

4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA

293796

**“COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE
RESISTENCIA DE BACTERIAS
POTENCIALMENTE PATÓGENAS Y NO
PATÓGENAS, ENCONTRADAS
COMÚNMENTE EN ACUARIOS”.**

Tesis Profesional que para obtener el título de

B I Ó L Ó G O

PRESENTAN:

VERÓNICA ARROYO HERRERA

A. FERNANDO GARIBAY VALDIVIA

M. en C. Agustín Ruiz Cabrera
Director de Tesis



Los Reyes Iztacala

2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“DEDICATORIA”.

A “DIOS”:

*Por amarme, darme la vida y ayudarme a hacer
realidad mis sueños.*

A MIS PADRES:

*Teresa y Andrés por enseñarme a vivir y por
quererme incondicionalmente.
Les agradezco infinitamente
los esfuerzos y sacrificios que
han hecho porque salga adelante.*

**A MIS
HERMANOS:**

*Ricardo, Alejandro, Jannet y Leslie:
Por todo el apoyo, comprensión y
cariño brindados.*

A FELIPE:

*Por el amor y el apoyo que
me has dado.*

“AGRADECIMIENTOS”.

- *A MI DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. AGUSTÍN RUIZ CABRERA POR SU VALIOSO APOYO Y AYUDA PARA LA INICIACIÓN Y CULMINACIÓN DE ÉSTE TRABAJO. EN VERDAD “GRACIAS”.*
- *A. FERNANDO GARIBAY VALDIVIA, POR EL TIEMPO Y LOS BUENOS MOMENTOS COMPARTIDOS EN LA REALIZACIÓN DE ÉSTA TESIS.*

A LOS REVISORES DE TESIS:

- *DR VÍCTOR RIVERA AGUILAR, POR EL APOYO, SUGERENCIAS Y CONFIANZA BRINDADOS.*
- *M. EN C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS, POR EL ESPACIO, APOYO Y MOTIVACIÓN BRINDADOS PARA LA REALIZACIÓN DE ÉSTE TRABAJO.*
- *M. EN C. ERIC MONROY PÉREZ, POR SU AYUDA Y VALIOSAS SUGERENCIAS.*
- *BIOL. MARIO A. FERNÁNDEZ ARAIZA, POR LAS FACILIDADES OTORGADAS PARA EL MUESTREO EN EL ACUARIO, ASÍ COMO POR SUS OPINIONES Y SUGERENCIAS.*
- *AL BIOL. ANTONIO MOISÉS CHÁVEZ ARAUJO, POR LA CONFIANZA OTORGADA, POR PERMITIRNOS TRABAJAR EN ALGUNOS DE SUS ESPACIOS Y POR LAS FACILIDADES PARA UTILIZAR MATERIAL Y EQUIPO NECESARIOS.*
- *AL PROF. MARCO ANTONIO ORTIZ, POR SU VALIOSA COOPERACIÓN Y AYUDA EN LA DETERMINACIÓN BACTERIANA.*

- *A LOS PROFESORES: M. EN C. ALBA MÁRQUEZ ESPINOZA, M. EN C. ADOLFO CRUZ GÓMEZ Y BIOL. ASELA RODRÍGUEZ VARELA, POR PERMITIRNOS EL ACCESO A SUS LABORATORIOS DE TRABAJO PARA LA REALIZACIÓN DE LOS MUESTREOS.*
- *A TODOS LOS MIEMBROS DE LOS LABORATORIOS DE DIVERSIDAD VEGETAL I Y DE MEDICINA POR SU COOPERACIÓN EN LA FACILITACIÓN DE MATERIAL, EQUIPO Y MEDIOS DE CULTIVO.*
- *AGRADEZCO TAMBIÉN A MIS AMIGOS: FELIPE, DIANA, DANIEL, KARINA, RICARDO, FERNANDO, BRAULIO, A MI FAMILIA Y A TODOS LOS QUE DE UNA U OTRA MANERA AYUDARON A LA REALIZACIÓN Y CULMINACIÓN DE ÉSTA TESIS.*

Verónica Arroyo Herrera.

ÍNDICE.

	PAG.
<i>RESÚMEN.</i>	1
<i>1) INTRODUCCIÓN.</i>	1
<i>2) ANTECEDENTES.</i>	6
<i>3) OBJETIVOS.</i>	9
<i>4) MATERIAL Y MÉTODO.</i>	10
<i>5) RESULTADOS.</i>	
<i>5.1 Registro y determinación bacteriana.</i>	14
<i>5.2 Patrón de resistencia.</i>	23
<i>6) DISCUSIÓN.</i>	31
<i>7) CONCLUSIONES.</i>	37
<i>8) LITERATURA CITADA.</i>	38

RESUMEN.

La Acuariofilia es una afición que permite la exhibición y comercialización de organismos acuáticos ornamentales, sin embargo el descuido de los acuarios y por lo tanto de los organismos, puede provocar serios problemas como el aumento de poblaciones bacterianas que pueden afectar considerablemente a los peces e incluso llevarlos a la muerte, lo que provoca una pérdida de costos en la comercialización de éstos.

En otros casos, para salvar a los peces enfermos y sin saber a que bacterias atacar, se usan empíricamente varios antibióticos, que en la mayoría de las veces empeoran el problema debido a la resistencia bacteriana.

Por lo que en éste trabajo con la finalidad de determinar la flora bacteriana presentada comúnmente en agua de peceras y conocer el patrón de resistencia a los antibióticos de tales bacterias, se realizaron muestreos en diferentes peceras, se aislaron y determinaron las bacterias encontradas, y posteriormente se realizaron los respectivos antibiogramas con el fin de observar la sensibilidad y/o resistencia de cada una.

Se registraron un total de 100 peceras destinadas para diferentes usos, de las cuales se muestrearon 18, obteniendo los siguientes resultados.

Basado en la morfología macroscópica, se obtuvo un total de 76 colonias diferentes, presentando todas una afinidad al Gram Negativo, con morfología celular principalmente de bacilos.

Se determinó la especie de *Aeromonas salmonicida* y 9 géneros más, a los que no se les pudo realizar la determinación hasta especie. Los géneros fueron: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* (alcalinizadoras), *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* (oxidadoras), *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Plesiomonas* y *Aeromonas*, de los cuales los más frecuentes fueron: *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (alcalinizadoras) representando el 46 % de los aislamientos.

Los antibióticos más efectivos contra los géneros aislados fueron aquéllos cuyo mecanismo de acción es la Inhibición de Síntesis de Proteínas, principalmente los aminoglucósidos; Amikacina, Netilmicina y en primer lugar la Gentamicina ante el cual los géneros bacterianos presentaron sólo el 1.51 % de resistencia.

Los antibióticos menos efectivos fueron los que actúan inhibiendo la Síntesis de Pared Celular, principalmente la Carbenicilina, antibiótico frente al cual los géneros bacterianos mostraron un 100 % de resistencia.

Por lo anterior es indispensable conocer el patrón de resistencia de las bacterias patógenas de peces, antes de sugerir tratamientos quimioterapéuticos que puedan acelerar ó aumentar la resistencia bacteriana.

1) INTRODUCCIÓN.

En México la amplia variedad de peces de ornato marinos y dulceacuícolas representan un gran potencial comercial. **(Jiménez, 1994)**. Resulta relevante hablar de la piscicultura ornamental o acuariofilia, ya que es una afición que permite la conservación de animales, vegetales o ambos, que viven en cautiverio en el medio acuático en depósitos acondicionados para varios fines. Tiene como objetivo producir especies bellas y raras y se ha incrementado notablemente por el interés que se ha desarrollado en el establecimiento de acuarios domésticos y públicos. **(Lemus y cols, 1990)**.

Desafortunadamente existen algunas desventajas dentro de esta afición, puesto que los organismos acuáticos son susceptibles a enfermedades de tipo genético, nutricional o funcional, siendo una limitante en la producción piscícola. **(Fernández, 1994)**, también se encuentran las enfermedades de tipo infeccioso causadas por virus, bacterias, hongos, protozoarios, helmintos y artrópodos que aparecen de manera esporádica o periódica afectando de manera importante la producción de peces ornamentales. **(Hernández, 1986; Jiménez y cols, 1988)**.

Existen enfermedades en los peces de ornato que son aún poco comprendidas, debido a que no ocurren por un evento aislado sino que es el resultado de las interacciones entre el patógeno, el pez y el medio ambiente, las cuales se pueden presentar en cualquier momento y ser difíciles de controlar, **(Noga, 1996; Murray y cols, 1996)** ocasionando de esta forma una alta mortalidad tanto en criaderos como en peces silvestres, reduciendo así la producción y generando aumento de costos. **(Cellucci y cols, 1995)**. Esto es debido en parte a que los microorganismos se encuentran en un porcentaje considerable de individuos sanos y normales los cuales albergan continuamente patógenos potenciales sin presentar síntomas ni lesión alguna. **(Avila, 1997)**.

A pesar de que los parásitos son los organismos patógenos frecuentemente encontrados en esta afición, los acuarios no están exentos del crecimiento de bacterias, ya que son sistemas ideales para su crecimiento. Las bacterias se pueden encontrar en altas cantidades en los acuarios debido a los aportes de materia orgánica, adición de alimento y acumulación de heces de los organismos en cautiverio, de tal manera que los peces están suspendidos en una solución de microorganismos que se encuentran en continuo contacto con su cuerpo, penetrando por el tracto digestivo con el agua y siendo parte de su microflora normal, manifestándose según la especie del pez debido a su susceptibilidad típica, patogenicidad del germen, influencia del ambiente y manejo de los organismos, permitiendo así la colonización de algunas superficies corporales que se encuentran dañadas. **(Fernández, 1994)**.

Dentro de las bacterias patógenas de peces más comunes, se encuentran las que pertenecen al género *Aeromonas* (*Aeromonas spp*) que pueden bajo ciertas condiciones medioambientales adversas causar infecciones serias en la mayoría de los peces de ornato, siendo capaces de causar septicemia hemorrágica bacteriana. Dos de las especies más comunes de éste género son: *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas tarda*, causantes de la furunculosis. Existen bacterias oportunistas de peces que se encuentran presentes en las aguas naturales, como el género *Pseudomonas*, el cual puede infectar a la mayoría de los peces de ornato bajo ciertas condiciones de estrés, ocasionando septicemia y necrosis en los extremos de la aleta caudal. (Cellucci y cols, 1995).

De manera general, las bacterias gramnegativas como Enterobacterias, *Pseudomonas* y *Vibrio*, responsables de septicemias y distintas lesiones son causantes importantes de altas mortalidades en peces, ya sea por infecciones latentes en peces sintomáticos o asintomáticos. (Jiménez y cols. 1985). Los géneros: *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* son importantes debido a los riesgos de salud públicos asociados con ellos y a la capacidad de infectar peces ornamentales marinos. (Lowrie y cols, 1999).

Se puede detectar a un pez enfermo cuando presenta ciertas señales, por ejemplo si tiene las aletas demasiado pegadas al cuerpo, no come por más de dos días, tiene manchas visibles, lesiones o parches blancos, abre la boca a la superficie del agua, flota o se encuentra en las superficies del acuario, hace giros rápidos nadando de forma irregular, o bien si los peces que son activos están inactivos o viceversa. (Thompson, 2000).

Algunos de éstos síntomas pueden atacarse cambiando las condiciones del acuario, por lo que es indispensable tener los acuarios bajo condiciones óptimas de limpieza, temperatura, luz, oxígeno, alimento, pH, nitratos y nitritos. (Jiménez y cols. 1985). Para el control de las enfermedades bacterianas, antes del uso de agentes quimioterapéuticos, se recomienda la prevención. Probablemente del 80 al 90% de las enfermedades en peces de cautiverio pueden ser prevenidas evitando el estrés, ya que éste debilita el sistema inmunológico y genera un aumento en la susceptibilidad para las infecciones bacterianas. (Thompson, 2000).

Si con éstas medidas profilácticas no se logra evitar las infecciones bacterianas en los peces, el manejo adecuado de la terapéutica con el uso de agentes antibacterianos suele ser un recurso favorable.

La investigación de microorganismos en los peces se debe realizar cuando están vivos, recientemente sacrificados o inmediatamente después de su muerte. Para después obtener una determinación bacteriana más rigurosa y específica a nivel del fenotipo a través de los caracteres de Familia o Género de cada organismo. (Inglis y cols. 1993).

La terapéutica de los peces de ornato puede ser aplicada incorporando el medicamento en el alimento, por tratamiento externo; desde una aplicación tópica hasta la inmersión en algún agente químico, o bien el tratamiento parenteral, que se encuentra restringido para las áreas de investigación y a los sementales de producción. (Avila, 1997; Morales y Colón, 1986). La terapéutica en los peces de ornato hasta la fecha ha sido aplicada de manera empírica al nivel de granjas y negocios establecidos pasando varias generaciones, el uso de los antibióticos aplicados en diversos padecimientos identificados de forma sencilla, no reúnen la comprobación experimental y diagnóstico necesario para su uso en las enfermedades bacterianas (Avila, 1997), por lo que es indispensable realizar una determinación bacteriana para observar la resistencia y/o sensibilidad de éstas a los antibióticos, con el fin de aplicar mejores terapéuticas.

Los antibióticos son aquellas sustancias generalmente producidas por microorganismos los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, o matar otra clase de microorganismos. (Smith, 1990; Murray y cols. 1996; González, 1994). Se conoce una amplia variedad de antibióticos los cuales pueden actuar a través de uno o más de los siguientes mecanismos de acción: A) Inhibición de la síntesis de la pared celular; B) Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos; C) Inhibición de la síntesis proteica; D) Inhibición de la síntesis de la membrana plasmática y además E) Inhibición de metabolismo intermediario.

Las Penicilinas y Cefalosporinas son análogas a una unidad estructural (D-alanyl-D-alanina) de la pared celular de muchas bacterias. Éstos antibióticos son ligados covalentemente a las proteínas celulares relacionadas con la penicilina (PBP's); enzimas responsables para la construcción ó modificación de pared celular bacteriana. La relación con las PBP's inhibe ó previene la unión de la estructura de la pared celular y causan incremento en la permeabilidad celular, filtración y muerte. También hay evidencia del dispare de procesos enzimáticos activos que lleva a la degradación de la pared celular. (Frisby, 1994).

Un grupo de medicamentos bactericidas que comparten características químicas, antimicrobianas, farmacológicas y de toxicidad son los aminoglucósidos, éstos ejercen su acción interfiriendo en la síntesis de proteínas bacterianas, por unión al ribosoma. Entre ellos se encuentran antibióticos ampliamente utilizados como la Gentamicina, la Netilmicina y la Amikacina, que son útiles contra la mayoría de organismos gramnegativos. El sitio de acción de los aminoglucósidos es la subunidad ribosomal 30S cuya interacción causa errores de lectura del RNAm ocasionando inhibición de la síntesis de proteínas. Las bacterias inactivan éstos antibióticos sintetizando enzimas modificadoras codificadas en plásmidos. Existen a sí mismo otros mecanismos de resistencia a aminoglucósidos, como el bloqueo del transporte del antibiótico al sitio de acción, modificación de ribosomas y permeabilidad al antibiótico.

Existen otros antibióticos como el Cloranfenicol que penetra en la bacteria por difusión facilitada y se une a la subunidad 50S del ribosoma, causando inhibición de la síntesis de proteínas, esto impide la translocación del aminoacil RNAt cargado en el ribosoma. La resistencia a Cloranfenicol se debe a la presencia de una enzima intracelular, Cloranfenicol acetil transferasa (CAT), existente tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas. Ésta enzima acetila los dos grupos hidroxilo y previene la unión del Cloranfenicol al ribosoma 50S.

Las Quinolonas son fármacos antimicrobianos derivados del ácido nalidíxico, con una alta actividad contra organismos gramnegativos. La introducción de un átomo de flúor a la estructura básica de las quinolonas, produjo un grupo de antibióticos en el cual se encuentra la Pefloxacina. Las Quinolonas actúan sobre la DNA girasa. **(Departamento de Biología Molecular, 1994).**

La Nitrofurantoina pertenece a un grupo de drogas antibacterianas sintéticas, con actividad contra una gran variedad de gérmenes tanto grampositivos como negativos. Este grupo de antibióticos destruye a los microorganismos actuando como inhibidores específicos del metabolismo enzimático de los hidratos de carbono en las células bacterianas y a su vez, tienen la capacidad de lesionar la pared bacteriana provocando esferoplastos. **(Méndez, 1986).**

Las sulfonamidas son agentes bacteriostáticos producidos por síntesis química. Actúan bloqueando la síntesis de ácido tetrahidrofólico necesario como donador de grupos metilo en la síntesis de precursores de ácidos nucleicos. Así mismo, las sulfonamidas son análogos estructurales del ácido p-aminobenzoico (PABA), que se une con un compuesto pterilina para formar ácido dihidropteridina, precursor del ácido tetrahidrofólico.

Las sulfonamidas son útiles contra diversas enfermedades producidas por bacterias gramnegativas, ya sea solas ó en combinación con el Trimetoprim, el cual también inhibe la producción de ácido tetrahidrofólico, pero lo hace bloqueando a la enzima dihidrofolato reductasa. Su especificidad por las bacterias se basa en su afinidad mucho mayor por la reductasa bacteriana que por la enzima humana. El Trimetoprim se emplea con frecuencia en combinación con el Sulfametoxazol, lo que permite que los mutantes bacterianos resistentes por un fármaco sean inhibidos por el otro y que bloqueen la síntesis a un grado mayor que la suma de las inhibiciones causadas por cada fármaco por separado. **(Jawetz, 1998; Levinson, 1998 y Krupp, 1993).**

Los antibióticos están perdiendo su efectividad, ya que el uso de éstos empezó a aumentar a una proporción rápida, ocasionando resistencia antimicrobiana. Este problema de resistencia antibiótica causa un futuro imprevisible para humanos, animales y peces. **(Levy, 1998.).**

Las bacterias usan varias estrategias para volverse resistentes a los antibióticos. Por ejemplo, las bacterias gramnegativas no son afectadas por la penicilina G ya que ésta no puede penetrar la membrana externa de la envoltura celular bacteriana, o bien una bacteria resistente puede desviar el área inhibida ó aumentar la producción de un metabolito específico, por ejemplo, las bacterias para defenderse contra la acción de las sulfonamidas, aumentan el rango de producción de ácido fólico.

Otro mecanismo de resistencia a los antibióticos es el bombeo de la droga fuera de la célula después de que ha entrado, estos bombeos no son específicos y pueden así librar a la célula de muchos antibióticos diferentes. En otros casos algunas cepas bacterianas pueden atacar el efecto de una droga modificándola químicamente a través de hidrólisis ó adición de grupos.

Si la resistencia se transfiere de una bacteria a otra, interviene entonces el cromosoma bacteriano, algunas bacterias simplemente adquieren los genes de resistencia a las drogas de sus predecesores, éstos genes son transportados sobre pequeños fragmentos circulares de ADN independientes del cromosoma bacteriano conocidos como plásmidos, que pueden transferirse entonces de una bacteria a otra a través de un proceso de conjugación. La transferencia de genes de resistencia a las drogas puede ocurrir también a través de transducción, en éste caso un virus llamado fago obtiene un gen de resistencia de una bacteria. Otra forma de que una bacteria adquiera resistencia es vía mutación espontánea en el cromosoma, la cual altera la estructura y, por lo tanto la función de una proteína específica, este proceso puede generar una nueva característica de resistencia ó fortalecer una ya existente. (Levy, 1998 y Prescott, 1998).

Para la determinación a la resistencia bacteriana habitualmente se enfrenta al microorganismo a estudiar con distintas concentraciones de antibióticos en condiciones estándares. (González, 1994). Se ha mencionado los métodos de difusión y dilución en agar los cuales han sido utilizados ampliamente empleando la técnica de discos, pocillos o bien de cilindros. (Merck, 1994). Para determinar la sensibilidad de los microorganismos infectantes se emplean la técnica de dilución que utiliza antimicrobianos incorporados a medios de cultivo líquidos o sólidos o bien la técnica de difusión en la cual se utilizan discos de papel filtro impregnados de antimicrobianos depositados en un medio de cultivo sólido. (Perea, 1992 y Bigaux, 1985).

Es imperativo disponer algún método para determinar la sensibilidad del germen infectante ya que los diferentes microorganismos varían en su sensibilidad frente a agentes antimicrobianos. (González, 1994). Incluso existen agentes patógenos para los que aún no se ha descubierto un antibiótico eficaz, por lo tanto es un proceso continuo la búsqueda de nuevos y mejores medicamentos ya que no existe uno que sea efectivo contra todos los agentes microbianos. (Seeley, 1972).

2) ANTECEDENTES

Barker y Kehoe. En 1995 compararon el halo de inhibición y el crecimiento de *Aeromonas salmonicida* en cinco diferentes medios de cultivo, usando dos técnicas estandarizadas: por estría cruzada y por movimientos giratorios. Para medir los halos de inhibición ocuparon 8 multidiscos comerciales, encontrando para ambas técnicas que el agar Mueller-Hinton (MHA) soporta el crecimiento de ésta bacteria y produce halos de inhibición claramente definidos.

Boonyaratpalin. En 1989 menciona que no está comprobado, que la infección bacteriana primaria con *Aeromonas hydrophila* sea la causa del síndrome ulcerativo (enfermedad que afecta a peces tanto de criadero como de ambiente natural), debido a que *A. hydrophila* está involucrada usualmente en infecciones secundarias y no se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos afectando al pez, además menciona que ésta bacteria fue altamente sensible al Cloranfenicol, Kanamicina y Trimetoprim con Sulfametoxazol.

De-Mondino y cols. En 1995 aislaron 46 cepas de agua dulce y agua salada encontrando principalmente a *Plesiomonas shigelloides*. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos indicaron que todos los aislamientos fueron sensibles a las Cefalosporinas, Penicilinas combinadas con un inhibidor de betalactamasa, Aminoglucósidos, Norfloxacin, Tetraciclina, Cloranfenicol y Trimetoprim con Sulfametoxazol. Todos los aislamientos fueron resistentes a las Penicilinas.

Dixon. En 1991 reportó que hay un decremento en la eficacia de los antibióticos que afectan la síntesis de proteínas como tetraciclina y eritromicina; los aminoglucósidos como la neomicina; antimetabolitos como las sulfa y sulfonamidas potenciadas; y los quinolones como el ácido oxilínico que se usan contra bacterias patógenas de peces (*Clostridium*, *Eubacterium*, *Renibacterium*, *Edwardsiella* y *Aeromonas*) cuando hay un tratamiento quimioterapéutico excesivo, lo que también ocasiona un estrés en los peces provocando una mayor susceptibilidad.

Ganzhorn y cols. En 1992 menciona que un patógeno normalmente es estudiado cuando la mortalidad en los peces es muy alta y cuando la enfermedad es provocada por una bacteria cuya identificación basándose en los síntomas de los peces no es muy clara. También menciona que los organismos pueden estar presentes en números pequeños, encontrarse en organismos portadores siendo difíciles de encontrar dificultando su estudio en el laboratorio.

Kemeza y Vitoniene. En 1996 mencionan que los virus producen cambios necróticos degenerativos de órganos interiores, produciendo a los peces una mayor susceptibilidad a intoxicación alimentaria por bacterias debido al desorden de sus funciones vitales. También mencionan que las terapias quimioterapéuticas son usadas en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades como la eritrodermatitis de la carpa (*Cyprinus carpio*) y que antes del tratamiento es importante definir la sensibilidad de las bacterias patógenas aisladas de los peces.

Kitao y cols. En 1989 observaron la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la Amoxicillina (AMPC) en *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* y *Streptococcus sp*, encontrando que la Amoxicillina mostró una alta actividad antibacterial contra *Pasteurella piscicida*.

Lio-Po y cols. En 1987 realizaron aislamientos bacterianos de *Oreochromis niloticus* débiles, observando el crecimiento predominante de *Pseudomonas sp*. Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos revelaron una marcada sensibilidad de *Pseudomonas sp* a la Clortetraciclina, Colistin, Kanamicina, Oxitetraciclina y Polimixina B, y resistencia a la Nitrofurantoina así como al Trimetoprim con Sulfametoxazol.

MacPhearson y cols. En 1991 encontraron un total de 6284 aislamientos de bacterias en el intestino del pez gato (*Arius melanopus*), muestras de agua y sedimento de 22 estanques. Demostraron una máxima resistencia en dos antibióticos (Kanamicina y Ampicilina) de los seis probados. También se aislaron bacterias resistentes a la tetraciclina y oxitetraciclina en las muestras de agua. La microflora determinante en las muestras de sedimento fue *Plesiomonas shigelloides* (41.9% del total de los aislamientos) y en las muestras de agua *Aeromonas hydrophila* con un 28.1%.

Nakamura y cols. En 1996 probaron los efectos de la lisozima-galactomanosa y lisozima-ácido palmítico conjugados administrados oralmente en *Cyprinus carpio* infectada con *Edwardsiella tarda*, obteniendo un rango de sobrevivencia de 30% y 20% respectivamente. También encontraron que éstos tienen una actividad lítica alrededor de 80 a 71% de lisozima nativa usando *Micrococcus* como sustrato. Estos resultados demuestran que las lisozimas conjugadas son un buen método terapéutico en las infecciones bacterianas de peces.

Padilla y cols. En 1996 usaron al bactericin R10 originalmente aislada de sedimentos de agua contra bacterias enterotoxigénicas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*. La exposición con el antibiótico duró cinco días alcanzando su máxima inhibición para todas las cepas en el segundo día.

Pai y cols. En 1995 demostraron el efecto de algunos factores estresantes sobre las infecciones por *Aeromonas hydrophila* en *Cyprinus carpio*. Encontrando que la dosis letal media inyectada intraperitonealmente en los peces es de 1.3×10^3 matando al 50% de la población. La mortalidad fue proporcional al grado y tipo de estrés, ambos importantes en las infecciones de peces con *A. hydrophila*.

Shotts y cols. En 1976 realizando estudios bacteriológicos encontraron que las bolsas donde se transportan los peces pueden contener bacterias patógenas, cuando examinaron los tejidos de los peces encontraron 18 géneros de bacterias, de los cuales 14 géneros fueron asociados con el agua de origen. Siendo los dos microorganismos predominantes *Pseudomonas* spp. (No *aeruginosa*) y *Aeromonas hydrophila*. Otros organismos encontrados fueron *Citrobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium* y *Flavobacterium*. Ellos concluyen que los parásitos y bacterias eran comunes en la comida de los peces cultivados y en las especies ornamentales.

Smith y cols. En 1994 mencionan que el uso de agentes antimicrobianos utilizados en acuicultura se ha incrementado debido a la frecuencia de cepas resistente a estos agentes (plásmidos de resistencia en el ambiente natural), a la información limitada disponible y a la variación de los métodos usados. A éste respecto los autores proponen que es importante la estandarización de un método para las pruebas de sensibilidad de bacterias patógenas de peces, ya que la alta frecuencia de cepas resistentes indica que el uso de agentes antimicrobianos ha reducido las opciones terapéuticas para tratar las enfermedades.

Starliper y Rodgers. En 1998 utilizaron cepas de *Edwardsiella ictaluri* y *Aeromonas salmonicida* resistentes al Romet® (una sulfonamida potenciada) las cuales generan septicemia entérica en el pez gato (*Arius melanopus*) y furunculosis en salmónidos respectivamente. Utilizando primers de ADN ellos encontraron que dicha resistencia es producida por la presencia de un R-plásmido transferible de 55 Kb cuya secuencia de ADN es homóloga para ambas cepas bacterianas, esta condición es necesaria para su transferencia y unión entre las diferentes bacterias.

Stoffregen y cols. En 1996 demostraron que el *Streptococcus iniae* induce lesiones en robalos los cuales fueron tratados con enroflaxin ya que demostró ser efectivo en las pruebas de susceptibilidad en contra de ésta cepa. Las dosis que emplearon fueron: 10 mg/kg. de peso seco y 5 mg/kg. de peso seco para 10 días, mostrando una mortalidad final de 10.83% y 16.97% respectivamente. Los residuos de este medicamento se detectaron a través de un ensayo microbiológico en gran cantidad y larga duración en varios tejidos para las dosis empleadas. El enroflaxin parece tener un potencial excelente como agente quimioterapéutico para tratar enfermedades bacterianas susceptibles en el robalo.

Verdonck y cols. En 1991 aislaron 300 cepas de cultivos de alimento vivo para peces de agua de mar y agua dulce, identificándolas con el sistema api20e y ácidos grasos comparando con cepas de referencia, los géneros encontrados fueron: *Listonella*, *Photobacterium*, *Vibrio* y *Alteromonas*.

3) OBJETIVOS

- *Determinar la flora bacteriana comúnmente presente en agua de peceras.*
- *Encontrar el patrón de resistencia a las bacterias aisladas de agua de peceras.*
- *Detectar los géneros bacterianos en los que se ubican las especies potencialmente patógenas para peces.*

Verdonck y cols. En 1991 aislaron 300 cepas de cultivos de alimento vivo para peces de agua de mar y agua dulce, identificándolas con el sistema api20e y ácidos grasos comparando con cepas de referencia, los géneros encontrados fueron: *Listonella*, *Photobacterium*, *Vibrio* y *Alteromonas*.

3) OBJETIVOS

- *Determinar la flora bacteriana comúnmente presente en agua de peceras.*
- *Encontrar el patrón de resistencia a las bacterias aisladas de agua de peceras.*
- *Detectar los géneros bacterianos en los que se ubican las especies potencialmente patógenas para peces.*

4) MATERIAL Y MÉTODO

Se registraron las diferentes peceras ubicadas en los Laboratorios de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Campus Iztacala: Laboratorio de Ecología de Peces, Laboratorio de Diversidad Vegetal I, Laboratorio de Metodología Científica IV y V y el Acuario, donde se mantienen organismos en condiciones controladas.

De cada una de las peceras se anotó el volumen, densidad poblacional y uso, así como el tipo de antiséptico empleado.

Se realizó la clasificación de las peceras en base a su uso de la siguiente manera:

Ornamental —————> Laboratorio de Diversidad Vegetal I.

Investigación-Exhibición —————> Acuario.

Investigación-Crecimiento —————> Lab. de Metodología Científica IV y V.

Investigación-Reproducción —————> Laboratorio de Ecología de Peces.

Se registraron las peceras y se obtuvo el tamaño de muestra representativo mediante la siguiente fórmula estadística:

$$\eta = \frac{Z^2 (p \cdot q)}{e^2}$$

(Hurley, y cols, 1981)

η = Tamaño de la muestra
 e = Error permitido (0.01)
 p = probabilidad de acierto
 q = probabilidad de error
 Z = Se obtiene de tabla

La selección de las peceras se obtuvo por medio de las tablas de dígitos aleatorios, en algunos casos hubo números que se repetían tomándose el inmediato posterior, garantizando con esto el muestreo en todos los laboratorios ya referidos.

Se realizó la esterilización de las cajas petri, pipetas para extracción de muestra, los tubos de ensaye de 16 x 150 mm con tapón de rosca y las pipetas de 0.1, 1, 5 y 10 ml en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Posteriormente con las pipetas de extracción con bulbo de succión, se tomó de cada una de las 18 peceras a muestrear, 20 ml del agua previamente homogeneizada con una varilla de vidrio estéril, depositando el contenido en tubos de ensaye de 16 x 150 mm con tapón de rosca para transportarlos inmediatamente al Laboratorio de Microbiología de Medicina y Laboratorio de Diversidad Vegetal I.

Se realizó la preparación de los diferentes medios de cultivo: caldo lactosado con rojo de fenol (cat. 7661) a concentración sencilla, agar infusión cerebro-corazón (BHI, cat. 13825), agar eosina- azul de metileno-lactosa-sacarosa (EMB, cat. 1347), agar Mc conkey (McK, cat. 5465), agar nutritivo (cat. 5350), agar Mueller Hinton (MHA, cat. 5437), agar Mueller Hinton con sangre de carnero (MHS), agar bilis verde brillante (VB), agar S-110 (cat. 5469), agar base (cat. 10886) y agar sangre.

Para ello se pesó la cantidad de agar en una balanza granataria y se vaciaron en matraces de 1000 ml con agua destilada hasta que el medio se disolvió, después se esterilizó el medio en una autoclave a 120°C durante 15 min. Posteriormente se vaciaron 20 ml de los diferentes medios en cada una de las cajas petri previamente esterilizadas, excepto el agar Mueller Hinton al que se le agregaron 18 ml del medio, después se guardaron en refrigeración para su próximo uso. (Merck, 1994).

De cada una de las muestras de agua tomada de las peceras se depositó con una pipeta estéril 0.1 ml en el centro de los medios sólidos, dispersando el contenido con una asa microbiológica calibrada, en el caldo lactosado con rojo de fenol se depositó 1 ml de la muestra homogeneizando el contenido con movimientos vibratorios. Se utilizó una pipeta para cada muestra trabajando en áreas estériles.

Las cajas petri sembradas se incubaron de 24 a 72 hrs. a 25°C, pasado éste tiempo se describió la morfología colonial: tamaño, color (tonalidades), forma (puntiforme, redonda y ovalada), elevación (convexo y plano), superficie (lisa y rugosa), borde (regular e irregular), comportamiento a la luz transmitida (translúcida y opaca) y comportamiento a la luz reflejada (brillante o mate). (Linch, y cols 1972)

Las colonias que crecieron en los medios antes mencionados se reseleccionaron en el medio en el que creció el mayor número de colonias, dividiendo previamente la caja del medio de cultivo seleccionado en las partes necesarias de acuerdo a la cantidad de colonias que crecieron en cada caja, detectando así colonias comunes y semejantes evitando la duplicidad de aislamientos. Para obtener colonias separadas se utilizó la técnica de estría cruzada, una vez sembradas se incubaron a 25°C de 24 a 72 hrs.

Para obtener la colonia aislada se realizaron resiembras con asa microbiológica calibrada por el método de estría cruzada en el medio seleccionado (V B) ya que en éste se apreciaban mejor las características de la mayoría de las colonias, posteriormente se incubaron a 25°C de 24 a 72 hrs. De las colonias bacterianas se describió la morfología colonial, se realizaron frotis y tinción de Gram para observar la agrupación, la afinidad al Gram y la morfología celular.

Se realizaron las pruebas bioquímicas siguientes para la determinación de las colonias bacterianas encontradas: Hierro Kligler, (utilización de glucosa, lactosa y producción de gas y ácido sulfhídrico, cat. 3913), Vogues Proskauer con rojo de fenol (producción de acetil metil carbinol) y Rojo de Metilo (MR-VP, cat. 5712), SIM (producción de ácido sulfhídrico e indol, cat. 5470), Citrato de Simmons (cat. 2501) y Urea (producción de amoniaco, cat. 8483). Degradación de los carbohidratos Glucosa (ácido, álcali y neutro, cat. 8338) y Lactosa (producción de gas, cat. 7661), Catalasa y Oxidasa, así como la movilidad observada en el medio SIM. (Merck, 1994). Los resultados permitieron registrar el grupo o el género de las bacterias encontradas en las aguas de las diferentes peceras. (Bergey, 1991 y Cowan, 1993).

Cabe aclarar que después de éste procedimiento y debido al lento crecimiento de algunas cepas, se perdieron 10 de ellas.

Para determinar el patrón de resistencia de las bacterias encontradas, éstas se inocularon en tubos con agua destilada estéril, comparando su turbidez con el estándar 0.5 de Mc Farland (densidad óptica de 0.125 a 550 nm de λ), una vez comparado cada tubo se inocularon masivamente con un hisopo estéril en el agar Mueller Hinton cuidando que la siembra cubriera toda la superficie de la caja. Para las cepas de difícil crecimiento se utilizó el agar Mueller Hinton con 5% de sangre de camero desfibrinada, posteriormente se depositó un multidisco comercial impregnado con los siguientes antibióticos: Trimetoprim con Sulfametoxazol (SXT), Amikacina (AK), Ampicilina (AM), Carbenicilina (CB), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CTX), Ceftriaxona (CRO), Cloranfenicol (CL), Gentamicina (GE), Netilmicina (NET), Nitrofurantoína (NF) y Pefloxacina (PEF). (Giono, 1983; Bauer y Kirby, 1966).

Enseguida las cajas se incubaron a 25°C de 24 a 72 hrs, pasado éste tiempo se midieron los halos de inhibición con una regla trasparente y dependiendo de éste diámetro y comparando con las tablas del proveedor se les asignó un valor de susceptible, moderadamente susceptible, intermedio o resistente para cada una de las cepas y se determinó cuales son los mejores antimicrobianos y las cepas mas sensibles.

Una vez utilizadas las cepas bacterianas, con un asa microbiológica se tomó y sembró cada una en tubos de 16 x 150 mm con agar de infusión cerebro-corazón (BHI, cat. 13825) para su conservación en refrigeración.

Se registraron los resultados obtenidos y se aplicaron las técnicas apropiadas de organización (depuración y ordenamiento de datos) y presentación (elaboración de tablas y gráficas). (Diagrama 1)

MATERIAL Y MÉTODO.

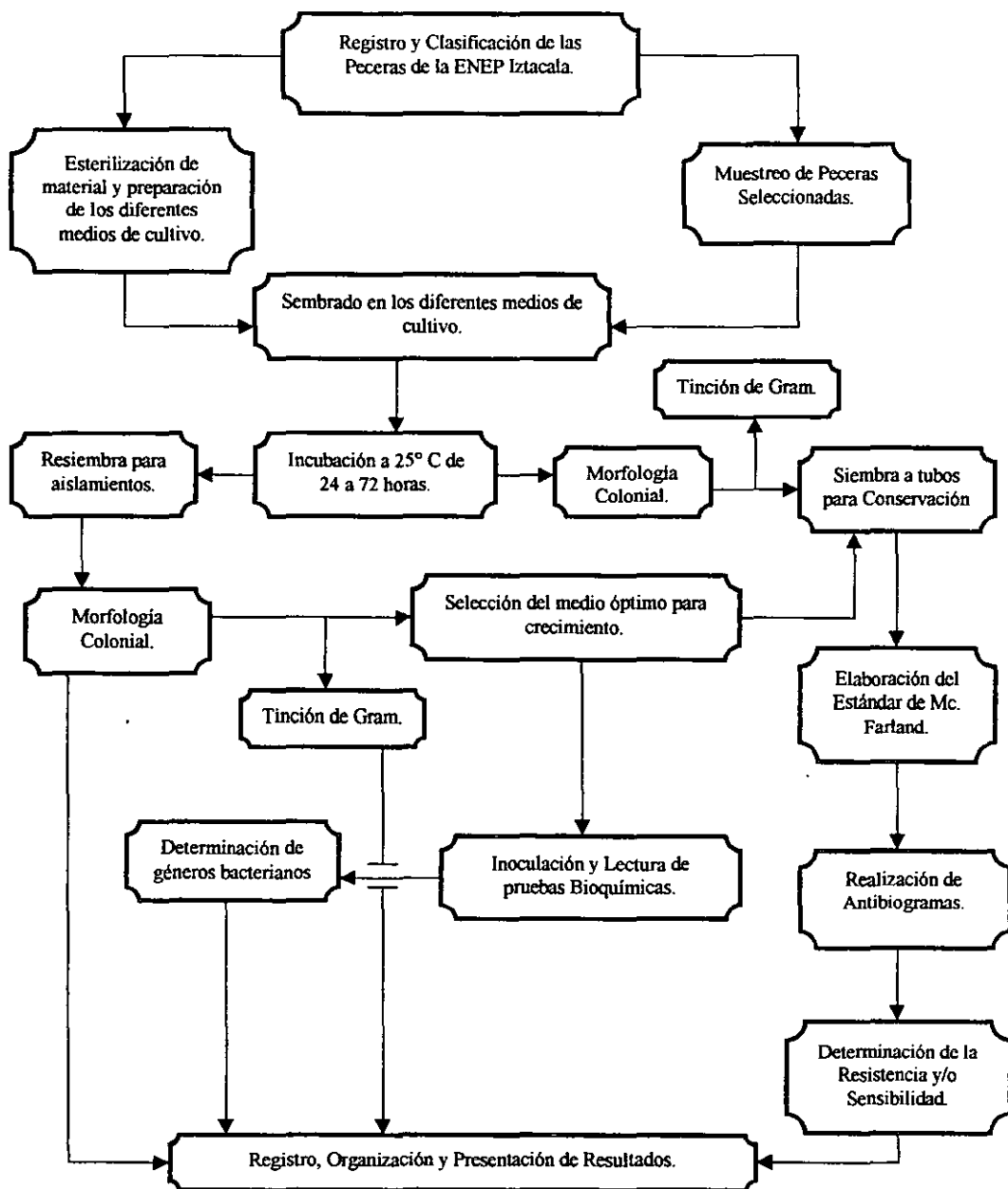


DIAGRAMA. 1

5) RESULTADOS.

5.1 Registro y determinación bacteriana.

Se registraron 100 peceras en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, que se clasificaron según su uso. El número calculado para el total a muestrear fue de 18 peceras. (Tabla 1)

TABLA 1.

CLASIFICACIÓN DE PECERAS EN BASE A SU USO, Y NÚMERO DE PECERAS MUESTREADAS.

USO	CANTIDAD	MUESTREADAS
Ornato	2	2
Investigación- Exhibición	40	7
Investigación- Crecimiento	15	2
Investigación- Reproducción	43	7
Total	100	18

Se obtuvo un total de 76 colonias diferentes, y se describió la morfología colonial de cada una. El (Esquema 1) muestra las características coloniales registradas y la cantidad de colonias correspondiente a tales características.

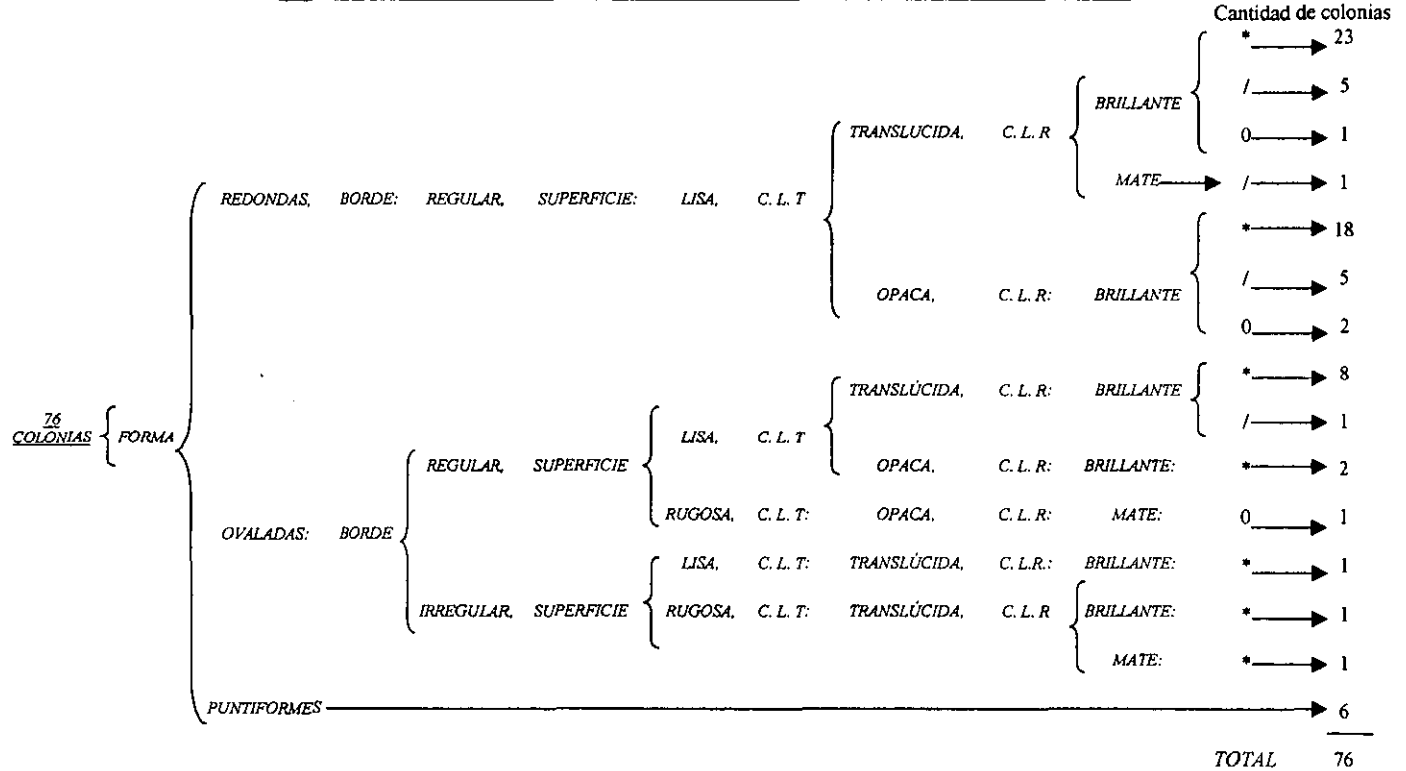
Las características coloniales encontradas con mayor frecuencia están representadas en la siguiente tabla, donde destaca el dato de que 73 de las 76 son brillantes y sólo 3 mate, al igual que 67 presentaron el borde regular y 9 irregular, frecuencia idéntica para la superficie lisa y rugosa respectivamente. (Tabla 2)

TABLA 2

CARACTERÍSTICAS COLONIALES MÁS FRECUENTES.

CARACTERÍSTICAS COLONIALES	CARACTERÍSTICA MÁS FRECUENTE	CANTIDAD DE COLONIAS
Forma	Redonda	55
Borde	Regular	67
Superficie	Lisa	67
Comp. a la luz reflejada	Brillante	73
Comp. a la luz transmitida	Translúcida	48
Comp. en el medio	Alcalinizan	58

"CARACTERÍSTICAS COLONIALES OBSERVADAS EN AGAR BILIS VERDE BRILLANTE"



C. L. T= Comportamiento a la luz transmitida
 C. L. R= Comportamiento a la luz reflejada
 * = Alcalinizan el medio

/ = Acidifican el medio
 0 = Comportamiento neutro en el medio.

ESQUEMA 1

Se realizaron frotis de cada una de las 76 colonias obtenidas, observándose en todas la presencia de una afinidad al Gram negativo, 64 presentaron la forma de bacilo y 69 se agruparon en forma aislada. (Tabla 3)

TABLA 3.
CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS EN LOS FROTIS

CARACTERÍSTICA OBSERVADA	CARACTERÍSTICA PRESENTE	CANTIDAD DE COLONIAS
Afinidad al Gram	Negativo	76
	Positivo	0
Morfología celular	Bacilos	64
	Cocobacilos	12
	Aisladas	69
Agrupación	Cadenas predominantes y algunas aisladas	2
	Algunas en cadena, la mayoría aisladas	2
	Algunas cadenas, algunas aisladas	1
	Formando pequeños racimos, algunos pares aislados.	2

Aunque se presentaron grupos de colonias con algunas características semejantes en cuanto a morfología colonial, su comportamiento fue diferente en algunas pruebas bioquímicas. Lo anterior se muestra con los grupos de 23, 18 y 8 colonias con características de morfología colonial similares dentro de cada grupo, representados en el (Esquema 1).

Las pruebas bioquímicas tomadas en cuenta para la realización de los siguientes esquemas fueron: Citrato de Simmons, Ácido Sulhídrico, Indol, Voges Proskauer, Rojo de Metilo, que sean Fermentadoras, No Fermentadoras u Oxidadoras, así como la Movilidad observada en el medio SIM. (Esquemas 2, 3 y 4).

Las 76 colonias resultaron positivas a las pruebas de catalasa y oxidasa, por lo que se omiten en los esquemas.

"PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y MOVILIDAD".

<u>23</u> COLONIAS	{ MOVILIDAD {	{ (+) CITRATO {	{ (+) SULF {	(+)	INDOL	(+)	V. P	(+)	R. M	{ (+) F → 1 (-) O → 1		
				(-)	INDOL	(-)	V. P	(-)	R. M		(-)	N. F → 6
			{ (-) SULF {	(+)	INDOL	(+)	V. P	{ (+) R. M (-) R. M	(-)	O → 1		
				(-)	V. P	(-)	R. M		(-)	F → 1		
			{ (-) INDOL {	(+)	V. P	(-)	R. M	(+)	F → 1			
				(-)	V. P	(-)	R. M	(-)	N. F → 4			
		{ (+) CITRATO {	(+)	SULF	(-)	INDOL	(-)	V. P	(-)	R. M	(-)	N. F → 4
			(-)	SULF	(-)	INDOL	(-)	V. P	(-)	R. M	(-)	N. F → 3

TOTAL 23

(+) = Positivo
 (-) = Negativo
 CITRATO = Citrato de Simmons

SULF = Ácido Sulfhídrico
 V. P = Vogues Proskauer.
 R. M = Rojo de Metilo

F = Fermentadoras
 N. F = No Fermentadoras
 O = Oxidadoras

ESQUEMA 2

"PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y MOVILIDAD".

$\frac{18}{\text{COLONIAS}}$ { MOVILIDAD }	(+) CITRATO	(+) SULF	(+) INDOL	(+) V. P	(+) R. M	Cantidad de colonias			
						(+) O → 1	(-) O → 3		
		(-) INDOL	(+) V. P	(-) R. M	(-) O → 2	(-) O → 1	(-) N. F → 5		
								(-) V. P	(-) R. M
	(-) CITRATO	(-) SULF	(+) INDOL	(-) V. P	(-) R. M	(-) N. F → 2			
							(-) SULF	(-) INDOL	(-) V. P
								TOTAL	18

(+) = Positivo
 (-) = Negativo
 CITRATO = Citrato de Simmons

SULF = Ácido Sulfhídrico
 V. P = Vogues Proskauer
 R. M = Rojo de Metilo

F = Fermentadoras
 N. F = No Fermentadoras
 O = Oxidadoras

ESQUEMA 3

"PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y MOVILIDAD"

		Cantidad de colonias											
$\frac{8}{\text{COLONIAS}}$	{ MOVILIDAD	{ (+) CITRATO	(+)	SULF	(-)	INDOL	(-)	V. P	(-)	R. M	(-)	N. F	→ 4
			(-)	SULF	(-)	INDOL	(-)	V. P	(-)	R. M	(-)	N. F	→ 1
		{ (-) CITRATO	(+)	SULF	(-)	INDOL	(-)	V. P	(-)	R. M	(-)	N. F	→ 2
			(-)	SULF	(-)	INDOL	(-)	V. P	(-)	R. M	(-)	N. F	→ 1
TOTAL												8	

(+) = Positivo
 (-) = Negativo
 CITRATO = Citrato de Simmons

SULF = Ácido Sulfhídrico
 V. P = Vogues Proskauer
 R. M = Rojo de Metilo

F = Fermentadoras
 N. F = No Fermentadoras
 O = Oxidadoras

ESQUEMA 4

Se ubicaron a las colonias en sus grupos correspondientes de acuerdo a las características y comportamiento de cada una de ellas. Notando, que la mayoría (35) pertenecen al grupo 7.5 y ninguna a los grupos 7.2, 7.9 y 7.10. (Tabla 4)

TABLA 4.

CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS A LOS QUE PERTENECEN LAS COLONIAS ENCONTRADAS

GRUPO	CARACTERÍSTICAS DEL GRUPO	CANT. DE COLONIAS
7.2	Bacterias gram negativas, estrictamente anaerobias	0
7.3	Cocos ó bacilos gram negativos, aerobios, no móviles	12
7.4	Cocobacilos ó bacilos cortos gram negativos no móviles, estrictamente aerobios, catalasa positivos, no oxidan muchos carbohidratos	4
7.5	Bacilos gram negativos móviles, estrictamente aerobios, catalasa y oxidasa positivos, producen ácido sólo de pocos carbohidratos	35
7.6	Bacilos gram negativos estrictamente aerobios, catalasa y oxidasa positivos, producen ácido de muchos azúcares, móviles, excepto (<i>Pseudomonas mallei</i>)	12
7.7	Bacilos gram negativos, no móviles a 37° C, aerobios y anaerobios facultativos, oxidasa positiva, atacan azúcares fermentativamente	1
7.8	Bacilos gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, móviles, catalasa y oxidasa positivos, atacan azúcares fermentativamente, muchas especies reducen nitratos	12
7.9	Enterobacterias, bacilos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, oxidasa negativa, atacan azúcares fermentativamente, reducen nitratos a nitritos	0
7.10	Bacilos gram negativos de difícil crecimiento, requieren de condiciones muy especiales para su aislamiento y crecimiento en cultivos	0

Fuente: Cowan, 1993.

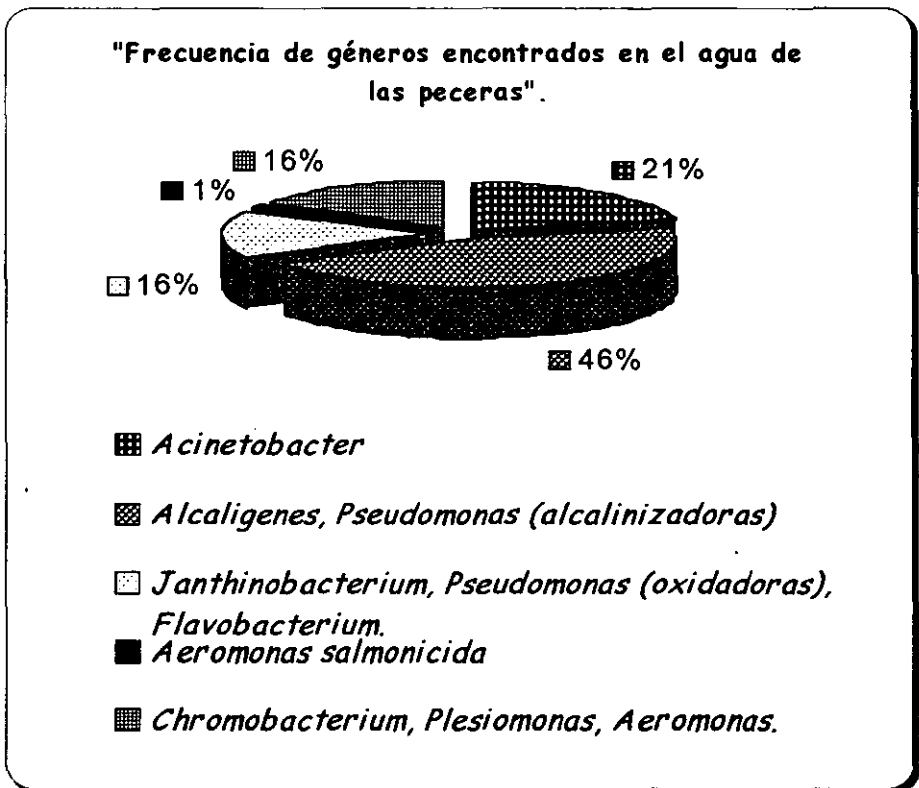
En la siguiente tabla se presentan los géneros encontrados, así como la cantidad de éstos en las diferentes categorías de peceras según su uso. Destacando que los géneros *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (alcalinizadoras) poseen 19 representantes, aislados de peceras para Investigación-Reproducción, 9 de peceras para Investigación- Exhibición, 5 de Investigación- Crecimiento y 2 de peceras Ornamentales, dando un total de 35 (46 %). Por el contrario, sólo se registra 1 aislamiento de *Aeromonas salmonicida* en Investigación- Exhibición. Cabe destacar que hubo 30 y 26 aislamientos de los diferentes géneros en Investigación-Reproducción y en Investigación-Exhibición respectivamente. (Tabla 5)

TABLA 5.

**GÉNEROS BACTERIANOS AISLADOS DEL AGUA DE LAS
DIFERENTES PECERAS MUESTREADAS.**

GÉNEROS ENCONTRADOS	ORNAMENTAL	INVEST. EXHIBICIÓN	INVEST. CRECIMIENTO	INVEST. REPRODUCCIÓN	TOTAL	(%)
<i>Acinetobacter</i>	4	7	1	4	16	21
<i>Alcaligenes,</i> <i>Pseudomonas</i> (alcalinizadoras)	2	9	5	19	35	46
<i>Janthinobacterium,</i> <i>Pseudomonas</i> (oxidadoras) <i>Flavobacterium</i>	1	6	1	4	12	16
<i>Aeromonas salmonicida</i>	0	1	0	0	1	1
<i>Chromobacterium,</i> <i>Plesiomonas,</i> <i>Aeromonas</i>	4	3	2	3	12	16
TOTAL	11	26	9	30	76	100

En la gráfica que se presenta a continuación se puede apreciar la frecuencia en la que se presentaron los géneros encontrados en el agua de las peceras, destacando a *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (alcalinizadoras) con la frecuencia más alta (46 %) y *Aeromonas salmonicida* con la menor frecuencia (1 %). (Gráfica 1).



GRÁFICA 1

5.2 Patrón de Resistencia

Los antibiogramas sólo se aplicaron a 66 cepas debido al lento crecimiento y posterior pérdida de 10 de ellas.

El comportamiento de las bacterias en cuanto a la resistencia y sensibilidad que presentaron frente a los 12 antibióticos utilizados, se ve representado en la siguiente tabla. En donde observamos la cantidad de cepas y el porcentaje correspondiente a tal numero, resultando que 18 cepas, correspondientes al (27.27 %) fueron resistentes a 5 antibióticos y sensibles a 7, así como 14 (21.21 %) presentaron resistencia a 4 antibióticos y sensibilidad a 8. Un total de 12 cepas (18.18 %) fueron resistentes a la mitad de los antibióticos y sensibles a la otra. Podemos notar que ninguna mostró resistencia o sensibilidad a 11 y 12 antibióticos y sólo una presentó sensibilidad a 10 antibióticos. (Tabla 6)

TABLA 6.

EFFECTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS

CANT. DE CEPAS	RESISTENTES N.	SENSIBLES N.	PORCENTAJE (%)
	Ab	Ab	
1	2	10	1.51
8	3	9	12.12
14	4	8	21.21
18	5	7	27.27
12	6	6	18.18
7	7	5	10.60
4	8	4	6.06
2	9	3	3.03
0	10	2	0
TOTAL: 66			100

Se ordenaron a los antibióticos basándose en su eficacia frente a las cepas, observando que 65 fueron sensibles a la Gentamicina, 63 a la Amikacina y el mismo número a la Netilmicina. La Pefloxacina también mostró eficacia, ya que 58 cepas fueron sensibles a este antibiótico. La Carbenicilina, fue el antibiótico al que todas las cepas presentaron resistencia. Para la Cefalotina hubo 65 cepas resistentes y sólo 1 sensible; en cuanto a la Ampicilina 62 fueron resistentes y 4 sensibles. (Tabla 7)

TABLA 7.

CANTIDAD DE CEPAS RESISTENTES Y SENSIBLES A LOS DIFERENTES ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS.

ANTIBIÓTICOS	RESISTENTES	SENSIBLES
GE	1	65
AK	3	63
NET	3	63
PEF	8	58
CRO	10	56
CL	14	52
SXT	16	50
NF	35	31
CTX	60	6
AM	62	4
CF	65	1
CB	66	0

NOTA: En la columna "Sensibles" se consideran los Intermedios, los Medianamente Sensibles y los Muy Sensibles.

SXT = Trimetoprim con Sulfametoxazol

AK = Amikacina

AM = Ampicilina

CB = Carbenicilina

CF = Cefalotina

CTX = Cefotaxima

CRO = Ceftriaxona

CL = Cloranfenicol

GE = Gentamicina

NET = Netilmicina

NF = Nitrofurantoína

PEF = Pefloxacina

Basado en las tablas de los proveedores de multidiscos para antibiogramas, se tomaron en cuenta los niveles de Muy Sensibles, Intermedios, y Medianamente Sensibles correspondientes a la Sensibilidad a los antibióticos. El primer nivel se aplicó para todos los antibióticos, el segundo nivel se aplica para todos exceptuando a la Cefotaxima (CTX) y a la Ceftriaxona (CRO), ya que estos pueden pertenecer al tercer nivel de donde se excluyen a los demás. Lo anterior generó los siguientes resultados: 64 cepas fueron Muy Sensibles a la Gentamicina y sólo 1 mostró Sensibilidad Intermedia. Para la Amikacina y la Netilmicina 60 y 62 cepas fueron Muy Sensibles respectivamente, quedando 3 con Sensibilidad Intermedia para el primer antibiótico y una para el segundo. Por el contrario, hubo más cepas de Sensibilidad Intermedia a la Pefloxacina (37) y sólo 21 fueron Muy Sensibles. Para el Cloranfenicol 41 cepas entraron en el nivel de Muy Sensibles y 11 en el Intermedio. Con respecto a la Ceftriaxona se presentaron 35 cepas Muy Sensibles y 21 con Sensibilidad Intermedia. Las 6 cepas que presentaron sensibilidad a la Cefotaxima entraron todas en el nivel de Medianamente Sensibles. (Tabla 8)

TABLA 8.

DIFERENTES NIVELES DE SENSIBILIDAD

ANTIBIOTICO	MUY SENSIBLE	INTERMEDIO	MEDIANAMENTE SENSIBLE
GE	64	1	-
AK	60	3	-
NET	62	1	-
PEF	21	37	-
CRO	35	-	21
CL	41	11	-
SXT	47	3	-
NF	28	3	-
CTX	0	-	6
AM	2	2	-
CF	1	0	-
CB	0	0	-

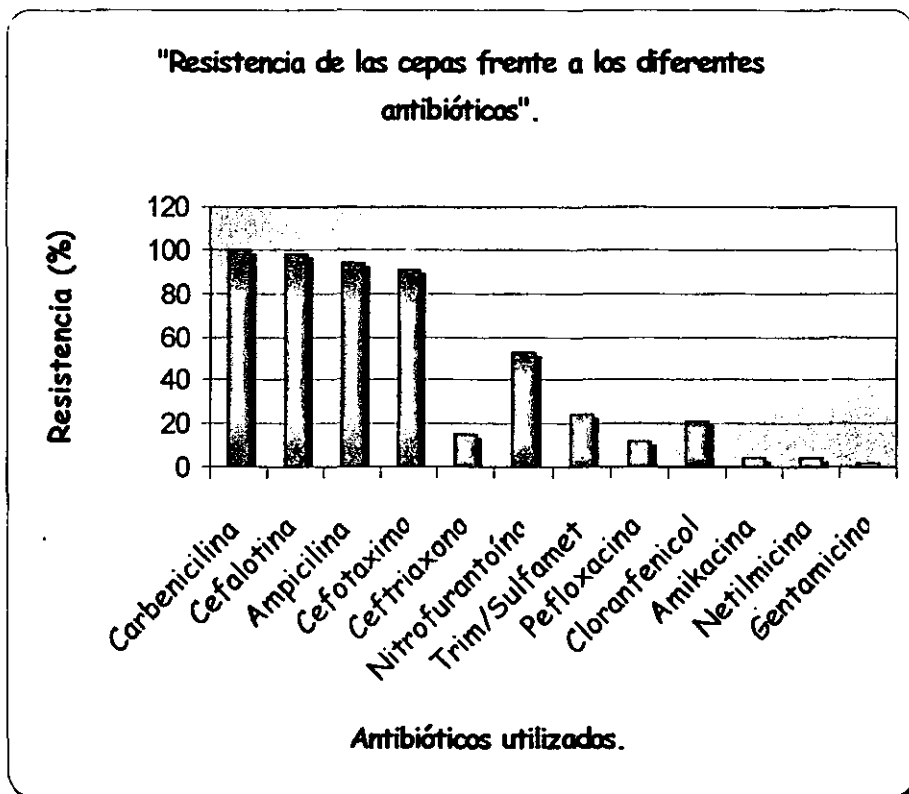
A continuación se presentan los porcentajes de Resistencia y Sensibilidad para cada antibiótico utilizado. El mayor porcentaje con respecto a la Sensibilidad es de (98.48 %), correspondiente a la Gentamicina, y el mayor porcentaje con respecto a la Resistencia lo muestra la Carbenicilina con un (100 %). (Tabla 9)

TABLA 9.

RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS PARA CADA ANTIBIÓTICO

ANTIBIÓTICO	RESISTENCIA (%)	SENSIBILIDAD (%)
GE	1.51	98.48
AK	4.54	95.45
NET	4.54	95.45
PEF	12.12	87.87
CRO	15.15	84.84
CL	21.21	78.78
SXT	24.24	75.75
NF	53.03	46.96
CTX	90.90	9.09
AM	93.93	6.06
CF	98.48	1.51
CB	100	0

Retomando la columna de resistencia de la tabla anterior se realizó la siguiente gráfica con el fin de observar claramente las diferencias de resistencia para cada antibiótico utilizado, y comparar su eficacia frente a las cepas, notando que para la Carbenicilina se presentó la resistencia más alta y para la Gentamicina la resistencia más baja con un 100 y 1.51 % respectivamente. (Gráfica 2).



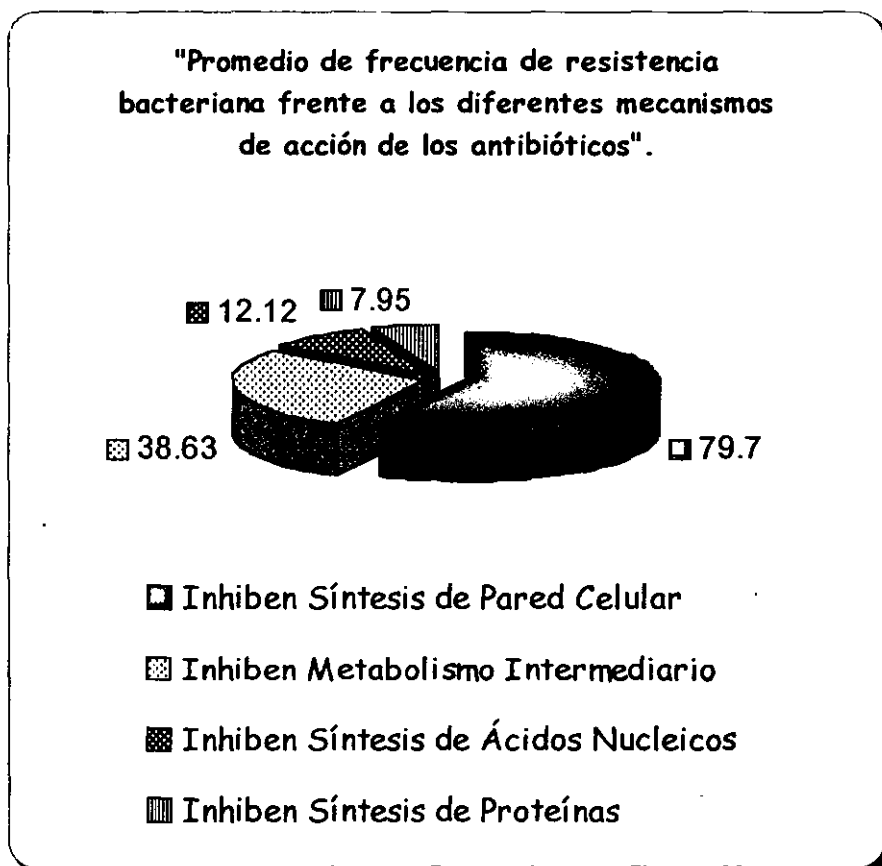
GRÁFICA 2

Se agruparon a los antibióticos basándose en su mecanismo de acción y se relacionaron con la cantidad de cepas que presentaron resistencia ante cada uno de ellos. De los antibióticos que inhiben síntesis de pared celular, se puede observar que el total de las cepas (66) presentaron resistencia frente a la Carbenicilina, y 10 presentaron resistencia ante la Ceftriaxona, cantidad de cepas más bajo para éste mecanismo de acción. Los antibióticos que inhiben metabolismo intermediario son la Nitrofurantina y el Trimetoprim con Sulfametoxazol, con 35 y 16 cepas resistentes respectivamente. La Pefloxacina pertenece a los antibióticos que inhiben síntesis de ácidos nucleicos, presentando 8 cepas resistentes. Para los antibióticos que inhiben síntesis de proteínas, el Cloranfenicol presentó 14 cepas resistentes como número más alto y la Gentamicina el número más bajo con sólo una resistente. (Tabla 10).

TABLA 10.
MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS Y CANTIDAD DE CEPAS QUE PRESENTARON RESISTENCIA PARA CADA UNO.

MECANISMO DE ACCIÓN	ANTIBIÓTICO	CANT. DE CEPAS
Inhiben Síntesis de Pared Celular	Carbenicilina	66
	Cefalotina	65
	Ampicilina	62
	Cefotaxima	60
	Ceftriaxona	10
Inhiben Metabolismo Intermediario	Nitrofurantoina	35
	Trimetop. / Sulfametox.	16
Inhiben Síntesis de Ácidos Nucleicos	Pefloxacina	8
Inhiben Síntesis de Proteínas	Cloranfenicol	14
	Amikacina	3
	Netilmicina	3
	Gentamicina	1

Tomando en cuenta los mecanismos de acción de los antibióticos, se obtuvo el promedio de las frecuencias de resistencia bacteriana, notando que aquéllos que inhiben síntesis de pared celular fueron el grupo frente a los que se presentó el mayor promedio de resistencia (79.7). Para el grupo de antibióticos que inhiben síntesis de proteínas sólo se observó un promedio de resistencia de (7.95). (Gráfica 3).



GRÁFICA 3

Relacionando los antibióticos con los géneros bacterianos encontrados, tenemos que: la Gentamicina, la Netilmicina, la Amikacina, el Cloranfenicol y el Trimetoprim con Sulfametoxazol fueron los antibióticos más eficaces contra la mayoría de los géneros bacterianos aislados de las diferentes peceras. (Tabla 11).

TABLA 11.
EFFECTIVIDAD DE LOS ANTIBIÓTICOS PARA LOS GÉNEROS BACTERIANOS AISLADOS.

GÉNEROS	ABS. EFICACES	ABS. INEFICACES
<i>Acinetobacter</i>	Gentamicina, Netilmicina, Amikacina, Trimetoprim con Sulfametoxazol, Ceftriaxona.	Carbenicilina, Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Nitrofurantoína, Cloranfenicol, Pefloxacina.
<i>Alcaligenes,</i> <i>Pseudomonas</i> (<i>alcalinizadoras</i>)	Gentamicina, Amikacina, Netilmicina, Trimetoprim con Sulfametoxazol, Cloranfenicol	Carbenicilina, Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Nitrofurantoína, Ceftriaxona, Pefloxacina.
<i>Janthinobacterium,</i> <i>Pseudomonas</i> (<i>oxidadoras</i>), <i>Flavobacterium</i>	Gentamicina, Cloranfenicol, Netilmicina, Ceftriaxona, Amikacina, Trimetoprim con Sulfametoxazol.	Ampicilina, Carbenicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Nitrofurantoína, Pefloxacina.
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Gentamicina, Netilmicina, Cloranfenicol, Nitrofurantoína, Ceftriaxona.	Ampicilina, Carbenicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Pefloxacina, Amikacina, Trimetoprim con Sulfametoxazol
<i>Chromobacterium,</i> <i>Plesiomonas,</i> <i>Aeromonas</i>	Gentamicina, Cloranfenicol, Netilmicina, Amikacina, Nitrofurantoína, Trimetoprim con Sulfametoxazol.	Carbenicilina, Cefalotina, Ampicilina, Cefotaxima, Ceftriaxona, Pefloxacina.

6) DISCUSIÓN.

Tomando en cuenta la morfología colonial, se obtuvo un total de 76 colonias diferentes, y aunque en resultados al observar el Esquema 1, notamos que hay grupos de colonias que comparten las mismas características coloniales, no comparten todas, las mismas reacciones para las pruebas bioquímicas utilizadas.

Además, se registraron otras características de morfología colonial, tales como, elevación, color y tamaño, lo que nos dio un mayor número de colonias que registramos en un primer término como diferentes.

Del grupo de 23 colonias que comparten características coloniales similares, surgen 10 tipos distintos al realizar las pruebas bioquímicas. Ocurre algo similar con otros grupos de colonias, por ejemplo, el representado con 18, a las que al realizarles las pruebas bioquímicas resultaron 10 tipos diferentes. Y el grupo de 8 colonias, de las que resultaron 4 tipos diferentes. (Esquemas 1, 2, 3 y 4)

Lo señalado anteriormente indica que las 76 colonias que se registraron como diferentes, no sean precisamente géneros bacterianos diferentes, sólo que tomamos en cuenta muchas variables para una mejor clasificación de las colonias bacterianas que teníamos en ése momento.

Posteriormente el grupo de 76 colonias se fue reduciendo en número, ya que comenzamos a agruparlas tomando en cuenta categorías más generales como la tinción de Gram o forma celular, predominando el Gram negativo y la forma de bacilos con agrupación aislada, características generales en primera instancia para las bacterias patógenas de peces. (4, 8)

Es importante, mencionar que no se determinaron las bacterias aisladas hasta especie, excepto *Aeromonas salmonicida*, debido a la falta de todas las pruebas bioquímicas necesarias para tal fin, por lo que manejamos también en los resultados géneros o grupos de géneros bacterianos con la finalidad de proporcionar una clasificación más clara de los resultados.

Del total de los aislamientos, *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (alcalinizadoras) presentaron el mayor porcentaje de representatividad (46 %) y *Aeromonas salmonicida* el menor porcentaje (1 %) (Gráfica 1); lo anterior se debe a que los dos primeros géneros se distribuyen ampliamente en agua pudiendo afectar a diversas especies de peces, lo que concuerda con los estudios de Shotts y colaboradores en 1976, ya que encontraron con una gran frecuencia el género *Pseudomonas*. Y por el contrario *Aeromonas salmonicida* es patógena principalmente de salmónidos, causándoles furunculosis como lo mencionan Starliper y Rodgers en 1998.

Con respecto a la cantidad de aislamientos en las peceras basándose en su uso. Se observó que en la clasificación de Investigación-Reproducción y en Investigación-Exhibición se presentaron la mayor cantidad de aislamientos (Tabla 5), lo cual puede deberse a que en éstas clasificaciones se realizaron muestreos en un mayor número de peceras que en las clasificaciones restantes.

Los géneros de *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (alcalinizadoras) fueron los más encontrados, principalmente en peceras de Investigación-Reproducción, lo que puede atribuirse a los recambios de agua menos frecuentes que en Investigación-Exhibición, ya que en ésta última clasificación las peceras deben estar lo más limpias posible, con el fin de atraer la atención de los aficionados, pero sin descuidar a los peces para no alterar las investigaciones que se realizan, esto no quiere decir que a las peceras de Investigación-Reproducción no se les realice recambios de agua, sin embargo deben hacerse en un lapso de tiempo mayor para no afectar la investigación debido al estrés que puedan presentar los peces, lo que puede causar su muerte, principalmente si son especies muy delicadas. (50)

Cabe aclarar por lo anterior que las infecciones bacterianas en los peces y muchas veces la muerte de ellos, no se debe sólo a la cantidad de bacterias ni a la resistencia que puedan presentar frente a los antimicrobianos, ya que hay otro factor sumamente importante como es el estrés al que pueden estar sujetos, razón por la que se debilita su sistema inmune haciéndolos más susceptibles a enfermedades, lo que concuerda con Pai y colaboradores en 1995, en donde mencionan que la mortalidad de los peces (*Cyprinus carpio*) es proporcional al grado y tipo de estrés al que están sometidos, principalmente cuando están infectados por *Aeromonas hydrophila*.

La menor cantidad de *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (alcalinizadoras) se presentó en peceras Ornamentales lo que pudo deberse al bajo número de muestreos realizados en ésta categoría (Tablas 1 y 5) así como al menor grado de estrés de los peces debido al menor manejo de ellos.

La especie *Aeromonas salmonicida* sólo se encontró en peceras de Investigación-Exhibición con un aislamiento, esto puede atribuirse a que en ésta categoría hay más variedad de peceras y por consiguiente más variedad de hábitats para los microorganismos.

Con respecto al patrón de resistencia, sólo se aplicaron los antibiogramas a 66 cepas, debido a que 10 no presentaron crecimiento en el agar Mueller-Hinton ni aún enriquecido con 5% de sangre de carnero desfibrada, razones por las cuales se perdieron éstas cepas, pertenecientes cinco de ellas al grupo de *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (alcalinizadoras), cuatro al de *Acinetobacter* y una al grupo de *Chromobacterium*, *Plesiomonas* y *Aeromonas*. Cabe aclarar que éstas cepas fueron difíciles de trabajar desde un principio por su lento crecimiento.

Por el contrario hubo cepas como *Aeromonas salmonicida* que a pesar de que sólo se presentó un aislamiento, permaneció en el transcurso de la investigación, una explicación de esto es la utilización de agar Mueller-Hinton para los antibiogramas, lo que concuerda con Barker y Kehoe en 1995, ya que encontraron que el agar Mueller-Hinton soporta el crecimiento de *Aeromonas salmonicida* además de la clara definición de los halos producidos por ésta bacteria.

Con respecto a los antibióticos utilizados, aquéllos que inhiben síntesis de pared celular, excepto la Ceftriaxona, son los menos efectivos ya que las bacterias mostraron una marcada resistencia, siendo la Carbenicilina el antibiótico menos eficaz de éste grupo con un 100 % de resistencia, le siguen la Cefalotina con un 98.48 %, la Ampicilina con un 93.93 % y la Cefotaxima que mostró un 90.90 % (Tabla 9 y Gráfica 2). Lo anterior concuerda con Mc Phearson y colaboradores en 1991 ya que demostraron una máxima resistencia para la Ampicilina, de bacterias aisladas de muestras de agua, y en el presente trabajo éste antibiótico mostró una resistencia del 93.93 %.

Para la Ceftriaxona solo se presentó un 15.15 % de resistencia y por lo tanto un 84.84 % de sensibilidad, aunque cabe aclarar que ésta última cifra se dividió en cepas muy sensibles y en medianamente sensibles con un 53.03% y 31.81 % respectivamente.

La ineficacia de la mayoría de los antibióticos utilizados correspondientes a éste mecanismo de acción, se debe a que las bacterias potencialmente patógenas de peces, generalmente son bacterias gramnegativas, por lo que poseen un bajo porcentaje de peptidoglicano en su pared celular, resultando más difícil la eliminación de la bacteria. Además una vez que la administración de Ampicilina y derivados de penicilina da lugar a bacterias resistentes, fácilmente puede adquirirse resistencia a cefalosporinas de tercera generación por cambios puntuales en el gen de lactamasa. (10).

Los antibióticos utilizados que actúan inhibiendo el metabolismo intermediario son la Nitrofurantoína y el Trimetoprim con Sulfametoxazol, con un 53.03 % y 24.24 % de cepas resistentes respectivamente. Éste mecanismo de acción es más eficaz con respecto al anterior, debido a que éstos antibióticos atacan todo un proceso biológico dentro de las bacterias, por lo que éstas son inhibidas o muertas.

Uno de los mejores ejemplos para esto son los antagonistas del ácido fólico. Además los antibióticos combinados como el Trimetoprim con Sulfametoxazol son muy efectivos debido a los bloqueos secuenciales en el metabolismo de las bacterias. (13).

Los resultados de sensibilidad obtenidos con respecto al antibiótico antes mencionado concuerdan con Boonyaratpalin en 1989 donde menciona que *Aeromonas hydrophila* resultó altamente sensible al Trimetoprim con Sulfametoxazol y al Cloranfenicol.

El mecanismo de inhibición de síntesis de ácidos nucleicos, corresponde a la Pefloxacina, para la cual se presentó un 12.12 % de cepas resistentes (Tabla 9 y Gráfica 2). Los antibióticos que actúan bajo éste mecanismo muestran eficacia en la inhibición del crecimiento de las bacterias, o bien en su muerte, ya que éste grupo de agentes antibacterianos interfieren con la DNA girasa, enzima que desenrolla al DNA en la preparación para la replicación.

Los antibióticos que inhiben síntesis de proteínas como el Cloranfenicol (21.21%) de resistencia y principalmente los aminoglucósidos (Amikacina, Netilmicina y sobre todo la Gentamicina), mostraron mayor efectividad sobre las cepas, ya que el 4.54% de éstas presentaron resistencia para la Amikacina y la Netilmicina, y sólo el 1.51% de las cepas mostraron resistencia frente a la Gentamicina (Tabla 9 y Gráfica 2), lo anterior se debe a que dichos antibióticos inhiben directamente la unión del RNAm a los ribosomas bacterianos, actuando específicamente el Cloranfenicol en el ribosoma 50S y los aminoglucósidos en el ribosoma 30S. (13)

Los resultados anteriores contrastan con lo que menciona Dixon en 1991, ya que reporta un decremento en la eficacia de los antibióticos que afectan la síntesis de proteínas, aunque él trabajó con la tetraciclina y eritromicina, y aminoglucósidos como la neomicina más no con los antibióticos utilizados en éste trabajo, pero tal vez si éstos antibióticos se usan excesivamente contra las bacterias patógenas de peces, exista también el decremento de su eficacia como lo menciona Dixon.

Por el contrario, el trabajo realizado por De-Mondino y colaboradores en 1995 concuerda con algunos de nuestros resultados de susceptibilidad a los antibióticos, ya que todos sus aislamientos de agua dulce y salada fueron sensibles a los Aminoglucósidos, al Cloranfenicol y al Trimetoprim con Sulfametoxazol y resistentes a las Penicilinas. Cabe aclarar que ellos trabajaron con otros antibióticos además de los mencionados.

Se presentaron otros resultados algo diferentes a los obtenidos por Lio-Po y colaboradores en 1987 ya que mencionan que *Pseudomonas sp* fue resistente a la Nitrofurantoína así como al Trimetoprim con Sulfametoxazol, y en el presente trabajo *Pseudomonas* presentó resistencia al primer antibiótico pero sensibilidad al segundo.

Los mecanismos de resistencia bacteriana son muy variados. Todavía no se han descrito mecanismos especie-específicos, ni exclusivos contra un tipo particular de antibiótico ya que en muchos casos la resistencia es mediada por plásmidos y transposones que pueden diseminarla entre diferentes géneros bacterianos y que generalmente llevan determinantes multiresistentes. (10)

Es por ésta razón que el uso de agentes antimicrobianos en la acuicultura deben manejarse con sumo cuidado con el fin de obtener mayores resultados en el tratamiento de las enfermedades de los peces. Por lo que se coincide con Smith y colaboradores en 1994 sobre la importancia de la estandarización de un método para las pruebas de sensibilidad de bacterias patógenas de peces y con Kemeza y Vitoniene en 1996 donde mencionan que antes de los tratamientos quimioterapéuticos es importante definir claramente la sensibilidad de las bacterias que afectan a los peces.

7) CONCLUSIONES.

1). – Se determinó la flora bacteriana comúnmente presente en el agua de las diferentes peceras, encontrando a los géneros: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* (alcalinizadoras), *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* (oxidadoras), *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Plesiomonas*, *Aeromonas* y la especie *Aeromonas salmonicida*.

Apareciendo *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (alcalinizadoras) con una mayor frecuencia (46 %) y *Aeromonas salmonicida* con la frecuencia más baja (1 %).

2). – Los antibióticos utilizados que actúan inhibiendo la síntesis de pared celular, exceptuando a la Ceftriaxona, son los menos efectivos, ya que el promedio de la frecuencia de las bacterias resistentes a este grupo de antibióticos fue de 79.7. Por el contrario, los antibióticos utilizados que inhiben síntesis de proteínas, principalmente los aminoglucósidos (Amikacina, Netilmicina y sobre todo la Gentamicina) mostraron mayor efectividad sobre las bacterias, presentando un promedio de frecuencia de bacterias resistentes de 7.95.

3). –El antibiótico menos eficaz contra los géneros bacterianos encontrados es la Carbenicilina (que actúa inhibiendo la síntesis de pared celular), ante el cual mostraron un 100% de resistencia y el antibiótico más eficaz es la Gentamicina (que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas), frente al que sólo presentaron el 1.51% de resistencia.

4). – Se registró la presencia de bacterias potencialmente patógenas para peces, encontrando a *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Flavobacterium* y *Aeromonas salmonicida* dentro de éste grupo.

5). – Antes de sugerir terapias o tratamientos quimioterapéuticos en los peces con enfermedades infecciosas a causa de bacterias, se recomienda separar al pez, para aislar las bacterias que lo afectan y realizarles sus respectivos antibiogramas, ya que es indispensable conocer la sensibilidad y/o resistencia de las bacterias patógenas de peces, con el fin de disminuir o por lo menos de no acelerar la resistencia que puedan presentar frente a los antibióticos.

8) LITERATURA CITADA

1. Avila GA. Terapéutica de los peces de ornato. Segunda Semana de Fauna Silvestre. México: UNAM. FES Cuautitlán. Medicina Veterinaria y Zootecnia; 1997. p. 22-23.
2. Barker GA, Kehoe E. Assessment of disc diffusion methods for susceptibility testing of *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture. 1995; 134: 1-8.
3. Bauer AW, Kirby VMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. 1966; 45: 493-496.
4. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds. Krieg NR, Holt JG. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. Vol I, Sections: 4-5.
5. Bigaux Diagnósticos, S. A. Multidiscos gram positivos. M. Negativos. M. Combinados. 1985. p. 11.
6. Boonyaratpalin S. Bacterial pathogens involved in the epizootic ulcerative syndrome of fish in Southeast Asia. Aquatic Animal Health. 1989; 1 (4): 272-276.
7. Cellucci PA, Lieutenant SJ, Skinner T. White Paper-Fish Health. Massachusetts Aquaculture. 1995. Sept. Available from: URL: <http://www.state.ma.us/czm/wpfshlt h.htm>
8. Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacterias. Eds. Barrow GI, Feltham RKA. 3ª ed. Cambridge: University Press; 1993. Section 7. p. 94-164.
9. De-Mondino SSB, Nunes MP, Ricciardi ID. Ocurrance of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro City. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1995; 90 (1): 1-4.
10. Departamento de Biología Molecular. Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Salud. Pública. México. 1994; 36:428-438. Available from URL: (<http://www.insp.mx/salud/36/364-7s.html>)

11. Dixon BA. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. Larvi' 91. Fish. Crustacean & Larviculture Simposium. Eur. Aquaquilt. Soc. Spec. Publ. 1991; 15: 419.
12. Fernández AMA. Enfermedades de peces de ornato y su importancia en sanidad acuícola. Enfermedades bacterianas de los peces de ornato. UNAM. F. M. V. Z. Secretaría de Pesca, Dirección General de Acuicultura. Subdirección de Sanidad Acuícola; 1994. p. 25-27.
13. Frisby JA. Introduction on the Use of the Antibiotics Guideline. Microbiology Antibiotics Guide. Thomas Jefferson University. 1994 June. (Cited 1995). Available from: URL: http://jeffline.tju.edu/CWIS/OAC/antibiotics_guide/intro.html
14. Ganzhorn JJS, Rohovec JL, Fryer. Dissemination of microbial pathogens through introductions and transfers of finfish. Pages 175-192 in A. Rosenfield and R. Mann, editors. Dispersal of Living Organisms Into Aquatic Ecosystems. 1992; Maryland sea Grant, College Park. 471 pp. Available from: URL: <http://plants.ifas.ufl.edu/mcdis3.html>
15. Giono CS. Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. Infectología. 1983. 7: 325-328, 351-352.
16. González RD. Efecto sinérgico "in vitro" entre Amikacina y Carbenicilina frente a cepas *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes del Hospital de Pediatría del C.M.N. SIGLO XXI. México: Tesis Profesional Q.F.B. FES Zaragoza. UNAM. 1994; p. 8-9, 14.
17. Hernández AP. Que es la acuicultura. México: Secretaría de Pesca. Fondepesca; 1986. p. 13-14.
18. Hurley PD, Aguilar MA, Garibay BJ, Landeros VJ. Estadística, Curso de CINVESTAV. SEP. Departamento de matemática; 1981. p. 30-34, 40, 119.
19. Inglis V, Roberts JR, Bromage RN. Bacterial diseases of fish. Great Britain: Blacwell Scientific Publications. Institute of Aquaquilture; 1993. p. 53-54, 75.
20. Jawetz E, Melnick LJ, Adelberg EA. Microbiología Médica. El Manual Moderno; 1998. p. 38, 46-47, 90-92, 113-114, 121-128 y 146.

21. Jiménez GF, Auro de OA. Enfermedades de peces de ornato y su importancia en sanidad Acuicola. México: UNAM. F.M.V.Z. Secretaria de Pesca. Dirección General de Acuicultura. Subdirección de Sanidad Acuicola; 1994. p. 5.
22. Jiménez GF, Galvís L, Segovia SF, Garza FH. Sanidad Acuicola. México: Fondepesca. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Fideicomiso Fondo Nacional para el desarrollo Pesquero; 1985. p. 58-60.
23. Jiménez GF, Galvís L, Segovia SF, Garza FH, Wesche EP. Parásitos y enfermedades del bagre *Ictalurus spp.* 2a. Ed. México: Secretaria de Pesca. U.A.N.L.; 1988. p. 127, 136.
24. Kemeza V, Vitoniene M. Red spot disease of carp. Fishery and aquulture in lithuania Zuvininkiste Lietuvoje Vilnius-Lithuania Lithuanian Society of Hidrobiologists. 1996; 341-352.
25. Kitao T, Nakauchi R, Saito R, Tanaka I. In vitro studies of amoxicillin on antibacterial activity for some fish pathogens. Fish Pathology. 1989; 24 (2): 83-87.
26. Krupp AM, Shroeder AS. Diagnóstico clínico y tratamiento. Manual Moderno; 1993. p. 630-631, 645-648, y 650-655.
27. Lemus CJL, García TP, Frias MM. El océano y sus recursos. México: La ciencia desde México; 1990. p. 38, 64.
28. Levinson WE, Jawetz E. Microbiología e inmunología: Autoevaluación y repaso. México: El Manual Moderno; 1998. p. 16-17, 25-29, 70-77 y 80-81.
29. Levy SB. The Challenge of Antibiotic Resistance. Scientific American. 1998; 278 (3): 46-53
30. Linch M, Stanley R. y cols. Métodos de Laboratorio. Interamericana McGraw-Hill. 1972.
31. Lio-Po G, Sanvictores E. Studies on the causative organism of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) fry mortalities 1. Primary isolation and pathogenicity experiments. Aquaculture Tropics. 1987; 2 (1): 25-30.

32. Lowrie J, Borneham E. A Survey of the Marine Microbes. Aquarium Frontiers. 1999. May. Available from: URL: <http://www.animalnetwork.com/fish2/aqfm/1999/may/features/1>
33. McPhearson RM, DePaola A, Zywno SR. Antibiotic resistance in Gram negative bacteria from culture catfish and aquaculture ponds. Aquaculture. 1991; 99: 203-211.
34. Méndez FDA. Evaluación de la Proteína Antibacteriana de tres nitrofuranos. Tesis. México: ENEP Iztacala; 1986.
35. Merck. Manual de Medios de cultivo. Alemania. 1994. p. 47
36. Morales DJ, Colón HML. Toxicidad natural, parásitos y microorganismos. Factores de Contaminación del Pescado. Cuadernos de Nutrición. Instituto Nacional de Nutrición. Salvador Subirán. 1986; 6: 38-39.
37. Murray P, Drew WY, Kobayashi G. Microbiología Médica. España: Mosby; 1996. p. 37-45.
38. Nakamura S, Gohya Y, Losso JN, Nakai S, Kato A. Protective effect of lysozyme-galactomannan or lysozyme-palmitic acid conjugates against *Edwardsiella tarda* infection in carp, *Cyprinus carpio*. L. Febbs. Lett. 1996; 383 (3): 251-254.
39. Noga EJ. Fish disease: Diagnosis and treatment. U.S.A: Mosby; 1996. p. 30-35, 253-254.
40. Padilla C, Brevis P, Lobos O, Hubert E. Bacteriocin activity of *Pseudomonas sp.* on enteropathogenic bacteria in an artificial aquatic system. Lett. Appl. Microbiol. 1996; 23 (6): 371-374.
41. Pai R, Karunasagar I, Shetty HPC, Karunasagar I. The effect of some stress factors on infection of fish by *Aeromonas hydrophila*. J. Aquacult. Trop. 1995; 10 (1): 29-35.
42. Perea EJ, Martínez LM. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. España: Doyma; 1992. Vol I. p. 200.

43. Prescott LM. Microbiology. Publishers: Brown WC, Dubuque IA. 1998 (cited 1999.August.5); Available from: URL: <http://www.bact.wisc.edu/ScienceEd/AntibioticResistance.html>
44. Seeley HW, Van Demark JP. Microbes in action, a laboratory manual of microbiology. 2^a ed. U.S.A: W.H. Freeman & Company; 1972. p. 29, 80.
45. Shotts EB, Kleckner AL, Gratzek JB Blue JL. Bacterial flora of aquarium fishes and their shipping waters imported from Southeast Asia. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 1976. 33:732-735. Available from: URL: <http://plants.ifas.ufl.edu/mcdis3.html>
46. Smith P, Hiney MP, Samuelsen OB. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning. Annu. Rev. Fish. Dis. 1994; 4: 273-313.
47. Smith W. Cell Biology. U.S.A: Mosby; 1990. p. 48, 52.
48. Starliper CE, Rodgers S. Homology of bacterial antimicrobial resistance genes from different origins. USGS. Biological Resources. 1998 July (cited 1999 Jul 20); N. 98-012. Available from: URL: <http://biology.usgs.gov/news/98-012.htm>
49. Stoffregen DA, Backman SC, Perham RE, Bowser PR, Babish JG. Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (sunshine) bass and successful therapeutic intervention with the fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin. J. World Aquacult. Soc. 1996; 27 (4): 420-434.
50. Thompson E. Fish Diseases. FAQ: Diseases. 2000. Available from: URL: <http://faq.thekrib.com/disease-fw.html>
51. Verdonck L, Dehasque M, Swings J, Sorgeloos P, Léger Ph. The Microbial environment of Rotifer (*Brachionus plicatilis*) and Artemia production system. Larvi'91 fish crustacean larviculture symposium. 1991; 15: 398.