035'	
<b>Cantón/Caserío:</b> Atiocoyo		
<b>Número de especies capturadas:</b> 4		
<b>Nombre de la granja/propietario:</b> Adolfo Rodríguez		
<b>Número de estanque:</b> 2		
<b>SINTOMATOLOGÍA EXTERNA REFERENTE A INFECCIÓN POR <i>Streptococcus spp.</i></b> Rellenar de acuerdo al número de especies positivas (i) entre el número de especies capturadas (T): i/T		
<b>Especies que presentaron natación errática:</b> 0/4		
<b>Especies que presentan exoftalmo</b>	<b>unilateral:</b> 0/4	<b>bilateral:</b> 0/4
<b>Especies que presentan opacidad ocular:</b> 0/4		
<b>Especies que presentan lesiones y/o hemorragias:</b> 0/4		
<b>Especies muertas durante el transporte:</b> 1/4		
<b>Otras observaciones:</b>  Especies muertas en las orillas del estanque		

Figura N°29. Hoja para la toma de sintomatología por estreptococosis, granja ARE210-22.

Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> YAE310-22		
<b>Fecha:</b> 24/10/22	<b>Hora:</b> 10:37	
<b>Departamento:</b> La Libertad	<b>Lat:</b> N 14°00.5860'	
<b>Municipio:</b> San Pablo Tacachico	<b>Lon:</b> W 089°17.6113'	
<b>Cantón/Caserío:</b> Atiocoyo		
<b>Número de especies capturadas:</b> 4		
<b>Nombre de la granja/propietario:</b> Yanira Alas		
<b>Número de estanque:</b> 3		
<b>SINTOMATOLOGÍA EXTERNA REFERENTE A INFECCIÓN POR <i>Streptococcus spp.</i></b> Rellenar de acuerdo al número de especies positivas (i) entre el número de especies capturadas (T): i/T		
<b>Especies que presentaron natación errática:</b> 0/4		
<b>Especies que presentan exoftalmo</b>	<b>unilateral:</b> 0/4	<b>bilateral:</b> 0/4
<b>Especies que presentan opacidad ocular:</b> 0/4		
<b>Especies que presentan lesiones y/o hemorragias:</b> 0/4		
<b>Especies muertas durante el transporte:</b> 0/4		
<b>Otras observaciones:</b>		

Figura N°30. Hoja para la toma de sintomatología por estreptococosis, granja YAE310-22. Fuente: elaboración propia

**ANEXO N°26**

**INFORME MICROGEN® STREP-ID REFERENTE A LOS CASOS  
POSITIVOS A *S. agalactiae***

## Microgen Strep ID Spanish

### Detalles de muestra

**Fecha** 19/9/2022  
**Referencia de laboratorio** Lab alimentos, CENSALUD  
**Nombre** S.agalactiae ATCC 12386  
**Tipo de muestra** criovial  
**Origen (planta/ubicación)**

### Notas

### Introducción de resultados

**Código octal** 50511  
**+ HIP** Hippurate Hydrolysis    **- AHE** Alpha Haemolysis    **+ BHE** Beta Haemolysis  
**- MEL** Acid from Melibiose    **- SOR** Acid from Sorbitol    **- INU** Acid from Inulin  
**+ LAC** Acid from Lactose    **- ARA** Acid from Arabinose    **+ RIB** Acid from Ribose  
**- ESC** Esculin Hydrolysis    **- VP** Voges Proskauer    **+ PHS** Phosphatase  
**- BGA** B - Galactosidase    **- PYR** Pyrrolidonyl Arylamidase    **+ ARG** Arginine Dihydrolase

### Análisis de identificación

	Streptococcus agalactiae	Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis	Streptococcus dysgalactiae ssp. dysgalactiae	Streptococcus equi subsp.
Opción de ID seleccionada	<b>Sí</b>	No	No	No
Probabilidad	1/8	1/737	1/540,549	1/668,720
Porcentaje de probabilidad	<b>98.86%</b>	1.14%	<0.01%	<0.01%
Similitud	<b>33.33%</b>	0.18%	<0.01%	<0.01%
Cepa aislada humana	<b>Sí</b>	Sí	No	No
Pruebas contrarias				
Prueba 1		BGA(99%)	HIP(0.1%)	HIP(0.1%)
Prueba 2		HIP(15%)	BHE(2%)	SOR(99%)
Prueba 3				ESC(80%)
Pruebas adicionales	<b>Sí</b>	Sí	Sí	Sí
Acid from Mannitol	7%	0.1%	0.1%	0.1%
Acid from Trehalose	<b>99.9%</b>	99%	99%	0.1%
Acid from Glycerol	10%	28%	0.1%	0.1%
Esculin + 6.5% NaCl	30%	0.1%	0.1%	0.1%
Esculin + Bile	30%	0.1%	0.1%	0.1%
Comentarios adicionales	2			
	2. Anteriormente conocida como Streptococcus Group L. Journal of Clinical Microbiology 1998, 36: 1902 - 1906			

### Comentarios de identificación

#### Buena Identificación de Streptococcus agalactiae

La cepa no es típica (es posible que haya una prueba contraria), pero está bien diferenciada del resto de opciones de identificación sugeridas

Figura N°31. Resultados Microgen Strep-ID para cepa ATCC de *S. agalactiae*. Fuente: elaboración propia

## Microgen Strep ID Spanish

### Detalles de muestra

Fecha 28/9/2022  
Referencia de laboratorio Lab alimentos, CENSALUD  
Nombre RAE209-22  
Tipo de muestra pool tilapia  
Origen (planta/ubicación)

### Notas

### Introducción de resultados

Código octal	50111		
+ HIP Hippurate Hydrolysis	- AHE Alpha Haemolysis	+ BHE Beta Haemolysis	
- MEL Acid from Melibiose	- SOR Acid from Sorbitol	- INU Acid from Inulin	
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	+ RIB Acid from Ribose	
- ESC Esculin Hydrolysis	- VP Voges Proskauer	+ PHS Phosphatase	
- BGA B - Galactosidase	- PYR Pyrrolidonyl Arylamidase	+ ARG Arginine Dihydrolase	

### Análisis de identificación

	Streptococcus agalactiae	Streptococcus porcinus	Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis	Streptococcus dysgalactiae ssp. dysgalactiae	Str
Opción de ID seleccionada	Sí	No	No	No	Nr
Probabilidad	1/20	1/105,919	1/736,498	1/2,162,194	1/-
Porcentaje de probabilidad	99.98%	0.02%	<0.01%	<0.01%	<C
Similitud	14.29%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<C
Cepa aislada humana	Sí	Sí	Sí	No	Nr
Pruebas contrarias					
Prueba 1		ESC(99%)	LAC(99.9%)	HIP(0.1%)	HI
Prueba 2		VP(95%)	BGA(99%)	BHE(2%)	Py
Prueba 3		SOR(90%)	HIP(15%)	LAC(80%)	ES
Pruebas adicionales					
Acid from Mannitol	7%	98%	0.1%	0.1%	9Z
Acid from Glycerol	10%	84%	28%	0.1%	0.
Esculin + 6.5% NaCl	30%	0.1%	0.1%	0.1%	1C
Esculin + Bile	30%	0.1%	0.1%	0.1%	0.
Colony Pigmentation	25%	0.1%	0.1%	0.1%	0.
Comentarios adicionales					
2. Anteriormente conocida como Streptococcus Group L. Journal of Clinical Microbiology 1998, 36: 1902 - 1906					

### Comentarios de identificación

#### Identificación Aceptable de Streptococcus agalactiae

La cepa no es típica (es posible que haya una o varias pruebas contrarias), pero está bien diferenciada del resto de opciones de identificación sugeridas

Figura N°32. Resultados Microgen Strep-ID para muestra de tilapia RAE209-22.  
Fuente: elaboración propia

## Microgen Strep ID Spanish

### Detalles de muestra

Fecha 28/9/2022  
Referencia de laboratorio Lab alimentos, CENSALUD  
Nombre CPE609-22  
Tipo de muestra pool tilapia  
Origen (planta/ubicación)

### Notas

### Introducción de resultados

Código octal 50111

+ HIP Hippurate Hydrolysis	- AHE Alpha Haemolysis	+ BHE Beta Haemolysis
- MEL Acid from Melibiose	- SOR Acid from Sorbitol	- INU Acid from Inulin
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	+ RIB Acid from Ribose
- ESC Esculin Hydrolysis	- VP Voges Proskauer	+ PHS Phosphatase
- BGA B - Galactosidase	- PYR Pyrrolidonyl Arylamidase	+ ARG Arginine Dihydrolase

### Análisis de identificación

	Streptococcus agalactiae	Streptococcus porcinus	Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis	Streptococcus dysgalactiae ssp. dysgalactiae	Streptococcus agalactiae ssp. agalactiae
Opción de ID seleccionada	Sí	No	No	No	No
Probabilidad	1/20	1/105,919	1/736,498	1/2,162,194	1/1,000,000
Porcentaje de probabilidad	99.98%	0.02%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Similitud	14.29%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Cepa aislada humana	Sí	Sí	Sí	No	No
Pruebas contrarias					
Prueba 1		ESC(99%)	LAC(99.9%)	HIP(0.1%)	HIP
Prueba 2		VP(95%)	BGA(99%)	BHE(2%)	PHS
Prueba 3		SOR(90%)	HIP(15%)	LAC(80%)	ESC
Pruebas adicionales					
Acid from Mannitol	7%	98%	0.1%	0.1%	92
Acid from Glycerol	10%	84%	28%	0.1%	0.
Esculin + 6.5% NaCl	30%	0.1%	0.1%	0.1%	1C
Esculin + Bile	30%	0.1%	0.1%	0.1%	0.
Colony Pigmentation	25%	0.1%	0.1%	0.1%	0.

### Comentarios adicionales

2. Anteriormente conocida como Streptococcus Group L. Journal of Clinical Microbiology 1998, 36: 1902 - 1906

### Comentarios de identificación

#### Identificación Aceptable de Streptococcus agalactiae

La cepa no es típica (es posible que haya una o varias pruebas contrarias), pero está bien diferenciada del resto de opciones de identificación sugeridas

Figura N°33. Resultados Microgen Strep-ID para muestra de tilapia CPE609-22.  
Fuente: elaboración propia

## Microgen Strep ID Spanish

Detalles de muestra		Notas
Fecha	5/10/2022	
Referencia de laboratorio	Lab alimentos, CENSALUD	
Nombre	MVE210-22	
Tipo de muestra	pool tilapia	
Origen (planta/ubicación)		

Introducción de resultados		
Código octal	50111	
+ HIP Hippurate Hydrolysis	- AHE Alpha Haemolysis	+ BHE Beta Haemolysis
- MEL Acid from Melibiose	- SOR Acid from Sorbitol	- INU Acid from Inulin
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	+ RIB Acid from Ribose
- ESC Esculin Hydrolysis	- VP Voges Proskauer	+ PHS Phosphatase
- BGA B - Galactosidase	- PYR Pyrrolidonyl Arylamidase	+ ARG Arginine Dihydrolase

Análisis de identificación					
Opción de ID seleccionada	Streptococcus agalactiae	Streptococcus porcinus	Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis	Streptococcus dysgalactiae ssp. dysgalactiae	Streptococcus agalactiae ssp. dysgalactiae
Probabilidad	1/20	1/105,919	1/736,498	1/2,162,194	1/1,162,194
Porcentaje de probabilidad	99.98%	0.02%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Similitud	14.29%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Cepa aislada humana	Sí	Sí	Sí	No	No
Pruebas contrarias					
Prueba 1		ESC(99%)	LAC(99.9%)	HIP(0.1%)	HIP(0.1%)
Prueba 2		VP(95%)	BGA(99%)	BHE(2%)	BHE(2%)
Prueba 3		SOR(90%)	HIP(15%)	LAC(80%)	LAC(80%)
Pruebas adicionales					
Acid from Mannitol	7%	98%	0.1%	0.1%	0.1%
Acid from Glycerol	10%	84%	28%	0.1%	0.1%
Esculin + 6.5% NaCl	30%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
Esculin + Bile	30%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
Colony Pigmentation	25%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
Comentarios adicionales					
2. Anteriormente conocida como Streptococcus Group L. Journal of Clinical Microbiology 1998, 36: 1902 - 1906					

**Comentarios de identificación**  
**Identificación Aceptable de Streptococcus agalactiae**  
 La cepa no es típica (es posible que haya una o varias pruebas contrarias), pero está bien diferenciada del resto de opciones de identificación sugeridas

Figura N°34. Resultados Microgen Strep-ID para muestra de tilapia MVE210-22.  
Fuente: elaboración propia

## Microgen Strep ID Spanish

### Detalles de muestra

Fecha 8/10/2022  
Referencia de laboratorio Lab alimentos, CENSALUD  
Nombre ARE210-2250  
Tipo de muestra pool tilapia  
Origen (planta/ubicación)

### Notas

### Introducción de resultados

Código octal 50111

+ HIP Hippurate Hydrolysis	- AHE Alpha Haemolysis	+ BHE Beta Haemolysis
- MEL Acid from Melibiose	- SOR Acid from Sorbitol	- INU Acid from Inulin
- LAC Acid from Lactose	- ARA Acid from Arabinose	+ RIB Acid from Ribose
- ESC Esculin Hydrolysis	- VP Voges Proskauer	+ PHS Phosphatase
- BGA B - Galactosidase	- PYR Pyrrolidonyl Arylamidase	+ ARG Arginine Dihydrolase

### Análisis de identificación

	Streptococcus agalactiae	Streptococcus porcinus	Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis	Streptococcus dysgalactiae ssp. dysgalactiae	Streptococcus agalactiae ssp. agalactiae
Opción de ID seleccionada	Sí	No	No	No	No
Probabilidad	1/20	1/105,919	1/736,498	1/2,162,194	1/1,000,000
Porcentaje de probabilidad	99.98%	0.02%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Similitud	14.29%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Cepa aislada humana	Sí	Sí	Sí	No	No
Pruebas contrarias					
Prueba 1		ESC(99%)	LAC(99.9%)	HIP(0.1%)	HIP
Prueba 2		VP(95%)	BGA(99%)	BHE(2%)	PHS
Prueba 3		SOR(90%)	HIP(15%)	LAC(80%)	ESC
Pruebas adicionales					
Acid from Mannitol	7%	98%	0.1%	0.1%	92%
Acid from Glycerol	10%	84%	28%	0.1%	0%
Esculin + 6.5% NaCl	30%	0.1%	0.1%	0.1%	10%
Esculin + Bile	30%	0.1%	0.1%	0.1%	0%
Colony Pigmentation	25%	0.1%	0.1%	0.1%	0%

### Comentarios adicionales

2. Anteriormente conocida como Streptococcus Group L. Journal of Clinical Microbiology 1998, 36: 1902 - 1906

### Comentarios de identificación

#### Identificación Aceptable de Streptococcus agalactiae

La cepa no es típica (es posible que haya una o varias pruebas contrarias), pero está bien diferenciada del resto de opciones de identificación sugeridas

Figura N°35. Resultados Microgen Strep-ID para muestra de tilapia RAE209-22.  
Fuente: elaboración propia

**ANEXO N°27**

**DATOS PRIMARIOS REFERENTE A DETERMINACIONES DE  
OXIGENO DISUELTO, pH Y TEMPERATURA DEL AGUA DE CULTIVO**



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> EME309-22			
<b>Mes</b>	Septiembre	<b>Departamento</b>	La Libertad
<b>Día</b>	22	<b>Municipio</b>	San Pablo Tacachico
<b>Año</b>	2022	<b>Cantón</b>	Atiocoyo
<b>Hora</b>	10:50	<b>Caserío</b>	-----
<b>Nombre granja/propietario</b>	Emilio Muñoz	<b>N° de estanque</b>	3

Parámetro	1°	2°	3°	Promedio
<b>Oxígeno disuelto (mg/L)</b>	10.42	14.45	10.98	11.95
<b>Potencial de hidrógeno (pH)</b>	8.54	8.77	8.62	8.64
<b>Temperatura (°C)</b>	32.2	32.5	32.2	32.30
<b>Condición climática</b>	Soleado			
<b>Observaciones</b>				

Figura N°36. Hoja de datos in situ y de condición del estanque EME309-22. Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> RAE209-22			
<b>Mes</b>	Septiembre	<b>Departamento</b>	La Libertad
<b>Día</b>	26	<b>Municipio</b>	San Pablo Tacachico
<b>Año</b>	2022	<b>Cantón</b>	Atiocoyo
<b>Hora</b>	10:40	<b>Caserío</b>	-----
<b>Nombre granja/propietario</b>	Atiocoyo	<b>N° de estanque</b>	2

Parámetro	1°	2°	3°	Promedio
<b>Oxígeno disuelto (mg/L)</b>	8.13	8.33	8.1	8.19
<b>Potencial de hidrógeno (pH)</b>	8.78	8.65	8.8	8.74
<b>Temperatura (°C)</b>	31.10	31.18	31.5	31.26
<b>Condición climática</b>	soleado			
<b>Observaciones</b>				

Figura N°37. Hoja de datos in situ y de condición del estanque RAE209-22. Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> CPE609-22			
<b>Mes</b>	Septiembre	<b>Departamento</b>	La Libertad
<b>Día</b>	26	<b>Municipio</b>	San Pablo Tacachico
<b>Año</b>	2022	<b>Cantón</b>	Atiocoyo
<b>Hora</b>	12:48	<b>Caserío</b>	-----
<b>Nombre granja/propietario</b>	CENDEPESCA	<b>N° de estanque</b>	6

Parámetro	1°	2°	3°	Promedio
<b>Oxígeno disuelto (mg/L)</b>	7.63	5.59	5.22	6.15
<b>Potencial de hidrógeno (pH)</b>	8.86	8.86	8.81	8.84
<b>Temperatura (°C)</b>	31.05	30.8	30.9	30.92
<b>Condición climática</b>	Soleado			
<b>Observaciones</b>				

Figura N°38. Hoja de datos in situ y de condición del estanque CPE609-22. Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> MVE210-22			
<b>Mes</b>	Octubre	<b>Departamento</b>	La Libertad
<b>Día</b>	3	<b>Municipio</b>	San Pablo Tacachico
<b>Año</b>	2022	<b>Cantón</b>	Atiocoyo
<b>Hora</b>	11:37	<b>Caserío</b>	-----
<b>Nombre granja/propietario</b>	Manuel Verganza	<b>N° de estanque</b>	2

Parámetro	1°	2°	3°	Promedio
<b>Oxígeno disuelto (mg/L)</b>	2.43	2.74	3.85	3.00
<b>Potencial de hidrógeno (pH)</b>	7.91	8.09	8.18	8.06
<b>Temperatura (°C)</b>	30.43	30.53	30.8	30.59
<b>Condición climática</b>	Soleado			
<b>Observaciones</b>				

Figura N°39. Hoja de datos in situ y de condición del estanque MVE210-22. Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> ARE210-22			
<b>Mes</b>	Octubre	<b>Departamento</b>	La Libertad
<b>Día</b>	6	<b>Municipio</b>	San Pablo Tacachico
<b>Año</b>	2022	<b>Cantón</b>	Atiocoyo
<b>Hora</b>	8:40	<b>Caserío</b>	-----
<b>Nombre granja/propietario</b>	Adolfo Rodríguez	<b>N° de estanque</b>	2

Parámetro	1°	2°	3°	Promedio
<b>Oxígeno disuelto (mg/L)</b>	9.87	5.79	7.17	7.61
<b>Potencial de hidrógeno (pH)</b>	9.18	8.8	9.02	9.00
<b>Temperatura (°C)</b>	31.53	30.5	31.13	31.05
<b>Condición climática</b>	nublado			
<b>Observaciones</b>				

Figura N°40. Hoja de datos in situ y de condición del estanque ARE210-22. Fuente: elaboración propia



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



Determinaciones fisicoquímicas y presencia de *S. agalactiae* en granjas de tilapia (*O. niloticus*)

<b>Código de muestra:</b> HME410-22			
<b>Mes</b>	Octubre	<b>Departamento</b>	La Libertad
<b>Día</b>	27	<b>Municipio</b>	San Pablo Tacachico
<b>Año</b>	2022	<b>Cantón</b>	Atiocoyo
<b>Hora</b>	11:23	<b>Caserío</b>	-----
<b>Nombre granja/propietario</b>	Heriberto Melara	<b>N° de estanque</b>	4

Parámetro	1°	2°	3°	Promedio
<b>Oxígeno disuelto (mg/L)</b>	2.58	2.23	1.86	2.22
<b>Potencial de hidrógeno (pH)</b>	8.31	8.54	8.55	8.47
<b>Temperatura (°C)</b>	30.3	30.2	30.1	30.20
<b>Condición climática</b>	Lluvia leve			
<b>Observaciones</b>	Presencia de envases de plaguicidas cercanos al estanque			

Figura N°41. Hoja de datos in situ y de condición del estanque HME410-22. Fuente: elaboración propia

## ANEXO N°28

### RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES FISICOQUIMICAS REALIZADAS AL AGUA DE CULTIVO

Muestra	Fecha	OD (mg/L)	pH	Temperatura (°C)	Alcalinidad (mg/L)	Dureza (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	Amonio (mg/L)
IGE409-22	20/9/2022	8.37	8.6	31.49	262.67	254.67	2.88	0.009	0.78	1.55
RAE609-22	20/9/2022	7.35	8.7	31.53	283.33	242.67	1.20	0.000	1.66	0.62
PBE109-22	22/9/2022	2.22	8.8	29.40	281.33	310.67	1.84	0.010	1.96	0.49
EME309-22	22/9/2022	11.95	8.6	32.20	286.67	248.00	1.94	0.093	0.65	0.42
JAE109-22	26/9/2022	0.00	8.8	31.09	253.33	253.33	1.77	0.021	0.52	0.13
RAE209-22	26/9/2022	8.19	8.8	31.59	197.33	222.67	5.01	0.062	1.12	0.54
CPE609-22	26/9/2022	6.15	8.8	30.92	224.00	297.33	0.70	0.000	0.65	0.43
JL1/E209-22	29/9/2022	6.66	8.3	32.20	226.67	290.67	4.09	0.056	1.44	0.37
MVE109-22	29/9/2022	2.47	8.3	30.23	196.00	237.33	2.67	0.026	1.56	0.59
JL2/E210-22	3/10/2022	7.15	8.7	32.00	246.67	276.00	3.44	0.026	0.97	0.47
NVE210-22	3/10/2022	4.28	8.9	29.51	241.33	250.67	0.11	0.004	1.08	0.11
MVE210-22	3/10/2022	3.01	8.1	30.59	238.67	273.33	0.07	0.000	2.72	0.14
ARE210-22	6/10/2022	7.61	9.0	31.05	242.67	282.67	0.09	0.016	2.41	0.09
IOE110-22	6/10/2022	3.78	8.3	29.03	177.33	305.33	2.24	0.040	1.28	0.44
YSE410-22	13/10/2022	4.11	9.0	29.78	194.67	278.67	0.01	0.000	1.85	0.48
LFE110-22	13/10/2022	3.96	8.7	30.09	192.00	256.00	0.23	0.032	1.81	0.47
BDE310-22	13/10/2022	5.94	8.7	30.13	190.67	285.33	0.18	0.047	1.31	0.46
ALE410-22	17/10/2022	3.80	7.8	29.33	221.33	285.33	3.20	0.068	0.83	0.74
RRE210-22	17/10/2022	3.87	8.6	29.34	232.00	281.33	0.60	0.033	1.50	0.14
COE110-22	20/10/2022	3.67	8.4	30.07	210.67	296.00	2.01	0.062	4.90	0.38
RCE410-22	20/10/2022	5.21	9.0	29.70	213.33	242.67	0.77	0.007	1.04	0.20
WGE210-22	24/10/2022	2.34	8.3	30.40	237.33	264.00	0.52	0.033	1.94	0.14
YAE310-22	24/10/2022	2.83	8.3	30.23	232.00	262.67	2.54	0.199	1.07	0.11
FRE410-22	27/10/2022	4.41	8.1	27.93	273.33	246.67	1.67	0.026	1.88	0.04
JAE410-22	27/10/2022	2.13	8.9	29.57	217.33	254.67	0.64	0.000	1.35	0.09
HME410-22	27/10/2022	2.22	8.5	30.20	284.00	337.33	0.70	0.000	1.39	0.10

Fuente: elaboración propia

## ANEXO N°29

### UBICACIONES GEOGRAFICAS DE LAS GRANJAS POSITIVAS A *S. agalactiae*

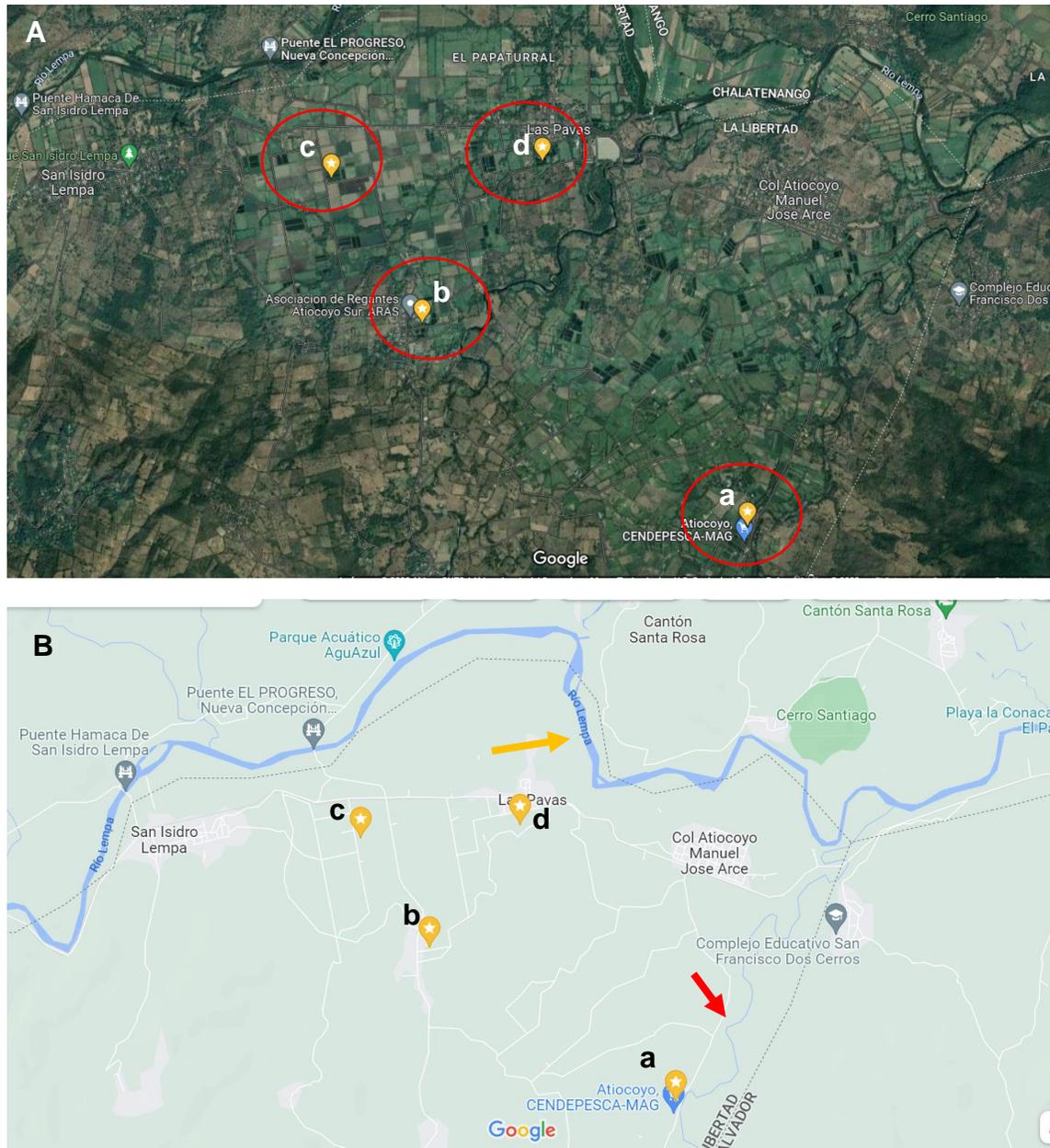


Figura N°47. A) ubicación de las granjas con casos positivos: a) CPC609-22, b) RAE209-22, c) ARE210-22 y d) MVE210-22; B) sistema de riego de las granjas: flecha roja para el Río Sucio y flecha amarilla para el Río Lempa. Fuente: Google maps.

**ANEXO N°30**

**ESTANDARIZACION DE LAS SOLUCIONES DE H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N Y EDTA  
0.01 M**

### A. Estandarización de solución de EDTA 0.01 M

- Se pesó 0.2008 g de estándar de  $\text{CaCO}_3$  para preparar 200.0 mL de solución.
- Se tomaron alícuotas de 10.0 mL de la solución estándar de  $\text{CaCO}_3$ .

$$\frac{0.2008 \text{ g}}{X} \frac{200 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \quad X=0.01004 \text{ g}$$

1 mL = 1 mg de  $\text{CaCO}_3$  (valor de B)

Peso molecular de  $\text{CaCO}_3 = 100.08 \text{ g/mol}$

- Volúmenes de EDTA gastados:

$$V_1 = 11.0 \text{ mL}$$

$$V_2 = 10.7 \text{ mL}$$

$$V_3 = 10.7 \text{ mL}$$

$$M = \frac{\text{g CaCO}_3 \text{ en alícuota}}{V_{\text{EDTA}} \times 100.08}$$

Para  $M_{V_1}$ :

$$M_{V_1} = \frac{(0.01004 \text{ g})}{(11.0 \text{ mL}/1000)(100.08 \text{ g/mol})} = 0.00911 \text{ mol/L}$$

$$M_{V_2}: 0.00937 \text{ mol/L}$$

$$M_{V_3}: 0.00937 \text{ mol/L}$$

$$\bar{M} = 0.00928 \text{ mol/L}$$

$$FC = \frac{0.00928 \text{ M}}{0.01 \text{ M}} = 0.93$$

## B. Estandarización de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N

- Se pesó 0.5018 g de estándar de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para preparar 200.0 mL de solución.
- Se tomaron alícuotas de 10.0 mL de la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

$$\frac{0.5018g}{Y} \quad \frac{200 mL}{10 mL} \quad Y=0.0251 g$$

$$1 mL = 1 mg$$

- Volúmenes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gastados:

$$V_1 = 4.6 mL$$

$$V_2 = 4.5 mL$$

$$V_3 = 4.5 mL$$

$$(3) \quad N = \frac{A \times B}{53.00 \frac{g}{eq} \times C}$$

A= gramos de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para preparar 200.0 mL de solución

B= mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tomados para la titulación

C= mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizados para la titulación

$$N_{V1} = \frac{(0.5018)(10.0)}{(53.0)(4.6)} = 0.02058 N$$

$$N_{V2} = 0.02104 N$$

$$N_{V3} = 0.02104 N$$

$$\bar{N} = 0.0209 N$$

$$FC = \frac{0.0209}{0.02} = 1.05$$

**ANEXO N°31**

**CALCULOS PARA LA DETERMINACION DE ALCALINIDAD, DUREZA,  
CONCENTRACION DE IONES NITRATO, NITRITO, FOSFATO Y  
AMONIO**

### A. Determinación de la alcalinidad

Para muestra IGE409-22 (réplica 1 de 3)

mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N gastado blanco = 0.0 mL

mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N gastados muestra = (12.6 – 0.2) mL = 12.6 mL

*mL corregidos* = (mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N gastados muestra x FC)

*mL corregidos* = 12.6 x 1.05 = 13.2 mL

$$\text{alcalinidad} \left( \frac{\text{mg de CaCO}_3}{L} \right) = \frac{AxNx50000}{\text{mL Mx}}$$

A = 13.2 mL

N = 0.02 N

mL Mx = 50.0 mL

$$\text{alcalinidad} \left( \frac{\text{mg de CaCO}_3}{L} \right) = \frac{13.2 \times 0.02 \times 50000}{50.0}$$

$$\text{alcalinidad} = 264.0 \frac{\text{mg}}{L}$$

Se continúa el procedimiento para las 25 muestras restantes y sus réplicas.

## B. Determinación de la dureza

Para muestra IGE409-22 (réplica 1 de 3)

mL EDTA 0.01 M gastado blanco = 0.0 mL

mL EDTA 0.01 M gastados muestra = (6.9 – 0.0) mL = 6.9 mL

*mL corregidos* = (mL EDTA 0.01 M gastados muestra x FC)

*mL corregidos* = 6.9 x 0.93 = 6.4 mL

$$\text{Dureza total} \left( \frac{\text{mg de CaCO}_3}{L} \right) = \frac{V_{EDTA} \times B \times 1000}{V_{Muestra}}$$

$V_{EDTA} = 6.4 \text{ mL}$

B= 1.0 mL de EDTA 0.01 M equivalen a 1.0 mg de CaCO<sub>3</sub>

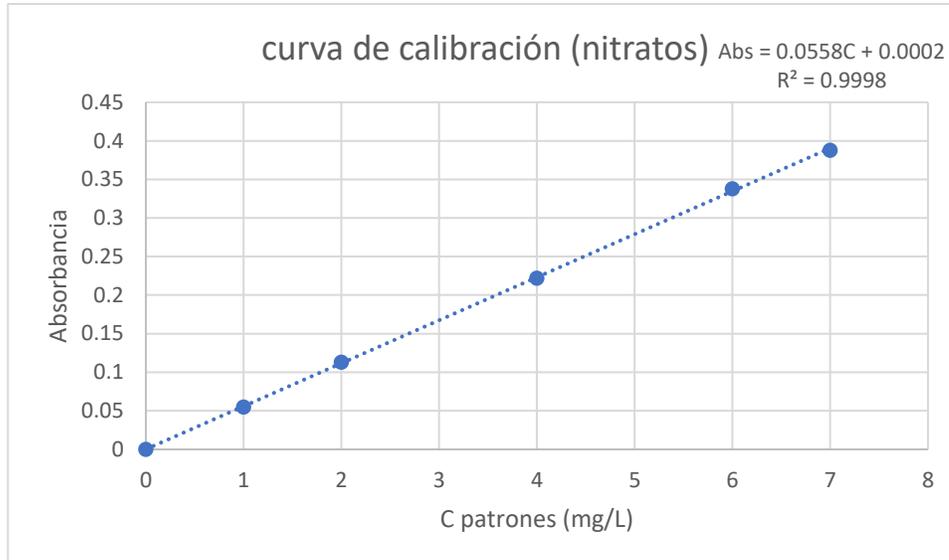
$V_{Muestra} = 25.0 \text{ mL}$

$$\text{Dureza total} \left( \frac{\text{mg de CaCO}_3}{L} \right) = \frac{6.4 \text{ mL} \times 1 \text{ mg de CaCO}_3 \times 1000}{25.0 \text{ mL}}$$

$$\text{Dureza total} = 256.0 \frac{\text{mg}}{L}$$

Se sigue el mismo procedimiento para las 25 muestras restantes y sus réplicas.

### C. Determinación de iones nitrato



Para muestra IGE409-22

$Abs_{220nm} = 0.289$

$Abs_{275nm} = 0.065$

$$Abs_{corregida} = Abs_{220nm} - (2 \times Abs_{275nm})$$

$$Abs_{corregida} = 0.289 - (2 \times 0.065) = 0.159$$

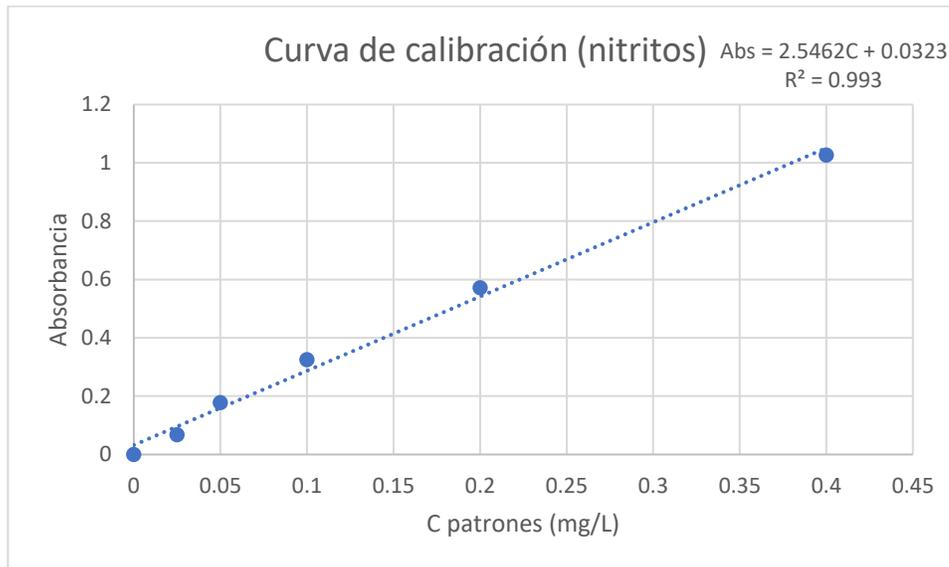
Según gráfico:  $Y(abs) = 0.0558C + 0.0002$

$$C \left( NO_3 \frac{mg}{L} \right) = \frac{0.159 - 0.0002}{0.0558}$$

$$C = 2.8458 \text{ mg/L}$$

Se sigue el mismo procedimiento para las 25 muestras restantes y sus réplicas.

#### D. Determinación de iones nitrito



$Abs_{543nm} = 0.054$

Según gráfico:  $Y(abs) = 2.5462C + 0.0323$

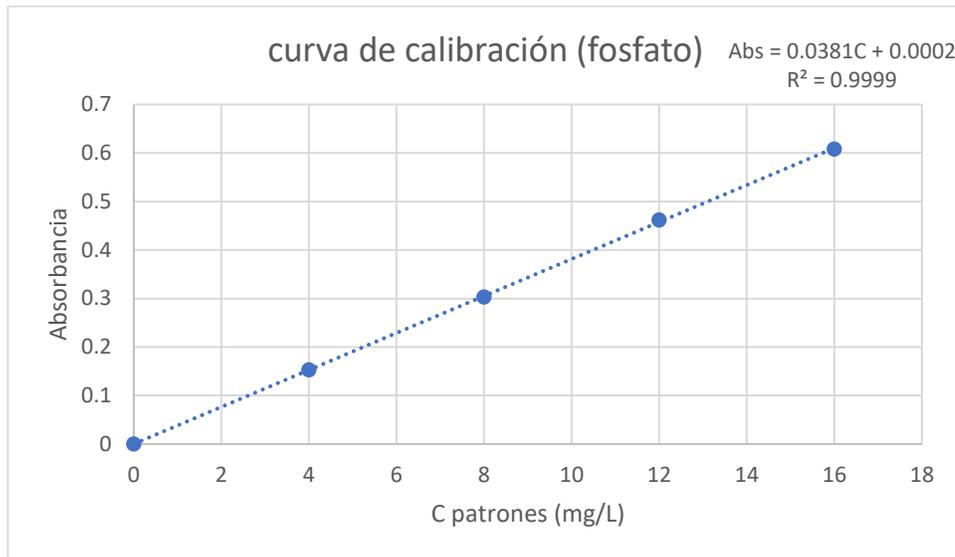
$$NO_2^- \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{(Abs_{Mx} - intercepto)}{pendiente}$$

$$NO_2^- \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{0.054 - 0.0323}{2.5462}$$

$$[NO_2^-] = 0.0085 \text{ mg/L}$$

Se sigue el mismo procedimiento para las 25 muestras restantes y sus réplicas.

## E. Determinación de iones fosfato



$Abs_{420nm} = 0.03$

Según gráfico:  $Y(abs) = 0.0381C + 0.0002$

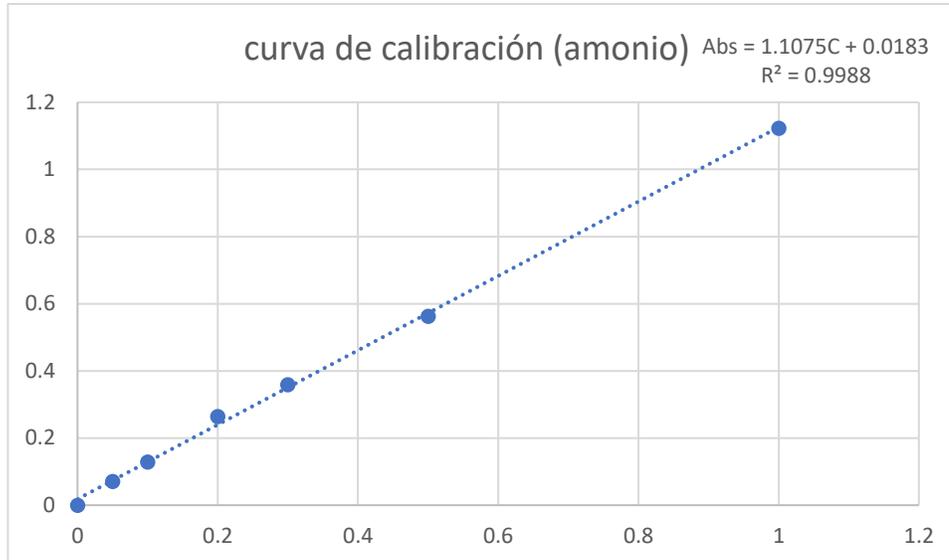
$$PO_4^{3-} \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{(Abs_{Mx} - intercepto)}{pendiente}$$

$$PO_4^{3-} \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{0.03 - 0.0002}{0.0381}$$

$$[PO_4^{3-}] = 0.78 \text{ mg/L}$$

Se sigue el mismo procedimiento para las 25 muestras restantes y sus réplicas.

## F. Determinación de amonio



$Abs_{640nm} = 1.732$

Según gráfico:  $Y(abs) = 1.1075C + 0.0183$

$$NH_4^+ \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{(Abs_{Mx} - intercepto)}{pendiente}$$

$$NH_4^+ \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{1.732 - 0.0183}{1.1075}$$

$$[NH_4^+] = 1.5473 \text{ mg/L}$$

Se sigue el mismo procedimiento para las 25 muestras restantes y sus réplicas.