



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) COMO
RESERVORIO DE *Aeromonas* POTENCIALMENTE
PATÓGENAS, EN LOS CANALES DE XOCHIMILCO, D.F.,
MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

JETSI VIRIDIANA MANCILLA ROJANO



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Mancilla
Rojano
Jetsi Viridiana
53832692
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
307202589

2. Datos del tutor

Dra
Irma Aurora
Rosas
Pérez

3. Datos del sinodal 1

Dra
Claudia Alejandra
Ponce de León
Hill

4. Datos del sinodal 2

Dra
Ruth Cecilia
Vanegas
Pérez

5. Datos del sinodal 3

Dra
Ariadna del Carmen
Cruz
Córdova

6. Datos del sinodal 4

M en C
Leticia
Martínez
Romero

7. Datos del trabajo escrito

Estudio de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) como
reservorio de *Aeromonas* potencialmente patógenas,
en los canales de Xochimilco, D.F., México
58 p
2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez el haberme dado la oportunidad de desarrollar esta investigación bajo su tutoría, por los conocimientos que me brindó durante clases y el desarrollo del presente trabajo. Es un privilegio el escuchar la pasión que tiene por la Biología y los microorganismos en particular.

A la M. en C. Leticia Martínez Romero agradezco el apoyo que me brindó durante los muestreos, por la paciencia y tolerancia que tuvo conmigo al enseñarme las técnicas para el desarrollo del presente trabajo.

A la M. en C. María Eva Salinas Cortés agradezco los conocimientos y el apoyo que me otorgó para el análisis microbiológico de las muestras, así como las revisiones y aportaciones hechas a mi trabajo.

A la Dra. Ariadna del Camen Cruz Córdova agradezco su asesoría en la interpretación del árbol filogenético, así como los comentarios hechos para la mejora de la tesis.

A la Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez y Claudia Alejandra Ponce de León Hill por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis, así como las aportaciones para la mejora de la misma.

Agradezco al Sistema Nacional de Investigadores, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT, por la beca que se me otorgó durante 2 años, para la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

Agradezco a la Máxima casa de estudios, Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi hogar durante 9 años, mismos en los que me formé como estudiante y como persona. Teniendo en cuenta la enorme responsabilidad que conllevará el desarrollarme profesionalmente, es un honor, un privilegio y un gran orgullo ser parte de la UNAM.

A quienes desde que llegue al laboratorio de Aerobiología del Centro de Ciencias de la Atmósfera me recibieron con una gran calidez: A Leticia Martínez y Eva Salinas, quienes me apoyaron en la realización de este trabajo, mostrándome las excelentes profesionistas que son, ganándose mi profunda admiración y respeto. Gracias por los consejos y la confianza que me brindaron, por enseñarme que la fortaleza es una de las más grandes virtudes ante cualquier adversidad, por despertar en mí, aún más la pasión por los microorganismos, por siempre estar dispuestas a apoyarme, pero sobre todo gracias por el cariño que me brindaron. A Elena por la amistad y el cariño, por los deliciosos platillos que acompañaron infinidad de charlas, por ser tan linda y admirable mujer. A Michelle, quien a su corta edad me ha dado grandes lecciones. A Margarita, Tere, Carlos y Vicky por su amistad y los buenos momentos que compartimos. Agradezco a Adelfo, por la paciencia, apoyo y la amistad que me ha brindado.

A quienes en las aulas me brindaron sus conocimientos y me formaron como bióloga. A la M. en C. Rosa María Fonseca por enseñarme que la belleza de las plantas no siempre está en el exterior, a Rosario Mata por mostrarme que la sistemática no es sólo clasificar, a Noé Pacheco Coronel por transmitir esa pasión y valiosos conocimientos sobre vertebrados. A Iván Castellanos, quién me hizo sufrir terriblemente durante su curso de Ecología, pero que indudablemente marcó mi vida como estudiante, al enseñarme que un biólogo debe ser capaz de enfrentarse a cualquier ambiente y trabajar bajo cualquier dificultad, gracias por tus consejos y apoyo.

Agradezco también a las personas con las que compartí tantos días de clases, quienes hicieron aún más agradable mi estancia en la Facultad de Ciencias. A Belem, Anahí, Yuri y Ángeles, compañeros y amigos con quienes inicié y compartí mis primeras clases. A Isabel, Malleni y Lorena, con quienes conocí increíbles paisajes, gracias por las risas que me brindaron. A Michelle, Ana y Montse, por su amistad y apoyo incondicional. A Adonnis y Diana con quienes compartí tantas noches en vela, risas e infinidad de anécdotas, gracias por su amistad. A Sacnité, Lina y Rafa, gracias por cada risa y locura que compartimos, por la amistad y el apoyo incondicional.

A mis amigos del CCH-Azcapotzalco: Verónica, Sol, Christian, Rosa, Víctor, Ximena, Adriana, y Eduardo, por tantos años de amistad incondicional, por su apoyo y consejos, pero sobre todo por cada momento que me han regalado. Son parte fundamental en mi vida, los quiero mucho.

A mis flaquitas... quienes más que mis amigas se han convertido en mis hermanas y compañeras de vida. Hayde gracias por tus consejos, eres una mujercita fuerte y admirable; a ti Dianita gracias por tu dulzura, por tu espontaneidad y consejos, a ti Mely gracias por tantos años de amistad, por estar siempre a mi lado apoyándome y regañándome, por mostrarme la belleza y la dulzura de la vida. A las tres agradezco el apoyo y los consejos, por estar conmigo en los peores momentos. Las quiero y admiro mucho.

Cada paso en mi vida, lo he dado acompañada de mi familia, a ellos debo cada logro y meta alcanzada. Gracias a su amor y apoyo infinito he podido culminar esta etapa, a ustedes dedico este logro. Agradezco a mis padres: Yolanda y Mario, por los valores que inculcaron en mí, por su amor, sus cuidados y sobre todo por el gran esfuerzo y trabajo que han hecho para brindarme la oportunidad de estudiar y prepararme. Gracias por la paciencia y la confianza que han depositado en mí, pero sobre todo gracias por ser unos excelentes padres. A mi abuelita Julia, porque a pesar de las noches en vela y preocupaciones que le he dado, sin su amor, consejos y cuidados no sería la persona que soy, gracias por ser una madre para mí. A mis tíos: Gaby, Julia y Ricardo, porque no solo me han llenado de amor, sino también de consejos, los cuales me han permitido sobreponerme ante cualquier dificultad. A los seres que iluminan cada uno de mis días, a mis hermanos: Fer, Galy y Diego, porque llenan mi vida de alegría con sus ocurrencias, cada experiencia y momento a su lado, es único e incomparable. Los amo profundamente.

Agradezco a mi abuelito Antonio, el profundo amor y apoyo que me dio, por hacer de mí una niña feliz, por enseñarme que el amor más puro e incondicional con el que cuento, es el amor de mi familia. Gracias Abuelito por dibujar en mi rostro miles de sonrisas, por siempre llevarme de la mano y jamás soltarme. Te amo.

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico. Es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas. No creamos que todo progreso científico se reduce a mecanismos, máquinas y engranajes que, de todas maneras, tienen su belleza propia. Tampoco creo que peligre en nuestro mundo la desaparición del espíritu de aventura. Si veo a mi alrededor algo vital, es precisamente este espíritu de aventura que parece indisociable y que, claro está, se halla emparentado con la curiosidad.”

Marie Curie

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| Resumen | 2 |
| 1. Introducción | 3 |
| 2. Antecedentes | 7 |
| 3. Objetivos | 10 |
| 4. Justificación | 11 |
| 5. Hipótesis | 11 |
| 6. Materiales y métodos | 12 |
| 6.1 Área de estudio | 12 |
| 6.2 Registro de parámetros fisicoquímicos | 13 |
| 6.3 Muestreo de agua | 14 |
| 6.4 Muestreo de sedimento | 14 |
| 6.5 Captura de tilapias | 15 |
| 6.6 Aislamiento de <i>Aeromonas</i> en tilapias (piel, branquias y contenido estomacal), agua y sedimento | 15 |
| 6.7 Datos morfométricos e índices biológicos | 17 |
| 6.8 Análisis de bacterias coliformes totales y fecales | 17 |
| 6.9 Pruebas bioquímicas | 18 |
| 6.10 Análisis de resistencia antimicrobiana | 21 |
| 6.11 Secuenciación del gen 16S ribosomal | 21 |
| 6.12 Detección de genes putativos de virulencia | 22 |
| 6.13 Construcción de árbol filogenético | 23 |
| 6.14 Análisis estadístico | 23 |
| 7. Resultados | 24 |
| 7.1 Registro de parámetros fisicoquímicos en agua | 24 |
| 7.2 Datos morfométricos de tilapias | 24 |
| 7.3 Cuantificación de grupos bacterianos en tilapia (piel, branquias y contenido estomacal), agua y sedimento | 26 |
| 7.4 Aislamiento de <i>Aeromonas</i> presuntivas | 27 |
| 7.5 Análisis de susceptibilidad antimicrobiana | 29 |
| 7.6 Secuenciación del gen 16S ribosomal | 31 |
| 7.7 Genes de virulencia en <i>Aeromonas</i> | 32 |
| 7.8 Presencia de genes de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana | 34 |
| 7.9 Árbol filogenético | 35 |
| 8. Discusión | 37 |
| 9. Conclusiones | 45 |
| 10. Bibliografía | 46 |

RESUMEN

El género *Aeromonas* está conformado por bacilos Gram negativos, son agentes autóctonos de medios acuáticos, encontrándose también en otros hábitats como suelo, agua potable, aguas negras, aguas contaminadas, ríos, lagos y mar. Se consideran como parte de la microbiota del intestino de animales poiquilotermos, sin embargo están implicadas en infecciones de organismos acuáticos y humanos. Este estudio se llevó a cabo en la zona lacustre de Xochimilco, D.F., México, en 4 canales con diferente grado de perturbación agrícola y urbana (El Bordo, Apampilco, Apatlaco y La Asunción). Se evaluaron las concentraciones de bacterias mesofílicas y *Aeromonas* en muestras de agua y sedimento, además de piel, branquias y contenido estomacal en 3 ejemplares de la tilapia *Oreochromis niloticus*; así como la concentración de coliformes totales y fecales en las muestras de agua, sedimento y contenido estomacal de las tilapias capturadas. Se registraron los parámetros físicoquímicos en el agua de cada uno de los canales. De cada sitio, se registraron los datos morfométricos de cada tilapia y se determinó el Factor de condición K de Fulton e Índice Hepatosmático (IHS). Las muestras fueron sembradas en medio CromoCen, obteniendo 501 aislados, de los cuales a través de la realización de pruebas bioquímicas, 223 se consideraron como probables *Aeromonas*; de estos aislados se seleccionaron 200, a los que se les evaluó la susceptibilidad a 13 antibióticos por el método difusión en disco o Kirby Bauer. Con base en los resultados anteriores, a 100 de los aislados se les realizó la secuenciación del gen 16S ribosomal, y se evaluó la presencia de 5 genes de virulencia (*gcat*, *aer/hem*, *lafA*, *ast* y *alt*). Los aislados fueron secuenciados para determinar las especies, encontrando la relación entre las mismas a través de la construcción de un árbol filogenético. De acuerdo a los resultados, los parámetros físicoquímicos mostraron que la zona con mayor perturbación fue La Asunción, ya que registró concentraciones bajas de oxígeno y pH, así como niveles altos de temperatura y conductividad, debido a la influencia urbana en la zona. La zona más conservada fue el Bordo, presentando altas concentraciones de oxígeno en comparación con los demás sitios de muestreo. Los índices biológicos de factor de condición K de Fulton e Índice Hepatosmático de los 12 organismos colectados nos indican que los peces con una mejor condición fisiológica fueron capturados en la Asunción, debido a que presentaron un mayor peso y talla. Las concentraciones más elevadas de bacterias coliformes totales y fecales se registraron en las muestras de sedimento, agua y contenido estomacal de tilapias colectadas en La Asunción; por otra parte, las concentraciones mínimas para agua y contenido estomacal corresponden a la zona del Bordo. Las concentraciones de bacterias mesofílicas totales fueron mayores en la zona de Apatlaco, para muestras de piel, branquias y contenido estomacal, las concentraciones máximas fueron registradas en la Asunción; los porcentajes de *Aeromonas* con respecto a las bacterias mesofílicas totales fueron de 12.72% en piel y menor al 1% en branquias, contenido estomacal, sedimento y agua; el 63% de las probables *Aeromonas* fueron aisladas en el Bordo y Apatlaco. La prueba de susceptibilidad a antimicrobianos indica que el 100% de los aislados presentaron resistencia a ampicilina, el 18% a cotrimoxazole y ácido nalidixico; a su vez, el 62% de los mismos sólo presentó resistencia a un antibiótico, el 34% a dos antibióticos y el 4% a 3 antibióticos. Se identificaron 8 especies, siendo la más abundante *A. veronii*, seguida de *A. jandaei*; las especies aisladas con menor frecuencia fueron *A. media*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y *A. piscícola*. El 46% de los aislados amplificó dos genes, el 35% tres genes, sólo el 1% presentaron cuatro y cinco genes, estos últimos fueron aislados de la piel de la tilapia y agua. En relación al árbol filogenético, se distinguen 20 clusters, lo que indica que a pesar de tratarse de la misma especie, presentan diferencias genéticas significativas. Los resultados sugieren que el agua, el sedimento y la tilapia actúan como reservorio de cepas potencialmente patógenas, principalmente la tilapia, ya que el 59% de los aislados provenientes de estos peces presentaron al menos dos genes de virulencia, representando un riesgo potencial para la población que los manipula y los consume.

Palabras clave: *Aeromonas*, genes de virulencia, Índices biológicos.

1. INTRODUCCIÓN

El lago de Xochimilco uno de los lagos que forma la Cuenca Lacustre del Valle de México, en un inicio fue sustentado por manantiales. La zona lacustre, ubicada al noroeste de zonas de captación, fue resultado, principalmente, de descargas de aguas subterráneas y manantiales. El agua recorría ciertas distancias desde la zona de captación de lluvia (zona de recarga) hasta su descarga en la zona lacustre, alimentando los lagos de la planicie; la construcción de las chinampas dio origen a la zona de canales (INEGI, 1998).

El agua de los canales ha sido utilizada para regar cultivos, debido a que una de las actividades económicas más importante en la delegación Xochimilco es la agricultura, misma que se inició y se sigue desarrollando en terrazas a lo largo de las laderas de los cerros y por medio de chinampas en la zona lacustre.

A través del tiempo, esta zona ha sufrido un importante deterioro ambiental debido a cambios en el uso de suelo, crecimiento de la mancha urbana y aumento en la extracción de agua para el abasto de la Ciudad de México; esto último llevó a una disminución de aporte de agua subterránea a los canales, por lo que para mantener el nivel, se vierten aguas residuales provenientes de las plantas de tratamiento del Cerro de la Estrella y San Lorenzo Tezonco (Gaceta Oficial del DF, 2006).

Las descargas de aguas negras procedentes de los asentamientos urbanos, el uso inadecuado de fertilizantes y plaguicidas, el depósito de materia orgánica (de origen agrícola y doméstico), aunado a los aportes de hormonas y antibióticos han contribuido de manera significativa a la eutrofización del ecosistema; lo que promueve la disminución del oxígeno disuelto, debido al aumento de la biomasa y la turbidez, así como cambios en la comunidad biológica dominante y la diversidad de especies. Lo anterior ha generado cambios en los flujos principales de energía y por tanto una disminución de los servicios que presta el ecosistema (Kagalou *et al.*, 2003).

Uno de los problemas asociado a la descarga de aguas negras es el incremento en las poblaciones bacterianas con potencial patógeno (García, 2013). En la zona lacustre de Xochimilco se han obtenido altos registros de coliformes totales y fecales, géneros como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* están por arriba del 50 % de lo especificado por la NOM-003-ECOL-1997 (Zambrano *et al.*, 2003). En zonas agrícolas de Xochimilco con asentamientos humanos, la presencia de bacterias coliformes se debe también a las prácticas de fertilización con estiércol, realizadas en las chinampas (Soto y Esquivel, 2003).

Las bacterias coliformes son un grupo de bacterias altamente distribuidas en la naturaleza y se pueden distinguir dos grandes grupos: los coliformes totales, que son residentes naturales en agua y suelo (Megchún, 2013) y los coliformes fecales, que provienen de la microbiota intestinal de animales homeotermos incluidos los seres humanos, y se pueden encontrar en el agua, el suelo y la vegetación, como resultado de la contaminación por heces (Ramos, 2011). Dentro de estos grupos se encuentran bacterias aerobias o anaerobias facultativas, Gram-negativas, no formadoras de esporas, que fermentan lactosa con formación de gas en un lapso máximo de 48 h. (Henry y Heinke, 1999); éstas difieren principalmente en la capacidad de soportar diferentes temperaturas, ya que las coliformes fecales pueden crecer a una temperatura de 44.5 - 45°C, mientras que las coliformes totales crecen a 37°C (Harwood *et al.*, 2005); además, a pesar de que el hábitat primario de los coliformes fecales es el intestino, tienen la capacidad de crecer bajo condiciones adecuadas de materia

orgánica, pH y humedad (Díaz, 2003). Por lo anterior, confirmar la presencia de dichos grupos de bacterias es vital para determinar la calidad de un cuerpo de agua.

Otro de los problemas de la zona lacustre de Xochimilco es la pérdida de biodiversidad, debido a la introducción de especies alóctonas, como es el caso del lirio acuático introducido a fines del siglo XIX. El lirio se ha convertido en un grave problema debido a su alto grado de adecuación a las condiciones fisico-químicas de los canales, su presencia se asocia a altas tasas de evapotranspiración, bloqueo de luz y aporte de detritus (Lot y Novelo, 2004). Otras especies alóctonas que se encuentran son, la carpa (*Cyprinus carpio*), la lobina (*Micropterus salmoides*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*), las cuales fueron introducidas con fines de acuicultura, sin embargo, la adecuación de las mismas permitió un aumento en su densidad poblacional, provocando severos cambios en las comunidades biológicas. La introducción de especies exóticas invasoras plantea serias amenazas a la diversidad biológica y a los ecosistemas, ya que altera la dinámica de las poblaciones nativas y la estructura y composición de las comunidades (Carabias, 2005).

En el caso particular de la tilapia (*Oreochromis niloticus*), esta fue introducida en México en la década de los 60's proveniente de Estados Unidos de América. En comparación con otros peces, ésta es una especie con una elevada tolerancia ambiental, tiene la capacidad de adecuarse a aguas con baja concentración de oxígeno, por lo que es común que habite en aguas de poca corriente, permaneciendo en zonas poco profundas y cercanas a las orillas (SINCOAGRO S.C, 2009). Lo anterior se debe a que posee la capacidad de saturar su sangre de oxígeno y reducir su consumo cuando la concentración del mismo es inferior a los 3mg/L. La concentración de oxígeno disuelto ideal para este organismo es mayor de 4.5 mg/L (De la Ossa y Botero, 2003).

El cuerpo de estos peces es robusto y comprimido, raramente alargado. Su crecimiento es longitudinal y depende de factores como: temperatura, densidad y tipo de alimentación. La tilapia en general es conocida por su rápido crecimiento, reproducción durante todo el año con cuidado parental y talla mínima de maduración sexual, que le confieren una gran habilidad para invadir y establecerse en casi cualquier tipo de ecosistema acuático (Peterson *et al*; 2004). Es reconocida como un organismo omnívoro, si bien se han encontrado evidencias de consumo de materia vegetal únicamente; a pesar de lo anterior, se cree que esta especie fue un importante depredador del ajolote, al consumir directamente las puestas de los mismos (debido a la estructura blanda del huevo estos podrían ser digeridos de manera rápida), además de socavar las paredes de las chinampas y competir exitosamente por el alimento de las demás especies nativas. Todas estas adecuaciones le han permitido alcanzar densidades mayores a 0.093 org.m⁻² dentro del sistema acuático de Xochimilco, convirtiéndose en una plaga (Zambrano *et al*, 2003). Por otra parte, se ha comprobado que este organismo puede acumular metales pesados y si bien puede ser afectado por parásitos y bacterias patógenas, podría actuar como reservorio de los mismos.

El tracto gastrointestinal y la piel de peces dulceacuícolas y marinos se caracteriza por ser un nicho ecológico favorable para el desarrollo de microorganismos (Cahill, 1990). El desarrollo de la microbiota en peces es un proceso gradual, el cual comienza una vez que el alevín entra en contacto con el ambiente; además está influenciado por la ingesta de alimento, secreción de hormonas y absorción de nutrientes (Núñez, 2011). La microbiota intestinal, se considera como: 1) microbiota alóctona o transitoria, la cual es escasa y no permanece por mucho tiempo en el intestino; generalmente se encuentra en el agua, el alimento y sobre la superficie de los huevos de los peces; 2) la microbiota autóctona o nativa, se refiere a aquellos microorganismos capaces de colonizar la superficie epitelial del intestino del hospedero; y 3) la microbiota específica, la cual se vuelve estable al llegar

a la etapa adulta. Por lo anterior la microbiota presente en un pez juega un papel primordial e influye de manera importante sobre la nutrición y salud de los mismos. La diversidad microbiana en peces está asociada tanto a bacterias benéficas como patógenas (Al-Harbi y Uddin, 2005). En el caso de la tilapia, existen bacterias oportunistas que forman parte de su microbiota; géneros bacterianos como: *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Micrococcus* han sido aislados de piel, branquias, intestino y músculo en *Oreochromis spp.* (tilapia roja) y *Oreochromis niloticus* (Fuentes *et al.*, 2011).

Los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* son justamente otro grupo de bacterias infecciosas que se han registrado en el agua de los canales de Xochimilco, las cuales superan del 30 al 80% lo especificado por la NOM-003-ECOL-1997, encontrándose en mayores concentraciones en la zona turística (Sandoval, 2003).

Lo anterior es de suma importancia, debido a que algunas especies del género *Aeromonas* han emergido como un problema de salud pública para la población humana, provocando infecciones intestinales y extra-intestinales que incluyen bacteriemia. Sin embargo, es importante mencionar que las *Aeromonas* mesófilas se han identificado como agentes etiológicos en numerosos casos clínicos, afectando no sólo a pacientes inmunodeprimidos o de corta edad sino también a individuos inmunocompetentes (Altwegg *et al.*, 1991).

Estas bacterias son considerados agentes autóctonos del medio acuático y se encuentran ampliamente diseminados en hábitats naturales como suelo, agua potable, aguas negras, aguas contaminadas, ríos, lagos y mar (Borrel *et al.*, 1998). Como ya se mencionó anteriormente, forman parte de la microbiota del intestino de peces, anfibios y reptiles; en el humano no se encuentran como parte de la microbiota, solo se aíslan cuando llega a ser infectado por consumir agua o alimentos contaminados, por tanto, no existe una asociación entre las coliformes fecales y este género (García, 2013).

El género *Aeromonas* incluye bacilos cortos de 0.3-1.0 x 1.0-3.5 µm, Gram- negativos, aerobios y anaerobios facultativos (Kirov, 1997). Todas las especies excepto *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas media* son móviles gracias a un flagelo polar; son oxidasa y catalasa positivos, reducen nitrato a nitrito y fermentan la D-glucosa como fuente principal de carbono y energía (Castro *et al.*, 2003). Pueden dividirse en dos grandes grupos en base a la temperatura óptima de crecimiento y la capacidad de movilidad de las especies. El primer grupo está formado por especies mesófilas y móviles que crecen óptimamente a 37°C. El segundo es un grupo reducido y homogéneo genéticamente, cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 22-25°C y está constituido por una sola especie: *Aeromonas salmonicida* (Notederdaeme *et al.*, 1996). El género incluye 24 especies, de las cuales, la especie *A. veronii* tiene dos biotipos *A. veronii bt.sobria* y *A. veronii bt. veronii* (Janda, 2001).

Aeromonas hydrophila es una de las especies más estudiada debido a su frecuente asociación con infecciones en los seres humanos, incluyendo septicemia, infecciones en heridas y gastroenteritis. Como patógenos de organismos acuáticos, se ha reportado a *Aeromonas salmonicida* como responsable de infecciones epidérmicas en peces como el salmón, y a *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. jandaei* como agentes etiológicos en tilapia, trucha, pez gato, bacalao y salmón, donde desarrollan septicemias hemorrágicas y úlceras (Reith *et al.*, 2008).

Un aspecto importante de mencionar es que las *Aeromonas* producen betalactamasas que hidrolizan cefalosporinas y carbenicilina, así como metalobetalactamasas; que le confieren la capacidad de presentar resistencia a antibióticos como penicilina, ampicilina y cefalotina;

por lo tanto para el tratamiento de enfermedades causadas por este género, se utilizan cefalosporinas y quinolonas (Castro, 2002). En tratamientos de diarreas ocasionados por *Aeromonas* se utilizan generalmente tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, cefalosporinas de tercera generación, norfloxacin, aminoglucósidos y cloranfenicol (Romero, 2002). Sin embargo, se ha reportado resistencia a antibióticos como: amoxicilina, novobiocina, cefalotina, colistina, sulfametoxazol, cefandol, trimetoprim, eritromicina, estreptomina, cloranfenicol, ácido nalidíxico e imipenem (Imzilin, 2001). El incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es de suma importancia debido a que ha causado numerosos problemas sanitarios, pues se incrementan las tasas de morbilidad y mortalidad en la población. Las bacterias resistentes a antibióticos se distribuyen a través de las aguas residuales, llegando a los medios acuáticos, siendo esta la principal vía de dispersión en el ambiente (Bécares, 2009). La resistencia a los antibióticos puede ser por causa natural o intrínseca, como en el caso de las *Aeromonas* con los betalactámicos, ya que las propias bacterias han desarrollado mecanismos para inactivar las sustancias antibióticas producidas como elemento de defensa o estrategia competitiva con otros microorganismos (Martínez, 2009). A pesar de que la resistencia a antibióticos puede aparecer en ausencia de un antibiótico por mutación genética, ha sido el uso excesivo de antibióticos lo que ha provocado un incremento alarmante de resistencias, que incluso ha llevado a adoptar medidas legales para restringir su libre adquisición (Kümmerer 2004).

Además de la multiresistencia a antibióticos, muchas especies de *Aeromonas* secretan diversas enzimas extracelulares y/o toxinas con diferentes papeles en la patogenicidad. Ciertas especies poseen genes que codifican para una toxina en concreto y estos sólo se expresarán bajo determinadas condiciones de crecimiento mientras que otros requerirán una activación enzimática (Gavín, 2003). Estas enzimas son: proteasas, DNasas, RNasas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, entre otras, muchas de ellas son consideradas factores de virulencia (Altwegg *et al*, 1999). La presencia de dichos genes le confiere a la bacteria la capacidad no sólo de colonizar e invadir al hospedero, sino de desarrollar una infección.

Como se mencionó previamente, Xochimilco es un sistema acuático que al paso de los años se ha ido deteriorando por presiones antropocéntricas. Son varios los estudios y programas que se han realizado con la finalidad de entender su problemática y contribuir a su mejora (CONACYT-CONAGUA, 2012; Zambrano *et al*, 2012; Zambrano *et al*, 2014); sin embargo aún hay muchos aspectos importantes que deben ser considerados. Por tal motivo la realización del presente trabajo tiene como objetivo aportar información acerca de la presencia de *Aeromonas* en el agua, sedimento y peces (tilapia), los cuales podrían estar actuando como reservorio de las mismas; así mismo, a través del análisis de bacterias coliformes determinar el nivel de contaminación fecal. Ya que lo anterior puede representar un riesgo para la salud pública y para los organismos que se desarrollan en los diversos canales de Xochimilco.

2. ANTECEDENTES

El género *Aeromonas* es reconocido como patógeno de animales poiquiloterms, diversas especies se han asociado a infecciones en peces de importancia acuícola ; Suárez y Herrera (2011) analizaron la presencia de *Aeromonas* en muestras de pescado bagre (*Brachyplatistoma spp.*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*), mojarra (*Oreochromis spp.*), rampuche (*Pimelodus navarroi*), bocachico (*Prochilodus magdalenae*), dorada (*Brachyplatystoma flavicans*) y sierra (*Pristis pectinata*); en el 76.47% de las muestras se confirmó el crecimiento de *Aeromonas spp.*, el 100% de las muestras de trucha y rampuche presentaron crecimiento de estas bacterias, confirmando que estos organismos pueden ser un importante vehículo para que lleguen al hombre.

Piñeros y colaboradores (2010) a través de la infección experimental de *Oreochromis sp* con *Aeromonas hydrophila*, lograron describir la sintomatología en peces, la cual consiste en palidez, letargo, boqueo, aumento de la frecuencia opercular y pérdida de eje de nado; además de presentar hemorragias en la base de las aletas y órganos internos. A través de este reporte se logró establecer un modelo de estudio de la dinámica de las enfermedades que causan estas bacterias en peces.

Aunque estas bacterias se encuentran asociadas a diversas patologías en peces, es importante mencionar que también se han aislado en muestras de alimentos, agua o bien en otros organismos de importancia ecológica y económica. Sin embargo, uno de los temas de mayor importancia en estos estudios es la implicación de diversos mecanismos de patogenicidad y la resistencia que presentan a diversos antibióticos. Saavedra y colaboradores (2004) llevaron a cabo un trabajo de investigación en Colombia, identificando 51 cepas pertenecientes al género *Aeromonas*, mismas que fueron aisladas de muestras de piel y riñón de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). El examen microscópico de los tejidos reveló alteraciones celulares correlacionadas con la presencia de estas bacterias. Realizaron pruebas de sensibilidad a antibióticos, encontrando resistencia a imipenem, amoxicilina, carbanicilina y ticarcilina. En el año 2006, Paniagua y colaboradores analizaron la presencia de *Aeromonas hydrophila* en el tracto gastrointestinal de charales (*Chirostoma humboldtianum*) provenientes de un estanque de agua dulce en Ixtlahuaca, Edo. de México; de las 20 cepas analizadas, el 80% fueron resistentes a ampicilina y el 100% resistentes a penicilina y dicloxacilina , así como sensibles a ceftriaxona .

Oliveira *et al.* (2012) trabajaron con peces provenientes del Valle del Rio São Francisco, Brasil; a los aislados que obtuvieron se les analizó la presencia de 4 genes (aerolisina, hidrolipasa, elastasa y lipasa). Realizaron también ensayos *in vivo* en alevines de tilapia del Nilo, en los cuales se observó la mortalidad de los mismos debido a la presencia de *A. hydrophila*. El gen de mayor prevalencia en los aislados fue aerolisina. En el 2013 Furmanek trabajó con una cepa de *A. hydrophila* aislada del río Nilo, la anterior presentó también 4 genes implicados en patogenicidad (toxina hemolítica, elastasa, enterotoxina, flagelo polar), además de resistencia a beta-lactámicos y tetraciclinas.

Existen numerosas estructuras y enzimas extracelulares asociadas a virulencia, tales como hemolisinas, proteínas de membrana externa, pili, cápsula, lipopolisacáridos, lipasas, proteasas, entre otros. Wang *et al.* (2012), estudiaron la presencia de *Aeromonas hydrophila* en una salamandra gigante china, evaluando el gen 16S rDNA, genes de virulencia y fenotipos relacionados con resistencia a antibióticos. La cepa aislada presentó 4 genes de virulencia (aerolisina, *ahal*, *hly* y *alt*), además de resistencia a vibramicina, furazolidona, ampicilina y eritromicina. El estudio permitió ayudar a validar la clasificación y virulencia de bacterias patógenas en anfibios.

Otro estudio que aportó información sobre la presencia de bacterias potencialmente patógenas en anfibios es el de García (2013) quien detectó la presencia de factores de virulencia en especies de *Aeromonas* aisladas de agua y piel de ajolote de Xochimilco, México. Las muestras provenientes de piel de ajolote presentaron con mayor frecuencia el gen *gcat* (glicerofosfolípido colesterol acil transferasa) y *aer/hem* (aerolisina/hemolisina). El 15% de los aislados, identificados como *A. veronii*; registraron resistencia a imipenem; en los aislados de agua la especie más común fue *A. salmonicida*. Con lo anterior determinó que tanto el ajolote como el agua son reservorios de *Aeromonas spp.*

Zhang, Ong y Leung (2010) realizaron un estudio en el que analizaron diferencias genéticas entre cepas virulentas y no virulentas de *A. hydrophila*, las cuales fueron aisladas de peces. Identificaron 67 regiones genómicas, 22 estaban presentes en cepas virulentas; la realización de dicho estudio sirvió como base para dilucidar qué mecanismos de patogenicidad en *A. hydrophila* intervienen en las infecciones causadas en peces y humanos.

Uno de los factores de virulencia más estudiados en *Aeromonas* son los lipopolisacáridos, se han reconocido alrededor de 97 serogrupos distintos; Jiménez y colaboradores (2008) extrajeron, caracterizaron y evaluaron *in vitro* e *in vivo* extractos de lipopolisacárido (LPS) en *Aeromonas hydrophila*, con la finalidad de comprender la patogenicidad inducida por esta molécula en especies como la tilapia roja (*Piaractus brachipomus oreochromis spp.*). La cepa utilizada en dicho estudio fue aislada de una tilapia con septicemia, los extractos de lipopolisacáridos fueron inoculados intraperitonealmente en ratones, los cuales presentaron erizamiento, taquipnea e inapetencia, congestión hepática y pulmonar, hemorragias pulmonares y renales; la realización de esta investigación sirvió como base para posteriores estudios sobre endotoxinas presentes en especies de *Aeromonas*, involucradas en la patogenicidad. Gavín (2003) realizó una investigación en la que caracterizó fenotípica y genotípicamente el flagelo en *Aeromonas spp.* mesófilas. Generó mutantes por inserción de un mini-Tn5 Cm no adherentes de la cepa Sch3N de *Aeromonas caviae* y *Aeromonas hydrophila*, identificando cuatro genes flagelares involucrados en la adhesión e invasión a células epiteliales humanas, por lo que la presencia de estos genes también debe ser considerada como un importante factor de patogenicidad del género.

El género *Aeromonas* ha cobrado importancia debido a que ha sobresalido como un problema de salud pública provocando infecciones extra-intestinales e intestinales. Tena y colaboradores (2006) identificaron 38 casos, en los que se registraron infecciones abdominales, de piel, partes blandas, del tracto urinario, del aparato respiratorio y bacteriemia en pacientes del Hospital Universitario de Guadalajara, España. La especie *A. hydrophila* fue la aislada con mayor frecuencia, además de registrar sensibilidad a gentamicina, amikacina, cefotaxima y ciprofloxacino. Determinaron que las *Aeromonas* no sólo están implicadas en problemas gastrointestinales, sino también en infecciones del sistema biliar e infecciones de heridas.

Aguilera *et al* (2007) analizaron aislados de muestras clínicas de pacientes con diarrea en México y España, con la finalidad de determinar la distribución de tres genes de virulencia, encontrando que los genes de la toxina aerolisina/hemolisina son los más prevalentes, ya que el 89% de los aislados presentó dicho gen; el gen *ast* se encontró en 91% de aislados identificados como *A. hydrophila*; encontrando además que esta especie puede llegar a presentar múltiples genes; sin embargo, especies como *A. caviae* y *A. veronni* muestran una limitada presencia y variedad de genes relacionados con la patogenicidad. Las muestras aisladas de pacientes en México, presentaron principalmente el gen aerolisina/hemolisina.

Bravo *et al* (2007) estudiaron 44 cepas de *Aeromonas* aisladas de muestras de sangre provenientes de centros de epidemiología y microbiología en Cuba; encontrando que *Aeromonas jandaei* fue la especie aislada con mayor frecuencia; sin embargo, también fueron identificadas las especies *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas caviae*; las anteriores presentaron resistencia a carbenicilina, novobiocina, penicilina, ampicilina y meticilina. Dicho estudio contribuyó al conocimiento no sólo de la etiología bacteriana, sino también al comportamiento de cepas de *Aeromonas* frente a agentes antimicrobianos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Cuantificar y caracterizar fenotípica y genotípicamente las *Aeromonas* potencialmente patógenas presentes en branquias, piel y contenido estomacal en tilapia (*Oreochromis niloticus*), así como las presentes en agua y sedimento en 4 canales de Xochimilco, D.F México.

3.2 Objetivos específicos.

- Determinar la concentración de bacterias totales y coliformes en 4 sitios de muestreo, presentes en agua, sedimento y tilapia (*Oreochromis niloticus*).
- Realizar la determinación presuntiva del género *Aeromonas* mediante las características macroscópicas de las colonias y pruebas bioquímicas.
- Determinar la sensibilidad a antibióticos en los aislados de las diferentes especies de *Aeromonas*.
- Efectuar la búsqueda en *Aeromonas* de genes involucrados en la virulencia (*gcat*, *alt*, *aer/hem*, *ast*, *lafA*).
- Realizar la secuenciación del gen 16S ribosomal para la identificación de las especies de *Aeromonas*.
- Analizar las secuencias para construir un árbol filogenético con las especies de *Aeromonas*.

4. JUSTIFICACIÓN

En los canales del lago de Xochimilco se vierte agua proveniente de las plantas de tratamiento ubicadas a los alrededores, esta agua de recarga no cuenta con la calidad microbiológica necesaria, aunado a las descargas de drenajes domésticos y agrícolas, por lo que el impacto que se provoca al sistema es muy grave.

Xochimilco puede ser considerado como un sistema tecnificado de reutilización, por lo tanto es importante evaluar la presencia de bacterias coliformes totales y fecales, así como de *Aeromonas*, ya que se ha considerado a este género como un microorganismo potencialmente patógeno de animales poiquiloterms y humanos; sin embargo se ha subestimado su importancia; así mismo, no se han determinado del todo los mecanismos de patogenicidad que intervienen en las infecciones que generan.

Por lo anterior, es fundamental aportar información que contribuya a caracterizar a este género tanto fenotípica como genotípicamente, para determinar si la tilapia, el agua y el sedimento pueden ser considerados como reservorios de estas cepas, y de esta manera representar un riesgo latente no sólo para los organismos acuáticos sino también para la población local que los manipula y que llega a ingerir estos peces o verduras crudas irrigadas con agua de los canales.

5. HIPÓTESIS

Si las especies de *Aeromonas* aisladas de tilapia, agua y sedimento presentan genes asociados a patogenicidad (*gcat*, *alt*, *ast*, *aer/hem* y *lafA*), además de resistencia a antibióticos, entonces se podrá considerar a éstas como potencialmente patógenas, representando un riesgo para los organismos acuáticos de la zona, así como para la población humana que llegara a tener contacto o a ingerir dichos organismos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El estudio se realizó en cuatro canales de Xochimilco, D.F., México, seleccionados de acuerdo a su condición de perturbación (zonas con bajo y alto impacto agrícola y urbano). En cada zona seleccionada se realizó la captura de tilapias y la toma de muestra de agua y sedimento. En el cuadro 1 se presentan las características de las cuatro zonas de muestreo.

Cuadro 1. Condiciones de perturbación de las zonas de muestreo.

| Canal | Condición de perturbación |
|-------------|--|
| Apatlaco | Bajo impacto urbano-alto impacto agrícola |
| Apampilco | Bajo impacto urbano-medio impacto agrícola |
| La Asunción | Alto impacto urbano-bajo impacto agrícola |
| El Bordo | Bajo impacto urbano-bajo impacto agrícola |



Figura 1. Localización de los sitios de muestreo.

TRABAJO EN CAMPO

6.2 Registro de parámetros fisicoquímicos del agua.

Cada uno de los zonas fue geoposicionada con un GPS GARMIN 12XL (Figura 2). El registro de parámetros físico-químicos del agua se realizó utilizando un equipo multiparámetros HANNA HI 9829 (Figura 3) equipado con sensores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, oxígeno disuelto (mg/L) y conductividad (mS/cm). La profundidad (cm) y turbidez (cm) se registró utilizando un disco de Secchi (Figura 4).

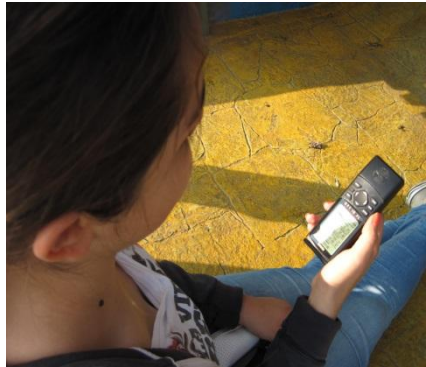


Figura 2. Geoposicionamiento de la zona Apampilco.



Figura 3. Registro de parámetros físico-químicos.



Figura 4. Registro de profundidad y turbidez en el canal El Bordo.

6.3 Muestreo de agua.

Las muestras de agua fueron colectadas con una Botella Van Dorn, la cual se sumergió aproximadamente a 50 cm de la superficie y se vertieron 250 ml de agua en botellas DBO previamente esterilizadas; se colocaron en una hielera con cuerpos fríos para su transporte y posterior análisis en el laboratorio (Figura 5).



Figura 5. Muestra de agua tomada en el canal de El Bordo.

6.4 Muestreo de sedimento.

Las muestras de sedimento fueron obtenidas con un colador de manta del fondo del canal, mismo que fue colectado con una cuchara y colocado en una bolsa de plástico estéril. Las muestras que se obtuvieron de cada zona fueron transportadas en una hielera con cuerpos fríos para su posterior análisis (Figura 6).

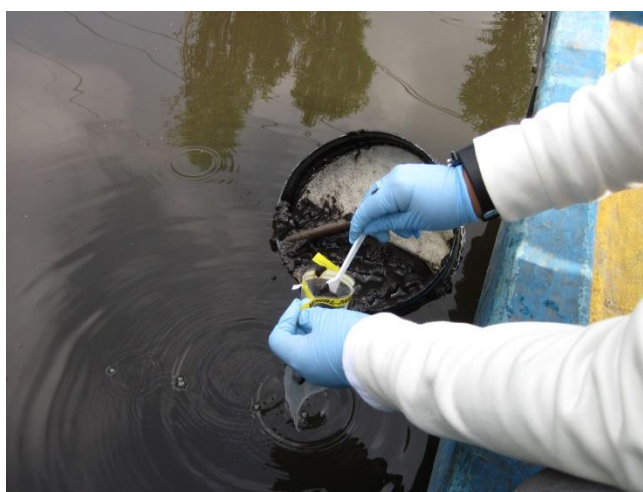


Figura 6. Obtención de la muestra de sedimento

6.5 Captura de tilapias

En cada una de las zonas se capturaron tres tilapias con ayuda de una atarraya (Figura 7). Cada uno de estos organismos fue colocado en bolsas de plástico con agua del mismo canal de donde se extrajeron y fueron transportadas al laboratorio. Los organismos fueron colocados en bolsas separadas, para evitar la transferencia de microbiota entre los mismos.



Figura 7. Captura de tilapias con atarraya.

TRABAJO EN LABORATORIO.

6.6 Aislamiento de *Aeromonas* en tilapias (piel, branquias y contenido estomacal), agua y sedimento.

El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de Aerobiología del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, bajo la coordinación de la Dra. Irma Rosas Pérez.

La obtención de las muestras de piel y branquias se realizó con la ayuda de un hisopo estéril, cubriendo un área de 12 cm² de piel y un raspado en ambas branquias (Figura 8). Cada uno de estos hisopos fue colocado en un tubo de ensayo con 10 ml de solución fisiológica salina estéril (SFS) al 0.85% (Lauer *et al*, 2007). Se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻³ y se procedió a sembrar por espatulado 100 µL en placas con medio de cultivo general agar de soya y tripticaseína (TSA, Bioxon, México) para cuentas totales y en el medio selectivo CromoGen (BIOCEN, Cuba) para la distinción del género *Aeromonas* (García, 2013).

Se pesó 0.1 g PH de contenido estomacal y se colocó en un tubo con 10 mL de SFS, se procedió a diluir hasta 10⁻⁵ y se sembraron 100 µL en placa con los medios de cultivo previamente establecidos (Figura 9).

Con respecto a las muestras de agua, de cada una se tomó una alícuota de 1 mL previamente homogenizada y se colocó en tubos con 9 mL de SFS, se diluyeron hasta 10^{-3} y se sembraron 100 μL en los mismos medios (Figura 10).

Finalmente se tomó 1g PH de sedimento y se colocó en 10 mL de SFS; se diluyó hasta 10^{-5} y se sembraron 100 μL en los medios preestablecidos.

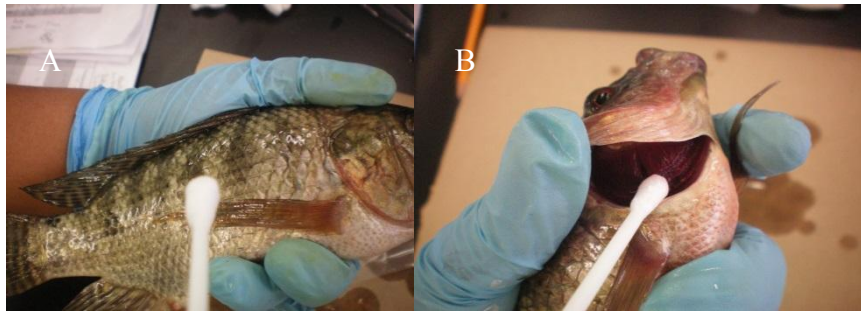


Figura 8. Obtención de muestras de piel (A) y branquias en tilapias (B).



Figura 9. Disección del organismo y obtención de contenido estomacal.

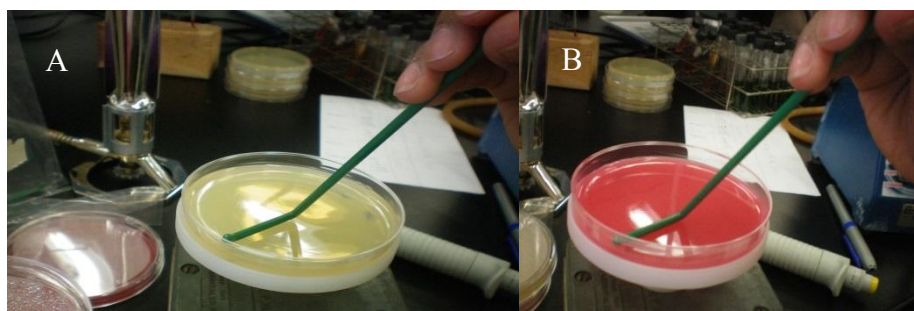


Figura 10. Siembra de muestras en medio TSA (A) y CromoCen (B).

Todas las placas de TSA y ChromoGen se incubaron a 37°C durante 24-48h. Después del tiempo de incubación se realizó la cuantificación de las colonias y el aislado de las colonias presuntivas de *Aeromonas* del medio selectivo. Cada uno de los aislados se sembró y cosechó de TSA y fueron congelados a -70°C en caldo Luria Berttani (Bioscinces, EUA) con 20% de glicerol, para su posterior análisis.

6.7 Datos morfométricos e índices biológicos

De cada uno de los organismos colectados se registraron los siguientes datos morfométricos: longitud total (cm), longitud estándar (cm), ancho (cm), peso (g PH) y sexo; una vez que se realizó la disección del organismo se obtuvo el peso del intestino (g PH) e hígado (g PH).

Posteriormente se evaluó el índice de condición K de Fulton (Ricker 1975) y el índice hepatosomático (Collins y Anderson, 1995), utilizando las siguientes fórmulas:

- Factor de condición K de Fulton = $100 (\text{Peso total, g PH}) / (\text{Longitud total, cm}^3)$
- Índice hepatosomático, IHS = $100 (\text{peso hígado, g PH}) / (\text{peso total, g PH})$

Los índices biológicos son indicadores que se han utilizado en los últimos años para medir el efecto del estrés al que están sometidos los organismos en el ambiente (Silveira, 2005). A través del factor de condición K de Fulton se pueden establecer comparaciones entre dos o más grupos de peces; entre mayor es el valor de K indica mejor condición del grupo de peces. Con respecto al IHS, definido como la relación del peso del hígado con el peso total del cuerpo del pez, permite inferir sobre el posible estado nutricional de los organismos. Entre mayor es el valor del IHS indica una mejor condición nutricional de los peces.

6.8 Análisis de bacterias coliformes totales y fecales.

Para determinar la concentración de bacterias coliformes totales y fecales en muestras de agua, sedimento y contenido estomacal, se utilizó la técnica del número más probable (NMP) con tubos múltiples de fermentación (American Public Health Association, 1985) (Figura 11). Se tomaron 0.1g PH de contenido estomacal por cada pez; para las muestras de agua y sedimento 1 ml y 1 g PH, respectivamente, y se colocaron en 9 y 10 mL de SFS al 0.85%, se realizaron 4 diluciones seriadas 1:10. Cada dilución se inoculó por triplicado (1mL) en Caldo Lactosado (BBL, Cockeysville, MD) y se incubaron durante 24-48 h a 37°C; esta etapa es considerada como prueba presuntiva. El medio de cultivo contiene extracto de carne y peptona como fuente de carbono y nitrógeno, y lactosa como hidrato de carbono; la fermentación de lactosa es confirmada a través de la producción de ácido y gas. De los tubos con reacción positiva, es decir con desarrollo bacteriano y producción de gas (se evidencia a través del uso de campanas Durham), se tomaron 100 µl de cada uno y se inocularon en tubos con caldo Verde Brillante Bilis (BD, Becton, México) incubándose a 37°C durante 24-48 h (prueba confirmativa para coliformes totales). El medio de cultivo contiene peptona como nutriente esencial para el desarrollo bacteriano, sin embargo contiene bilis y verde brillante como agentes selectivos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y algunas Gram negativas, permitiendo el crecimiento solo de coliformes.

De los tubos positivos de caldo Verde Brillante Bilis se sembraron 100 µl en caldo EC (EC; BBL Cockeysville, MD) y se incubaron a 44.5°C durante 24-48 h. La presencia de lactosa en este medio permite el crecimiento de bacterias lactosa positivas y las sales biliares inhiben el crecimiento de la microbiota acompañante. En esta prueba confirmativa de coliformes fecales, la temperatura es la que permite seleccionar las bacterias termotolerantes como *Escherichia coli*. Con base en tablas publicadas por la American Public Health Association (1985) se determinó el número más probable de bacterias coliformes totales y fecales para cada muestra analizada.

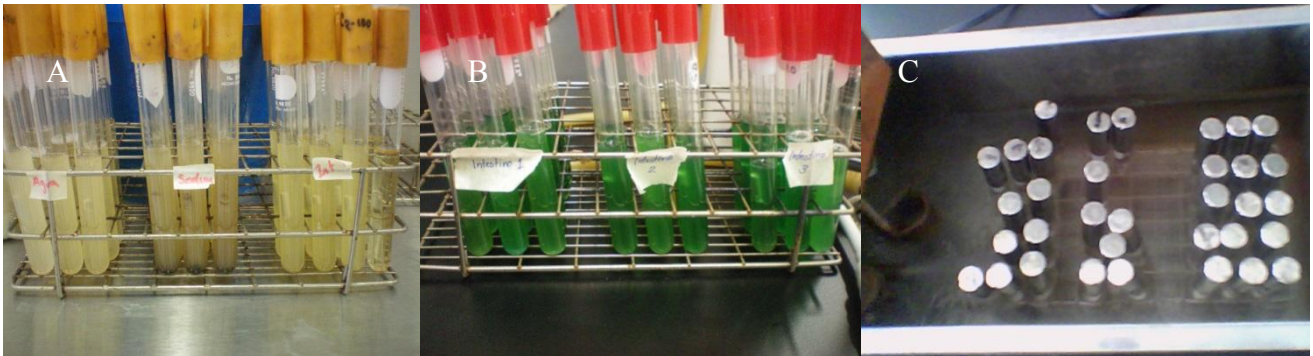


Figura 11. Tubos múltiples de fermentación. A. Tubos de caldo lactosado. B. Tubos de caldo verde brillante bilis. C. Tubos de caldo EC.

6.9 Pruebas bioquímicas.

Las colonias que se aislaron del medio de cultivo CromoGen fueron seleccionadas con base en el color (verde fuerte y verde claro); sin embargo, también se registró y consideró el tamaño de la colonia (pequeña, grande) y la formación de halo (Figura 12). Una vez que se sembraron por estría cruzada en TSA para la obtención de colonias puras, a cada una de estas se le realizaron 4 pruebas bioquímicas. La primera prueba que se realizó fue la de oxidasa (MacFaddin, 2000), en la cual se impregna papel filtro (colocado en una caja de Petri) con diclorhidrato de tetrametil-p-fenildiamina (SIGMA, EUA) en solución acuosa al 1.0%; se tomó una asada del cultivo y se observó la reacción: si vira a morado se considera oxidasa positiva y si es incoloro, amarillento o aparición retardada del color morado, oxidasa negativa (Figura 13). Las *Aeromonas* son oxidasa positiva, es decir presentan la enzima citocromo c oxidasa, la cual se evidencia porque en presencia de oxígeno atmosférico y citocromo c se oxida el sustrato presente en el papel filtro. Los aislados que dieron negativo a la prueba de oxidasa fueron descartados como probables *Aeromonas*.

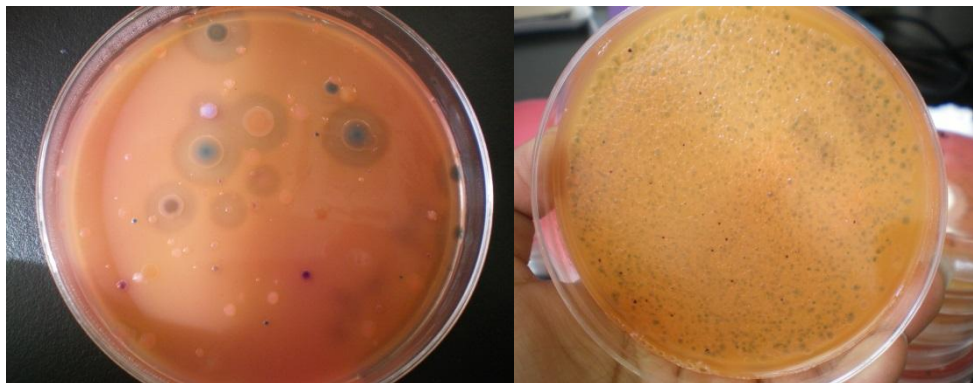


Figura 12. Caracterización fenotípica de probables *Aeromonas*. Se seleccionaron las colonias que presentaron un color verde claro y fuerte, con y sin formación de halo.



Figura 13. Realización de la prueba de oxidasa a los aislados de probables *Aeromonas*.

Los aislados que dieron positivo en la prueba de oxidasa fueron sembrados en Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI, Bioxon, México) (Pérez *et al*, 1897). En este caso el TSI se distribuyó en tubos con 4 mL de medio, se esterilizaron y se dejó solidificar el agar en pico de flauta profundo. Cada aislado se inoculó picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo, se incubaron a 37°C durante 18-24 h. El medio TSI presenta un color anaranjado, contiene lactosa, sacarosa y glucosa (hidratos de carbono fermentables), rojo de fenol como indicador de pH, tiosulfato de sodio, sulfato de amonio y hierro. Si se observa un viraje de anaranjado a amarillo el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. Las especies de *Aeromonas* son microorganismos fermentadores de glucosa y además producen gas. Por lo anterior se eligieron los aislados con la siguiente reacción en TSI: superficie roja/fondo amarillo, superficie amarilla/ fondo amarillo y producción de gas (Figura 14), el cual se evidenció por la formación de burbujas, elevación y ruptura del medio.



Figura 14. Ejemplo de crecimiento de los aislados en medio TSI.

Posteriormente los aislados fueron inoculados en medio O/F de Hugh y Leifson (DIBICO, México) (MacFaddin, 2000), que es un medio semisólido que permite analizar la utilización de glucosa por oxidación o fermentación, la cual se evidencia con el viraje del color verde a amarillo. Se prepararon tubos por duplicado para cada aislado, se inocularon por picadura y uno de ellos se cubrió con aceite mineral generando un ambiente anaerobio; se incubaron a 37°C durante 48 h. Si se observa el viraje de color verde a amarillo en ambos tubos (aerobio y anaerobio) se considera que el microorganismo es fermentador, como en el caso de las especies de *Aeromonas* (Figura 15). Este medio de cultivo también permite observar la movilidad del microorganismo, en el caso del género *Aeromonas* todas las especies son móviles excepto *A. salmonicida* y *A. media*, por lo que se consideraron ambos casos.

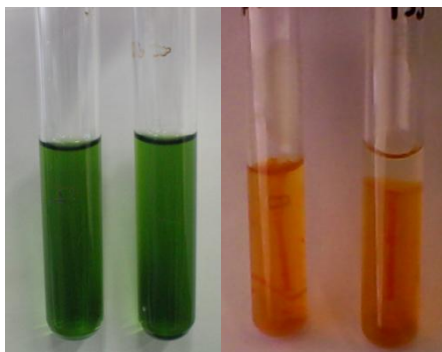


Figura 15. Crecimiento de los aislados en medio O/F de Hugh y Leifson.

Los aislados fueron inoculados posteriormente en medio SIM (Becton, México) para determinar la producción de indol, sulfuro de hidrógeno y movilidad (O'Leary 1989). La inoculación del medio se realiza utilizando un asa recta, procurando que la misma se haga por el centro y abarcando 2 tercios de profundidad del medio de cultivo, se incubaron a 37°C durante 18-24 h. La movilidad se evidencia por el enturbiamiento del medio o por el crecimiento que difunde más allá de la línea de siembra del microorganismo y negativa, si el crecimiento es solo en la línea de inoculación; la producción de H₂S se considera positiva si existe la formación de un precipitado negro en el medio de cultivo. Para determinar la producción de indol, se colocaron 2-3 gotas de reactivo de Kovac's y se observó el viraje, si este no cambio de color se consideró negativo, en cambio si el reactivo viró de amarillo a rojo, se consideró positivo. Las especies de *Aeromonas* producen indol, por lo que se descartaron los aislados que dieron negativo para esta prueba (Figura 16).

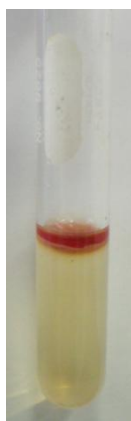


Figura 16. Producción de indol de uno de los aislados de probables *Aeromonas*.

6.10 Análisis de resistencia antimicrobiana.

La prueba de susceptibilidad a antibióticos se realizó por el método de Kirby Bauer, se preparó agar Mueller-Hinton (Bioxon, México), el cual se vertió en cajas de Petri considerando que estas deben presentar 4 mm de espesor. Se utilizaron cultivos frescos de cada uno de los aislados y en solución fisiológica salina al 0.45 % se realizó una suspensión bacteriana ajustando la misma al 0.5 McFarland con un densitómetro (DensiCheck plus bioMérieux, Inc, Durham, North Carolina, USA) (Figura 17).

La inoculación se realizó sumergiendo un hisopo estéril en la suspensión bacteriana, eliminando el exceso de inóculo al presionar el hisopo contra las paredes del tubo; cada placa se inoculó por estría masiva, rotando la placa de agar Mueller-Hinton para asegurar la distribución y crecimiento homogéneo del inóculo, dejándose secar antes de aplicar los discos para antibiograma (Accutrack, México). Los sensidiscos se colocaron tomándolos con unas pinzas previamente esterilizadas y presionando ligeramente el disco para asegurar su adherencia a la placa. Las placas se incubaron invertidas a 30°C durante 18 h. Los antibióticos probados fueron: Imipenem (10µg), cefaperazone (25µg), cotrimoxazole (25µg), meropenem (10µg), cefpirome (30µg), telcoplanin (30µg), cefotoxamina (30µg), ácido nalidíxico (30µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacina (5µg), cefxime (30µg), cefdinir (5µg) y ampicilina (30µg).

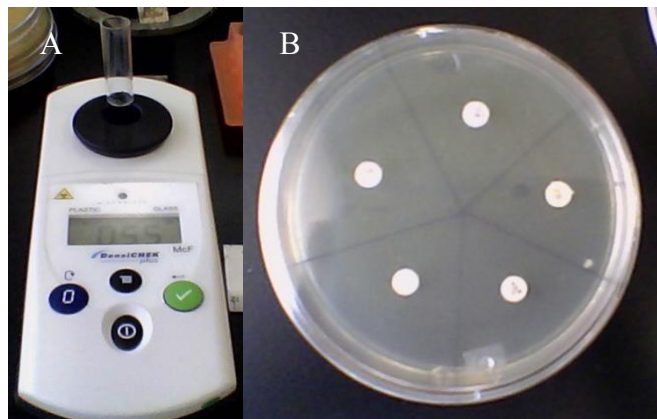


Figura 17. Prueba de susceptibilidad a antibióticos. A. Ajuste en el densitómetro, de la suspensión bacteriana al 0.5 McFarland. B. Colocación de sensidiscos en la placa.

6.11 Secuenciación del gen 16S ribosomal.

Para identificar las especies del género *Aeromonas*, primero se realizó la extracción del ADN de cada uno de los aislados, con el kit de extracción QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN), siguiendo las especificaciones del proveedor.

La amplificación del gen 16S ribosomal se realizó utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores universales (27F: 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', y 1492R: 5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') bajo las siguientes condiciones: 94°C por 1 minuto, 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 56°C por 30 segundos, 72°C durante 1 minuto con 30 segundos y un ciclo final de 72°C por 5 minutos. Después de la amplificación, para verificar la presencia del gen, se corrió un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE al 1X, durante 40 minutos en una cámara de electroforesis horizontal, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se observó el amplificado con un transiluminador.

Purificación del amplificado y secuenciación: Se tomaron 100 µl del amplificado y se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction kit QIAGEN siguiendo las especificaciones del proveedor. Los amplificadores purificados de cada aislado fueron enviados al Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación. Una vez recibidas las secuencias fueron revisadas utilizando el programa Chromas Lite 2.0 y comparadas con las secuencias disponibles en el GenBank por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA).

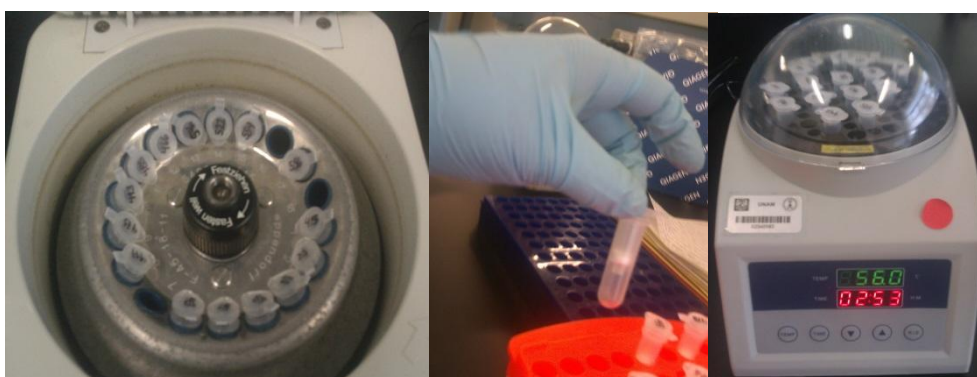


Figura 18. Extracción de DNA.

6.12 Detección de genes putativos de virulencia

Mediante la realización de una PCR, se analizó la presencia de 5 genes de virulencia: *gcat* (glicerofosfolípido colesterol acil transferasa), *alt* (enterotoxina citotónica), *aer/hem* (aerolisina/hemolisina), *ast* (proteasa) y *lafA* (flagelo), utilizando los oligonucleótidos correspondientes para cada gen (Tabla 1). Como control positivo para los genes *gcat*, *aer/hem*, *ast* y *alt*, se utilizó la cepa de referencia de *Aeromonas. hydrophila* ATCC 7966 y *A. caviae* Sch3 como control positivo para el gen *lafA* (García, 2013).

Las mezclas de reacción y condiciones se estandarizaron (Taq, dNTP's, ADN y agua), para obtener un volumen final de 50 µL (Tabla 1). Para la amplificación de los genes *gcat*, *aer/hem* y *lafA*, se utilizaron las siguientes condiciones: 35 ciclos a 95°C por 5 minutos, 94°C durante 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y un ciclo final de 72°C por 5 minutos; para los genes *ast* y *alt* se utilizaron las siguientes: 25 ciclos a 95°C por 1 minuto, 94°C durante 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y un ciclo final de 72°C por 10 minutos. Los amplificadores se comprobaron por electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó a través de un transiluminador.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos de cada uno de los 5 genes putativos de virulencia.

| Gen | Secuencias de iniciadores (5' - 3') | Tamaño del amplificado (pb) |
|----------------|---|-----------------------------|
| <i>gcat</i> | <i>gcat</i> -F: 5'CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG-3' <i>gcat</i> -R: 5'GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT-3' | 237 |
| <i>aer/hem</i> | <i>aer</i> -F: 5'CCTATGGCCTGAGCGAGAAG-3' <i>aer</i> -R: 5'CCAGTTCCAGTCCCACCACT-3' | 431 |
| <i>alt F</i> | <i>alt</i> -F: 5'AAAGCGTCTGACAGCGAAGT-3' <i>alt</i> -R: 5'AGCGCATAGGCGTTCTCTT-3' | 320 |
| <i>ast F</i> | <i>ast</i> -F: 5'ATCGTCAGCGACAGCTTCTT-3' <i>ast</i> -R: 5'CTCATCCCTTGGCTTGTGT-3' | 504 |
| <i>lafA</i> | <i>lafA</i> -F: 5'CAAACCTT(T/C)GC(C/T)TC(T/C)(C/A)TGACC-3' <i>lafA</i> -R: 5'TCTTGGTCAT(G/A)TTGGTGCT(C/T)-3' | 743 |

6.13 Construcción de árbol filogenético.

Las secuencias de ADN fueron revisadas y corregidas utilizando el programa BioEdit 7.1, generando una base de datos con las secuencias corregidas y secuencias de cepas tipo de *Aeromonas* (*Aeromonas salmonicida* ATCC 33658T, *Aeromonas veronii* ATCC 35624, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Aeromonas jandaei* ATCC 49568, *Aeromonas allosaccharophila* CECT 4199, *Aeromonas media* ATCC 33907, *Aeromonas piscicola* secuencia parcial). La alineación múltiple de las secuencias se realizó a través de Clustal W y la construcción del árbol filogenético se llevó a cabo por el método del vecino más cercano utilizando el programa MEGA 6.

6.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statistica Versión 6. Se usó estadística no paramétrica, ya que se trabajó con una muestra pequeña (≤ 20 datos), además de que los datos no presentaron una distribución normal. Las cajas de bloques fueron generadas directamente de los datos. Se empleó el coeficiente de correlación de Spearman para evaluar la asociación entre variables; para la comparación entre dos muestras independientes se aplicó la prueba de Mann-Whitney U test, con un nivel de confianza del 95%.

7. RESULTADOS

7.1 Registro de parámetros fisicoquímicos en agua.

En la tabla 2 se muestran los parámetros fisicoquímicos en agua de las zonas de muestreo. Se observa que el canal La Asunción (zona de alto impacto urbano) presenta una baja concentración de oxígeno disuelto (1.66 mg/L) y una alta turbidez; lo contrario sucede en el Bordo (zona de bajo impacto urbano-bajo impacto agrícola), considerada una de las áreas con baja perturbación urbana, donde se registró una baja turbidez y el valor máximo de pH.

El valor máximo de conductividad se registró en la Asunción y el mínimo en el Bordo. En cuanto a la temperatura, se registraron valores de entre 10.9-19.9°C siendo en Apatlaco donde se registró el valor máximo. La zona de Apampilco presentó valores intermedios de oxígeno disuelto, conductividad, pH y turbidez.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos en las muestras de agua.

| SITIO | Coordenadas | Profundidad (cm) | Turbidez (cm) | pH | Temperatura (°C) | Oxígeno disuelto (mg/L) | Conductividad (mS/cm) |
|-------------|--------------------------------------|------------------|---------------|------|------------------|-------------------------|-----------------------|
| El Bordo | N 19° 17' 09.3'' W 99° 05' 50.2'' | 75 | 35 | 8.83 | 10.9 | 3.02 | 772 |
| Apampilco | N 19° 16' 31.9'' W 99° 05' 49.6'' | 108 | 31 | 7.56 | 15.9 | 5.30 | 784 |
| La Asunción | N 19° 16' 09.1'' W 99° 06' 05.3'' | 130 | 28 | 7.35 | 17.4 | 1.66 | 886 |
| Apatlaco | N 19° 15' 46.5'' W 99° 05' 04.5'' | 165 | 40 | 7.48 | 19.9 | 3.29 | 871 |

7.2 Datos morfométricos de tilapias.

Los datos morfométricos de los 12 organismos colectados se presentan en la tabla 3. Los peces presentaron una longitud total de entre 14-24.5 cm, y un peso entre 33-230.5 g PH. Las tilapias capturadas en los canales del Bordo y la Asunción presentaron un mayor peso y talla en comparación con los organismos de Apampilco y Apatlaco.

En cuanto a los índices biológicos, el valor más bajo del Índice de Fulton fue de 1.20 y se obtuvo en un pez de Apampilco; el más alto fue de 1.77 y se registró en Apatlaco (Tabla 3). En relación al IHS (Figura 19), el valor promedio más alto se obtuvo en La Asunción con 2.4, y el más bajo en Apampilco (1.58); en el Bordo y Apatlaco los valores promedio obtenidos fueron muy similares, 1.98 y 1.99 respectivamente. Este resultado indica que los peces de La Asunción se encuentran aparentemente en un mejor estado nutricional.

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los valores del índice de Fulton ($p = 0.382$) y Hepatosmático ($p = 0.512$) de los peces provenientes de los diferentes canales.

Tabla 3. Registro de datos morfométricos e índices de condición en peces de 4 canales de Xochimilco (El bordo, Apampilco, Asunción y Apatlaco).

| SITIO | Organismo | Longitud total (cm) | Longitud estándar (cm) | Ancho (cm) | Peso (g) | Peso Hígado (g) | Peso intestino (g) | Sexo | Índice de Fulton | Índice hepatosomático |
|-------------|-----------|---------------------|------------------------|------------|----------|-----------------|--------------------|--------|------------------|-----------------------|
| El Bordo | 1 | 24.5 | 20 | 9 | 224.7 | 3.3 | 13.5 | Macho | 1.52 | 1.49 |
| | 2 | 19.5 | 16 | 6.8 | 116.9 | 2.6 | 10.2 | Hembra | 1.57 | 2.27 |
| | 3 | 18 | 15 | 7 | 93.6 | 2 | 5.2 | Hembra | 1.60 | 2.18 |
| Apampilco | 4 | 14 | 11 | 5 | 33 | .4 | 2 | Macho | 1.20 | 1.22 |
| | 5 | 18.5 | 15 | 7 | 100 | 2.3 | 5.2 | Hembra | 1.57 | 2.35 |
| | 6 | 24.5 | 19 | 9 | 230.5 | 2.7 | 12.7 | Macho | 1.56 | 1.18 |
| La Asunción | 7 | 20 | 16.5 | 7.5 | 114.6 | 2.7 | 7.5 | Hembra | 1.43 | 2.41 |
| | 8 | 20 | 16.5 | 7 | 110.1 | 2.8 | 5.1 | Macho | 1.37 | 2.60 |
| | 9 | 22 | 18 | 8 | 143.7 | 3.1 | 6.4 | Hembra | 1.34 | 2.20 |
| Apatlaco | 10 | 16.8 | 14 | 6 | 70.4 | 1.4 | 3.5 | Hembra | 1.48 | 2.02 |
| | 11 | 18.4 | 14.8 | 6.7 | 94.4 | 1.7 | 5.1 | Hembra | 1.51 | 1.83 |
| | 12 | 19.9 | 17.3 | 7.9 | 139.6 | 2.9 | 8.2 | Hembra | 1.77 | 2.12 |

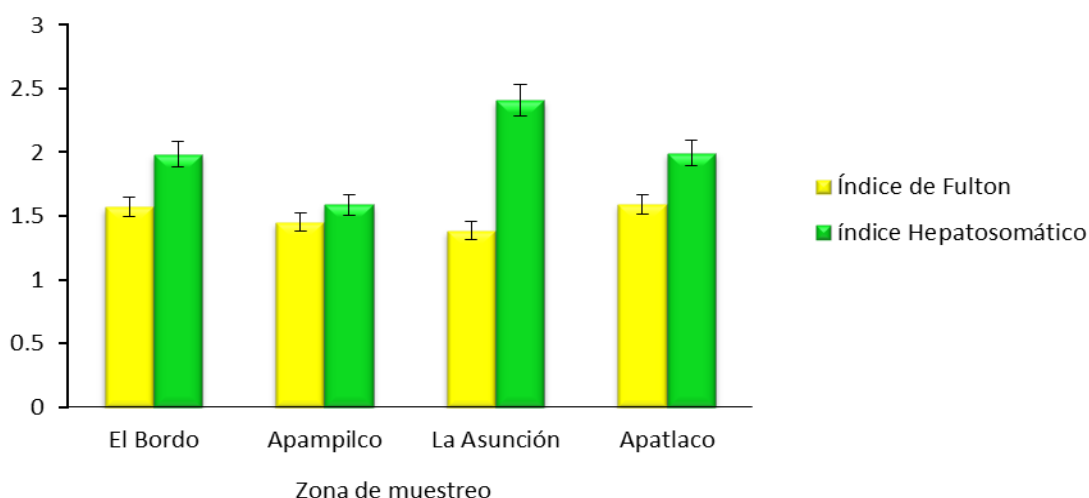


Figura 19. Comparación de los Índices de Fulton y Hepatosomático de los organismos capturados en las 4 zonas de muestreo.

7.3 Cuantificación de grupos bacterianos en tilapia (piel, branquias y contenido estomacal), agua y sedimento.

En la tabla 4 se muestran las concentraciones de bacterias mesofílicas totales; las concentraciones más altas se obtuvieron en contenido estomacal de los peces y sedimento. En la zona de Apatlaco se registró la mayor concentración de bacterias en agua con 205,000 unidades formadoras de colonias por mL (UFC/ mL), mientras que la Asunción presentó concentraciones máximas en muestras de piel, branquias y contenido estomacal.

Tabla 4. Concentración de bacterias mesofílicas totales aisladas en agua, sedimento y tejidos de tilapia provenientes de cuatro zonas de muestreo de la zona lacustre de Xochimilco.

| | Agua UFC/mL | Sedimento UFC/g | Piel UFC/cm ² | Branquias UFC/cm ² | Contenido estomacal UFC/g |
|--------------------|----------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| El Bordo | 1.6 | 1110 | 0.94 | 1.7 | 9530 |
| Apampilco | 3.35 | 4050 | 1.4 | 26.9 | 3837 |
| La Asunción | 3.3 | 2390 | 15.4 | 196.7 | 16290 |
| Apatlaco | 205 | 2230 | 5.7 | 45.9 | 8790 |

Todos los valores están multiplicados $\times 10^3$

Las mayores concentraciones de bacterias coliformes totales y fecales en sedimento, agua y contenido estomacal se registraron en la Asunción, mientras que los valores mínimos en agua y contenido estomacal corresponden a la zona del Bordo; en cuanto a sedimento, en Apampilco se registraron los valores mínimos tanto de coliformes totales como de fecales

(Tabla 5). El análisis de correlación de Spearman ($r_s = 0.68$), con un nivel de confianza del 99% ($\alpha = 0.01$), muestra que existe una correlación positiva estadísticamente significativa entre las concentraciones de coliformes totales y fecales en las cuatro zonas muestreadas.

Tabla 5. Concentración de bacterias coliformes totales y coliformes fecales (NMP) en agua, sedimento y contenido estomacal de peces, de los cuatro sitios de muestreo.

| | Agua* CT - CF | Sedimento** CT - CF | Contenido estomacal 1** CT - CF | Contenido estomacal 2** CT - CF | Contenido estomacal 3** CT-CF |
|------------------|------------------|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| El Bordo | 36-36 | 4600 - ND | 930 - 91 | 110 - 36 | 73 - ND |
| Apampilco | 91 - ND | 430 - 73 | 2100 - 390 | 930 - 430 | 2400 - 1600 |
| Asunción | 11000 - 2400 | 11000 - 390 | 4600-4600 | 2400-2400 | 11000- 11000 |
| Apatlaco | 2400 - 430 | 2400 - 150 | 2400-11000 | 2400-2400 | 11000-11000 |

CT: Coliformes Totales; CF: Coliformes Fecales

*Número más probable (NMP) /100 ml

** Número más probable (NMP) /g PH.

7.4 Aislamiento de *Aeromonas* presuntivas.

De las muestras que se sembraron en medio CromoCen se obtuvieron 501 aislados, de los cuales a través de las pruebas bioquímicas 223 se consideraron como probables *Aeromonas* (Tabla 6). El 63 % de estos fueron obtenidos de las muestras de El Bordo y Apatlaco, el 11% y 26 % fueron aisladas de la zona de Apampilco y la Asunción respectivamente (Figura 20).

Tabla 6. Número de aislados de probables *Aeromonas* en agua, sedimento y tejidos de tilapia provenientes de cuatro zonas de muestreo de la zona lacustre de Xochimilco.

| | Agua | Sedimento | Piel | Branquias | Contenido estomacal | No. de aislados |
|--------------------|------|-----------|------|-----------|------------------------|--------------------|
| El Bordo | 7 | 9 | 14 | 19 | 21 | 70 |
| Apampilco | 20 | 0 | 1 | 0 | 3 | 24 |
| La Asunción | 3 | 4 | 9 | 21 | 21 | 58 |
| Apatlaco | 9 | 22 | 19 | 10 | 11 | 71 |



Figura 20. Porcentaje de aislados de probables *Aeromonas* obtenidos en cada una de las zonas .

Las concentraciones de bacterias mesofílicas y *Aeromonas* presuntivas se muestran en las Figura 21 y 22; las mayores concentraciones se presentan en muestras de contenido estomacal, agua y sedimento. Los datos arrojan que el porcentaje de *Aeromonas* con respecto a las bacterias mesofílicas aisladas en piel es de 12.72%, y menor al 1% en branquias, contenido estomacal, sedimento y agua.

El coeficiente de correlación de Spearman ($r_s = -0.17$) muestra que, con un nivel de confianza del 99% ($\alpha = 0.01$) no existe una correlación estadísticamente significativa entre coliformes fecales y probables *Aeromonas*.

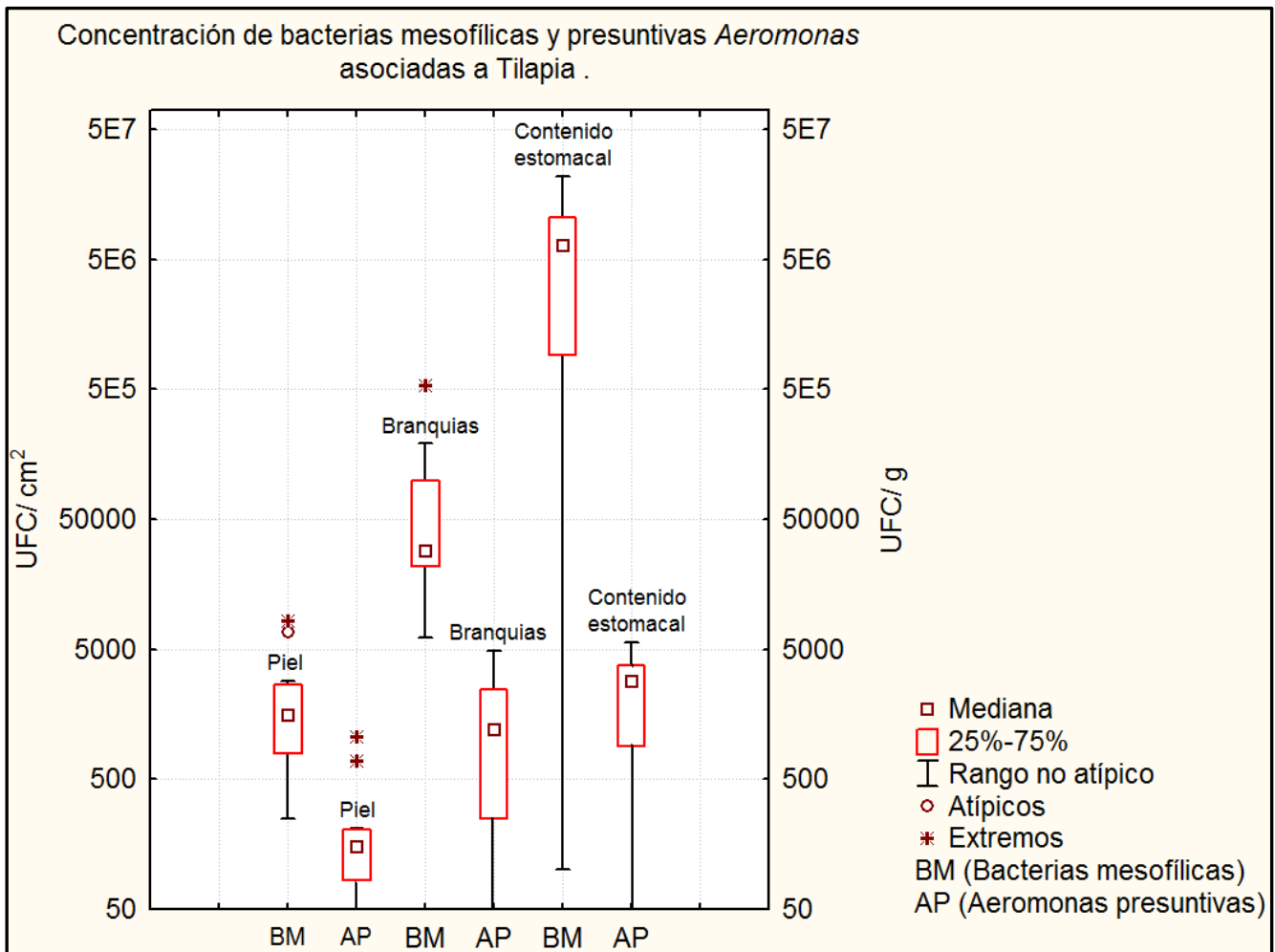


Figura 21. Concentración de bacterias mesofílicas y *Aeromonas* presuntivas, asociadas a tilapia.

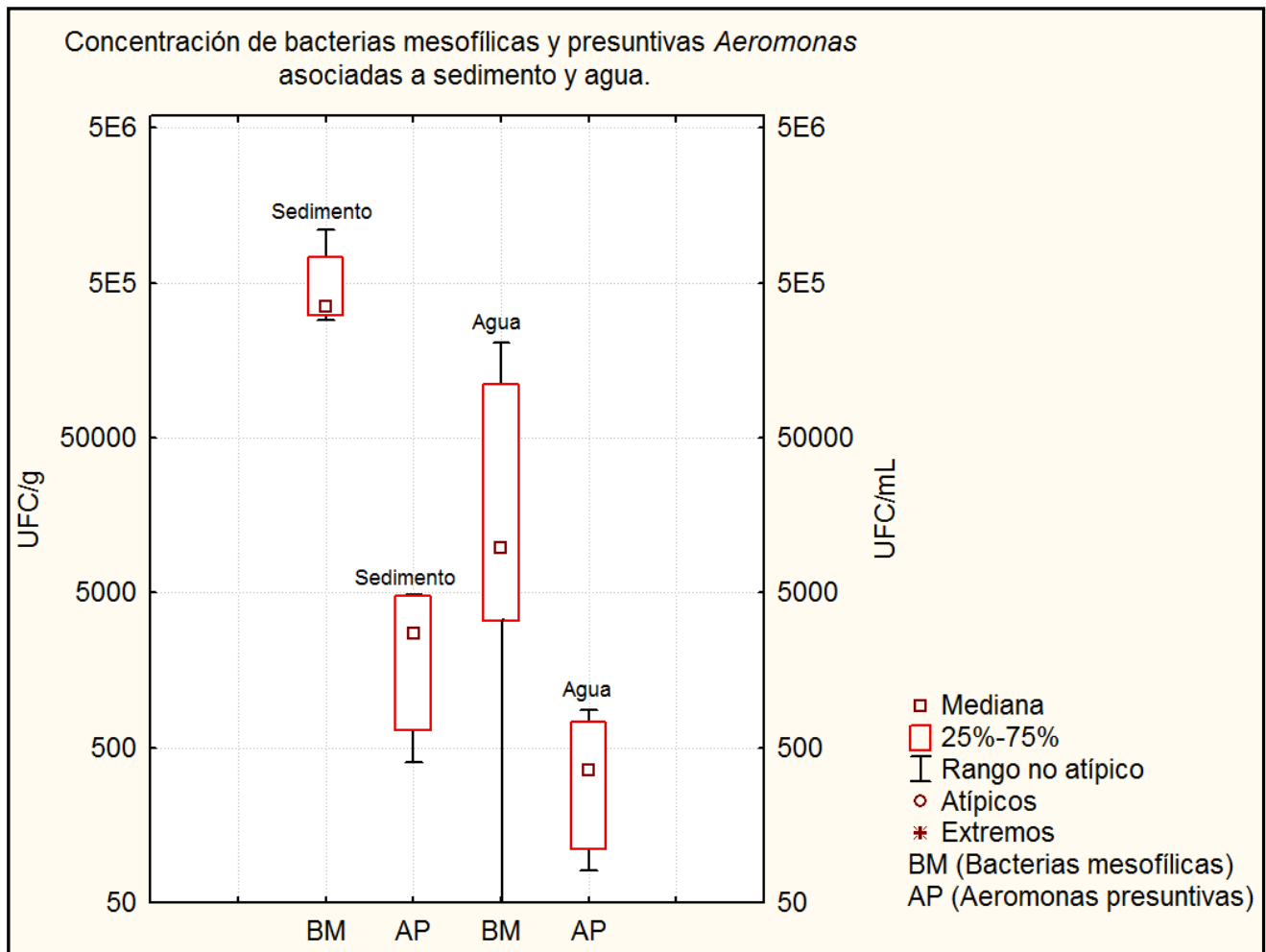


Figura 22. Concentración de bacterias mesofilicas y *Aeromonas* presuntivas, asociadas a sedimento y agua.

7.5 Análisis de susceptibilidad antimicrobiana.

El resultado de la susceptibilidad a los antimicrobianos se obtuvo con base en los puntos de corte publicados por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007).

Se evaluó la susceptibilidad a 13 antibióticos en 200 aislados, de los cuales el 100% fueron resistentes a ampicilina, el 18% a cotrimoxazole y ácido nalidíxico. El 100% de los aislados fueron sensibles a imipenem, meropenem, cefpirome, relcoplanin, cefotaxamina y gentamicina (Tabla 7).

Tabla 7. Número de aislados resistentes, intermedios y susceptibles a 13 antibióticos.

| Antibiótico | Resistente (R) | Intermedio (I) | Sensible (S) |
|-----------------------|----------------|----------------|--------------|
| Imipenem (IS) | 0 | 0 | 200 |
| Cefoperazone (CS) | 0 | 2 | 198 |
| Cotrimoxazole (TC) | 30 | 33 | 137 |
| Meropenem (MR) | 0 | 0 | 200 |
| Cefpirome (CE) | 0 | 0 | 200 |
| Telcoplanin (PT) | 0 | 0 | 200 |
| Cefotoxamina (CX) | 0 | 0 | 200 |
| Ácido Nalidíxico (NA) | 30 | 0 | 170 |
| Gentamicina (GM) | 0 | 0 | 200 |
| Ciprofloxacina (CL) | 0 | 1 | 199 |
| Cefixime (FX) | 0 | 0 | 200 |
| Cefdinir (CN) | 0 | 3 | 197 |
| Ampicilina (AMP) | 200 | 0 | 0 |

Considerando el mismo número de aislados de agua, sedimento y tejidos de tilapia, así como el sitio de muestreo y los resultados de las pruebas bioquímicas, se seleccionaron 100 aislados de probables *Aeromonas*; incluyendo aquellos en los que se registró resistencia a ampicilina, ácido nalidíxico y cotrimoxazole. En la figura 23 se muestra el número de aislados que fue resistente a 1-3 antibióticos. El 62% de los mismos solo presentó resistencia a un antibiótico, el 34% a dos antibióticos y sólo el 4% presentó resistencia a 3 antibióticos (ampicilina, ácido nalidíxico y cotrimoxazole).

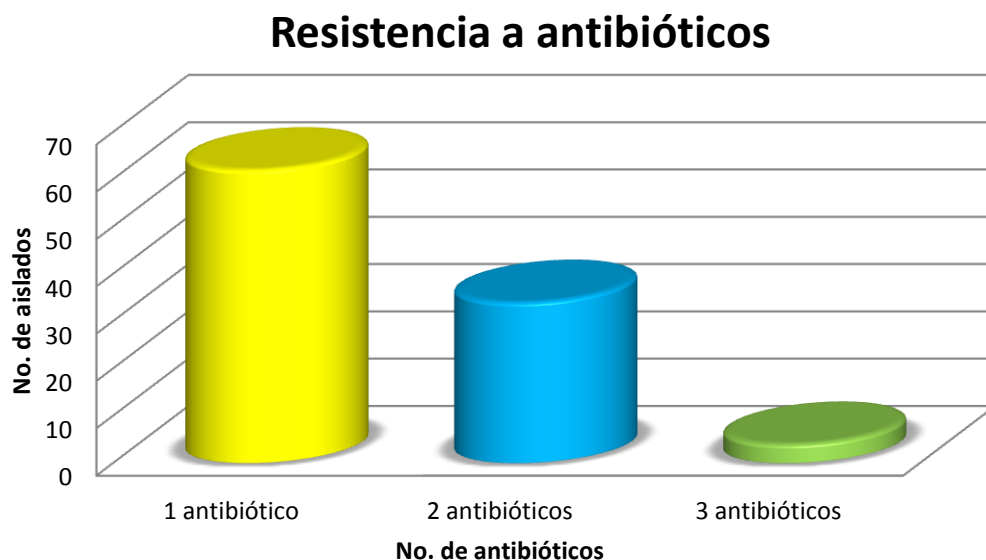


Figura 23. Número de aislados de *Aeromonas* resistentes de uno a tres antibióticos.

7.6 Secuenciación del gen 16S ribosomal.

A los 100 aislados de probables *Aeromonas*, se les realizó la secuenciación del gen 16S ribosomal, en la figura 24 se muestra la banda de amplificación.

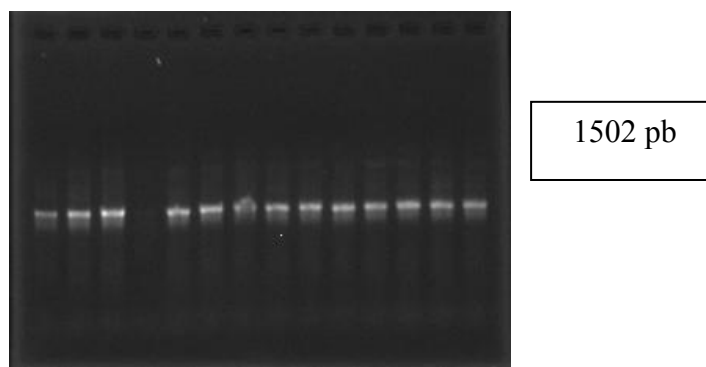


Figura 24. PCR del 16S ribosomal de los aislados de probables *Aeromonas*.

Se mandaron a secuenciar los 100 aislados (Tabla 8), los cuales al compararlos con las secuencias disponibles en GenBank, se identificaron 8 especies: *A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. allosaccharophila* y *A. piscicola*. La especie más abundante fue *A. veronii*, con una frecuencia de aislamiento del 62%, seguida de *A. jandaei* (15%). Las especies aisladas con menor frecuencia fueron *A. media*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y *A. piscicola*.

Tabla 8. Porcentaje de especies de *Aeromonas* aisladas.

| Especie | Aislados (%) |
|------------------------------------|--------------|
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | 1 |
| <i>Aeromonas veronii</i> | 62 |
| <i>Aeromonas caviae</i> | 5 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 1 |
| <i>Aeromonas jandaei</i> | 15 |
| <i>Aeromonas media</i> | 2 |
| <i>Aeromonas allosaccharophila</i> | 13 |
| <i>Aeromonas piscicola</i> | 1 |

7.7 Genes de virulencia en *Aeromonas*

Se utilizó como control positivo la cepa de referencia *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, comprobando la presencia de 4 genes de virulencia en esta (*gcat*, *alt*, *aer/hem* y *ast*), como control positivo para *lafA*, se utilizó *A. caviae* Sch3 (Figura 25).

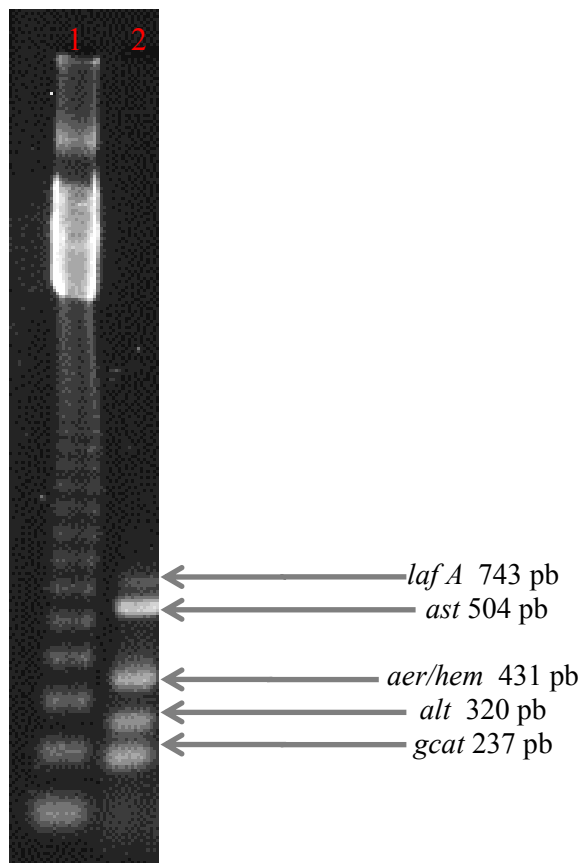


Figura 25. PCR de genes de virulencia, se observa en el primer carril el marcador 123 pb , en el carril 2 *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 como control positivo para los genes *gcat*, *alt*, *aer/hem* y *ast* y *A. caviae* Sch3 como control positivo para el gen *lafA*.

En 100 aislados se evaluó la presencia de 5 genes de virulencia: *gcat* (glicerofosfolípido colesterol acil transferasa), *alt* (enterotoxina citotónica), *aer/hem* (aerolisina/hemolisina), *ast* (proteasa) y *lafA* (flagelo). En la tabla 9 se muestra el porcentaje de aislados que presentaron más de 1 gen de virulencia. El gen *gcat* se presentó en el total de los aislados, sin embargo el 17% de los mismos presentaron únicamente este gen.

Tabla 9. Número de aislados con diferentes combinaciones de genes.

| Genes | Aislados (%) |
|---------------------------------------|--------------|
| <i>gcat, aer/hem</i> | 40 |
| <i>gcat, aer/hem, lafA</i> | 33 |
| <i>gcat, aer/hem, laf A, alt</i> | 1 |
| <i>gcat, laf A</i> | 6 |
| <i>gcat, aer/hem, ast</i> | 1 |
| <i>gcat, aer/hem, alt</i> | 1 |
| <i>gcat, aer/hem, laf A, ast, alt</i> | 1 |

En la figura 26 se muestra la presencia de 1 a 5 genes de virulencia en las diferentes especies de *Aeromonas*, sólo una cepa presentó 5 genes de virulencia y fue identificada como *A. salmonicida*.

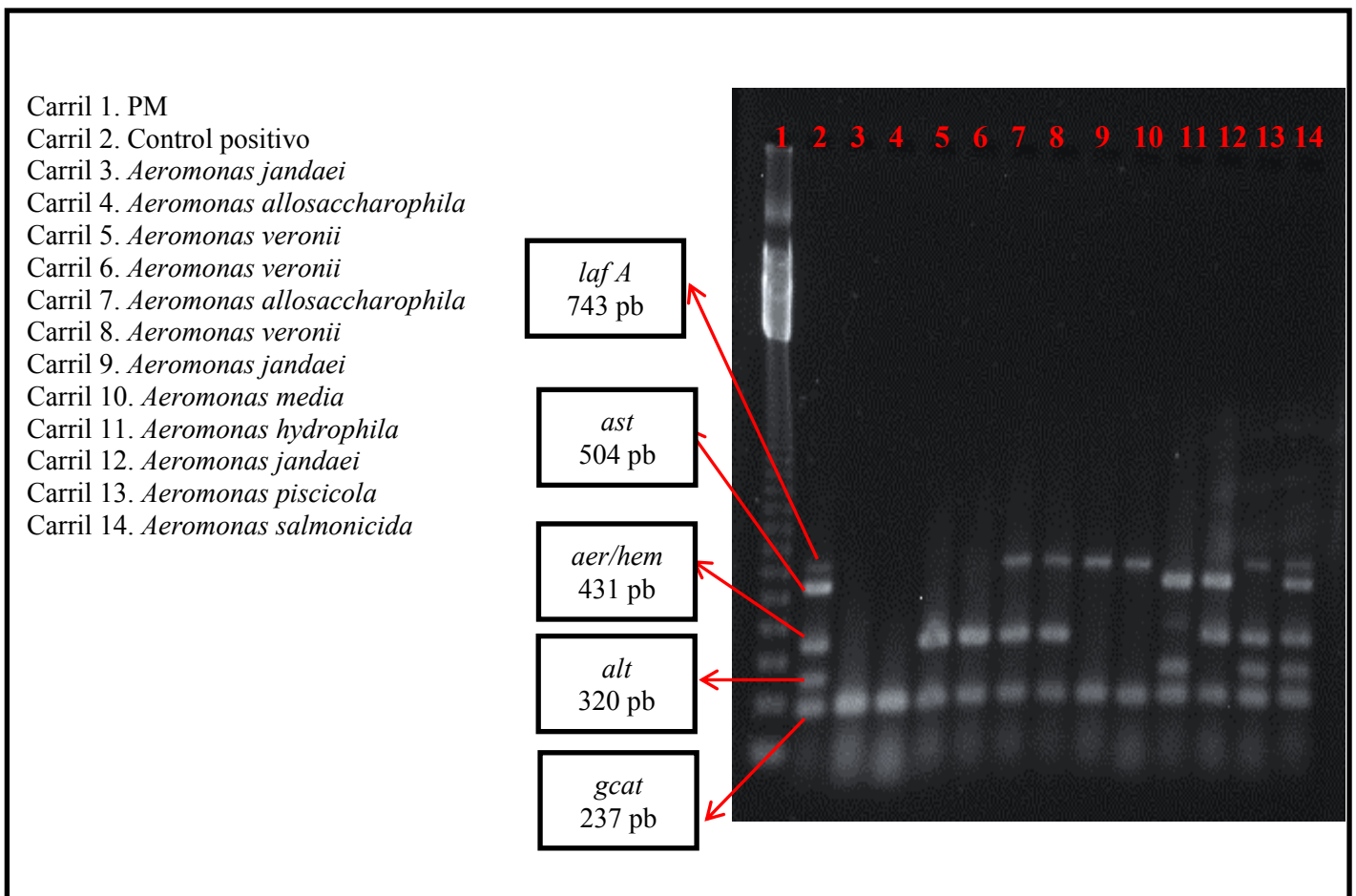


Figura 26. PCR para 5 genes de virulencia. Se observa en el primer carril el marcador 123 pb, carril 2 *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 y *A. caviae* Sch3 como controles positivos; en los demás carriles se observan las cepas de *Aeromonas* ambientales con 2,3,4 y 5 genes de virulencia.

7.8 Presencia de genes de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana.

En la Tabla 10 se muestra la distribución del número de genes de virulencia entre las diferentes especies de *Aeromonas*; así como la resistencia que presentaron a antimicrobianos. La especie *A. veronii* fue la más frecuentemente aislada en muestras de tilapia, agua y sedimento, presentando de 1 a 3 genes de virulencia; además, estas cepas presentaron resistencia a tres antimicrobianos. *A. piscicola* presentó 4 genes de virulencia y *Aeromonas salmonicida* 5 genes; aisladas en agua y tilapia, respectivamente.

Tabla 10. Frecuencia de resistencia a antibióticos en aislados de *Aeromonas* en tejidos de tilapia, agua y sedimento.

| N° de genes | Especie | Antibióticos | | | Fuente de Aislados | | |
|-------------|----------------------------|--------------|----|----|--------------------|------|-----------|
| | | AMP | TC | NA | tilapia | agua | sedimento |
| 1 | <i>A.veronii</i> | X | | | 3 | 2 | |
| | | X | X | | 1 | | |
| | | X | | X | 1 | | 1 |
| | | X | X | X | 1 | | |
| | <i>A.caviae</i> | X | | | | 1 | |
| | <i>A.jandei</i> | X | | | 3 | 1 | |
| | <i>A.allosaccharophila</i> | X | | X | 1 | | 1 |
| 2 | <i>A.veronii</i> | X | | | 10 | 8 | 5 |
| | | X | X | | | 2 | 1 |
| | X | | X | 3 | | | |
| | X | X | X | | | 1 | |
| | <i>A.caviae</i> | X | | | 1 | | 1 |
| | <i>A.allosaccharophila</i> | X | | X | 1 | | |
| | | X | | | 1 | 1 | 2 |
| | <i>A.jandaei</i> | X | | X | | | 1 |
| | | X | | X | 1 | 1 | 1 |
| | X | X | | 1 | | 1 | |
| | <i>A.media</i> | X | | | 2 | | |
| 3 | <i>A.veronii</i> | X | | | 9 | 3 | 2 |
| | | X | X | | 3 | | 1 |
| | | X | | X | 5 | | |
| | <i>A. hydrophila</i> | X | X | X | 1 | | |
| | <i>A.jandaei</i> | X | X | | 3 | | |
| | X | | | 2 | | | |
| | <i>A.allosaccharophila</i> | X | | X | 3 | 1 | 1 |
| | <i>A.caviae</i> | X | | X | 1 | | |
| 4 | <i>A.piscicola</i> | X | | X | | 1 | |
| 5 | <i>A.salmonicida</i> | X | | | 1 | | |

AMP: Ampicilina; TC:Cotrimoxazole; NA: Ácido nalidixico.

Se registraron diferentes patrones en cuanto a la presencia de genes de virulencia. Se pueden identificar las siguientes combinaciones con 2 genes (*gcat-aer/hem*, *gcat-lafA*), 3 genes (*gcat-aer/hem-lafA*, *gcat-ast-alt*, *gcat-aer/hem-ast*), 4 genes (*gcat-aer/hem-lafA-alt*) y 5 genes (*gcat-aer/hem-lafA-alt-ast*) (Tabla 11).

El 46% de los aislados presentó dos genes, el 35% tres genes, sólo el 1% presentaron cuatro y cinco genes, estas cepas fueron aisladas de agua y piel de la tilapia, respectivamente.

Tabla 11. Presencia de genes de virulencia en aislados de *Aeromonas* en tilapia, agua y sedimento.

| N° de genes | Especies | Genes de virulencia | | | | | Fuente de Aislados | | |
|-------------|----------------------------|---------------------|----------------|-------------|------------|------------|--------------------|------|-----------|
| | | <i>gcat</i> | <i>aer/hem</i> | <i>lafA</i> | <i>alt</i> | <i>ast</i> | tilapia | agua | sedimento |
| 1 | <i>A.veronii</i> | X | | | | | 6 | 2 | 1 |
| | <i>A.caviae</i> | X | | | | | | 1 | |
| | <i>A.jandaei</i> | X | | | | | 3 | 1 | |
| | <i>A.allosaccharophila</i> | X | | | | | 1 | | 2 |
| 2 | <i>A.veronii</i> | X | X | | | | 11 | 10 | 6 |
| | | X | | X | | | 2 | | 1 |
| | <i>A.caviae</i> | X | X | | | | 2 | | 1 |
| | <i>A.allosaccharophila</i> | X | X | | | | 1 | 1 | 2 |
| | | X | | X | | | | | 1 |
| | <i>A.jandaei</i> | X | | X | | | 1 | | |
| | | X | X | | | | 2 | 1 | 2 |
| | <i>A.media</i> | X | | X | | | 1 | | |
| | | X | X | | | | 1 | | |
| 3 | <i>A.veronii</i> | X | X | X | | | 17 | 3 | 3 |
| | <i>A.hydrophila</i> | X | | | X | X | 1 | | |
| | <i>A.caviae</i> | X | X | X | | | 1 | | |
| | <i>A.allosaccharophila</i> | X | X | X | | | 3 | 1 | 1 |
| | <i>A.jandaei</i> | X | X | X | | | 4 | | |
| | | X | X | | | X | 1 | | |
| 4 | <i>A.piscicola</i> | X | X | X | X | | | 1 | |
| 5 | <i>A.salmonicida</i> | X | X | X | X | X | 1 | | |

7.9 Árbol filogenético.

En la figura 27 se muestran las relaciones que guardan las especies identificadas en tejidos de tilapia y en muestras de agua y sedimento. La construcción del árbol se llevó a cabo por el método del vecino más cercano, permitiendo observar el grado de similitud entre los diferentes aislados, ya que los pertenecientes a una misma especie formaron 20 grupos aislados en función del nivel de semejanza entre los mismos. En el árbol se observa que los aislados pertenecientes a la especie *Aeromonas veronii*, se encuentran agrupados del cluster I al XIV con la formación de diferentes subgrupos. En el cluster XVII se agrupan los aislados identificados como *Aeromonas jandaei*, formando 8 subgrupos, siendo los aislados de Apatlaco los más relacionados con la cepa tipo *Aeromonas jandaei* ATCC 49568. En el cluster XX se agrupan los aislados identificados como *Aeromonas caviae*, los cuales provienen del canal de Apatlaco.

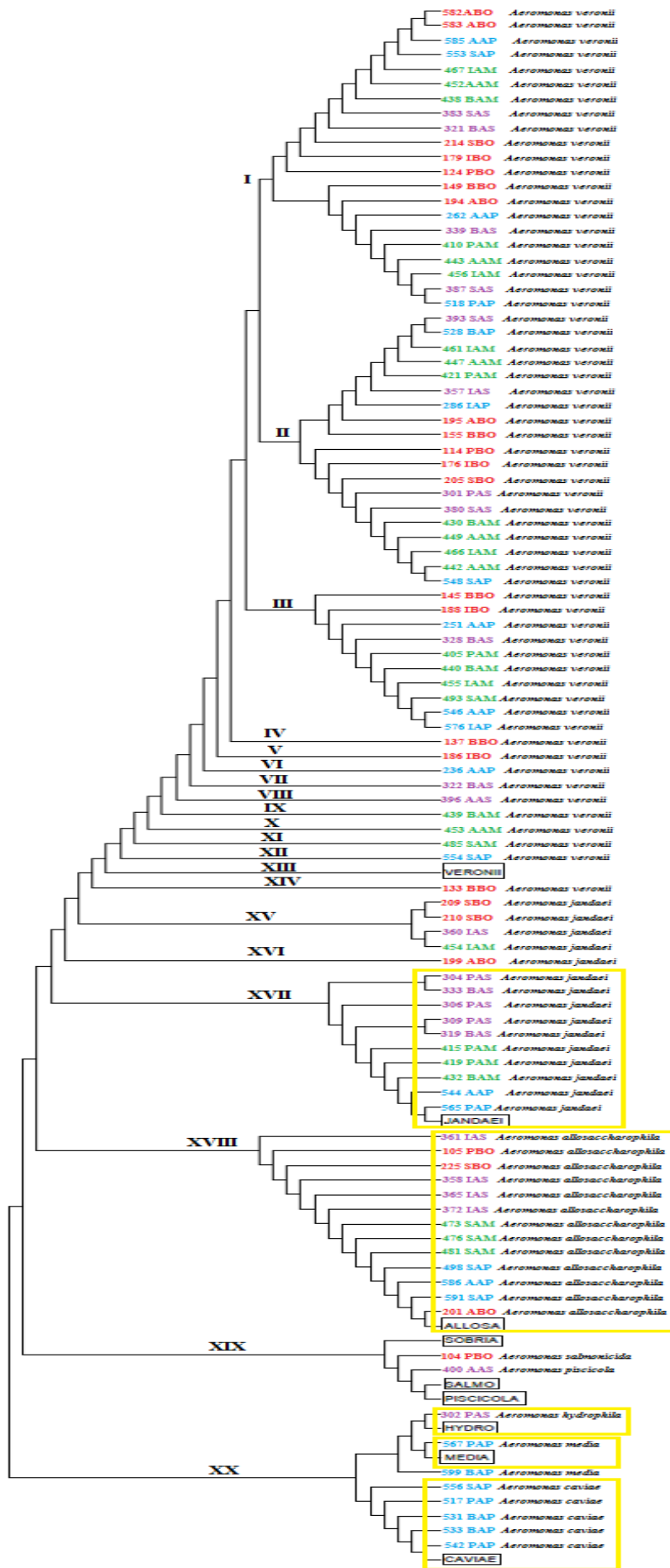


Figura 27. Árbol filogenético. Se muestra las relaciones de similitud entre los aislados de tejidos de tilapia y muestras de agua y sedimento.

8. DISCUSIÓN

La zona lacustre de Xochimilco se ha considerado como un humedal urbano, pues a pesar de la biodiversidad con la que cuenta y del hecho de que ha sido decretado Patrimonio de la humanidad por la UNESCO, es un sistema rodeado por zonas urbanas y agrícolas; la descarga de aguas residuales, agroquímicos, fertilizantes y demás contaminantes han contribuido sin duda a la degradación y eutrofización de dicho ecosistema (Kagalou *et al*, 2003). Los servicios ambientales que esta zona prestaba se han ido perdiendo debido a las presiones antropogénicas, por esto es de suma importancia identificar parámetros que nos indiquen situaciones de posible degradación.

Uno de los parámetros físicos más importantes a considerar es el oxígeno disuelto; en las zonas en las que se realizó el muestreo podemos observar que en La Asunción se registró el valor más bajo (1.66 mg/L). La concentración de oxígeno disuelto proporciona información acerca de las relaciones biológicas y bioquímicas a lo largo de la columna de agua. La distribución del oxígeno en cuerpos de agua naturales está determinado principalmente por el intercambio gaseoso a través de la superficie del agua, la producción fotosintética y por procesos de advección, tales como el movimiento horizontal del aire. De acuerdo con Xolalpa (2009), su disminución puede deberse al incremento en las tasas de descomposición y a la interferencia del intercambio gaseoso por la vegetación acuática; sin embargo, la Asunción es una zona rodeada totalmente por urbanización, lo que implica una descarga constante de aguas residuales y por tanto un incremento en la concentración de materia orgánica, lo que se traduce en una disminución del oxígeno disuelto. De acuerdo con Beltrán y colaboradores (2012) el oxígeno también es importante en la descomposición de materia orgánica, por lo tanto la baja concentración de oxígeno está impidiendo la descomposición de materia orgánica de origen doméstico. En el caso de Apampilco, la concentración de oxígeno fue de 5.30 mg/L, lo que favorece los procesos de oxidación-reducción y solubilidad de minerales. En los canales del Bordo y Apatlaco, los valores de oxígeno disuelto fueron similares, 3.02 mg/L y 3.29 mg/L respectivamente. Sin embargo, la concentración registrada en este estudio fue baja con respecto a la reportada por Imaz y colaboradores (2014), quienes registran valores mayores de 4 mg/L en promedio para estas zonas de Xochimilco. Xolalpa (2009) reporta valores de entre 2.5 y 5.5 mg/L para el canal del Bordo, señalando que la disminución en la concentración del mismo puede deberse al incremento en las tasas de descomposición. Los bajos valores en estos canales puede deberse también a la temporada en la que se realizó el muestreo, la cual corresponde a la temporada de secas, ya que al aumentar la temperatura hay una disminución en la concentración de oxígeno disuelto. Con lo anterior podríamos asegurar que la diferencia en el registro de los parámetros anteriores se debe a un aumento en la contaminación del ecosistema. En el Bordo y Apatlaco se registraron bajas concentraciones de oxígeno disuelto en comparación con la zona de Apampilco, sin embargo, en el caso de Apatlaco, es importante mencionar que al ser una zona rodeada por invernaderos, se favorece la presencia de materia orgánica de origen agrícola.

La concentración de oxígeno presente en un cuerpo de agua es afectada por la temperatura, la salinidad, la presión atmosférica y la penetración de luz principalmente; esto bajo condiciones normales. La concentración de oxígeno es inversamente proporcional con la temperatura, lo anterior nos indica que si hay un aumento en la temperatura del agua, podría haber una disminución en los niveles de oxígeno disuelto. En el caso de Xochimilco, en las zonas en las que se registró una mayor temperatura (Asunción y Apatlaco), también se registró una baja concentración de oxígeno disuelto; sin embargo, esta baja concentración se debe principalmente a la presencia de materia orgánica y no al aumento de temperatura. En cuanto a la salinidad, es un parámetro que afecta la concentración de oxígeno disuelto y el

pH, y a su vez se ve influenciada por la temperatura. El pH nos indica una medida del equilibrio ácido-base determinado por diversos compuestos disueltos, en este caso podemos observar que se registraron valores de entre 7-8 en las zonas muestreadas. Xolalpa (2009) registró valores de pH entre 7 y 9 para Xochimilco; de acuerdo con Reid y Wood (1976) es en este intervalo cuando se puede presentar un aumento en la concentración de bicarbonatos y alcalinidad total. El canal del Bordo presentó el valor más alto de pH (8.83) y Apatlaco el valor mínimo (7.48), estos valores podrían estar estrechamente relacionados con la temperatura, pues como ya se mencionó, ésta determina un aumento o disminución en la solubilidad de sales. Lo anterior también se ve reflejado en la conductividad, pues este parámetro nos indica la concentración de sales presentes en el agua; tal como podemos observar en los sitios de la Asunción y Apatlaco, al haber un aumento en la temperatura se observa un aumento en la conductividad.

Otro de los parámetros importantes es la turbidez, de acuerdo con Arcos y colaboradores (2004) en los canales de Xochimilco los valores de turbidez se comportan de manera uniforme en un intervalo de 30 cm a 50cm. En este estudio se registraron valores de entre 28 y 40 cm, siendo la Asunción la zona con una mayor turbidez, debido a que las concentraciones de sólidos disueltos son mayores por las descargas que recibe. La turbidez afecta la penetración de luz y por tanto se verá afectados los procesos de fotosíntesis.

Sin duda alguna el registro de los parámetros fisicoquímicos nos indica el estado del ecosistema, claramente se puede asegurar que Xochimilco es un sistema eutrófico y dicha eutrofización se ha debido principalmente a las actividades agrícolas y a los vertimientos domésticos. Las altas concentraciones de nutrientes, las fluctuaciones de oxígeno disuelto, pH, temperatura, la presencia de vegetación acuática y el aumento de materia orgánica son características que también permiten asegurar la eutrofización del cuerpo de agua. Con los datos anteriores sobre parámetros fisicoquímicos se puede asegurar que la zona del Bordo es la menos perturbada con respecto a las demás zonas y que la zona de la Asunción es la más perturbada.

El hecho de que sea un sistema con alta concentración de nutrientes ha permitido el desarrollo de una estructura trófica y la adecuación de diversos organismos alóctonos, como es el caso de la tilapia (*Oreochromis niloticus*), pues ésta ha sido capaz de adecuarse a las bajas concentraciones de oxígeno y al tipo de alimentación (omnívora). De acuerdo con Zambrano (2003), las densidades de estos organismos han superado los 0.093 org.m^{-2} , lo que indica su alto crecimiento poblacional. Con la finalidad de conocer el estado de condición o bienestar de los peces capturados, se estimó el índice de Fulton (K) y hepatosomático (IHP) de los mismos. El estudio de las relaciones longitud-peso y los índices de condición proporciona información indirecta sobre el crecimiento, madurez, reproducción, nutrición y por ende, del estado de salud de la población, bajo la influencia de factores externos (ambiente) e internos o fisiológicos (Arismendi *et al.* 2011). En este caso los valores del índice de Fulton oscilan entre 1.34 y 1.77; lo anterior indica que estas especies tienden a presentar una mayor ganancia en peso que en longitud. De acuerdo con Froese (2006) ésta relación entre peso y longitud es normal en peces; sin embargo, aquellos organismos de mayor peso a una determinada longitud, presentan una mejor condición. De acuerdo con Ricker (1975) mientras mayor es el valor de K mejor es la condición del grupo de peces. Por lo anterior, los peces provenientes del Bordo y Apatlaco al presentar valores mayores de este índice, registran una mejor condición en comparación con los provenientes de Apampilco y la Asunción, los cuales presentaron los valores de K más bajos. Es importante mencionar que se debe considerar factores como la alimentación y época reproductiva de los organismos. Por otro lado, el Índice Hepatosomático permite evaluar si se presentan modificaciones en las reservas energéticas a lo largo de la época reproductiva

(Introzzi y Duhalde, 1986). Rodríguez y colaboradores (2006) indican que los valores mayores de IHP muestran una mejor condición nutricional de los peces. Rojo (2009) ha reportado valores de condición de Fulton cercanos a 1 en tilapia roja (*Oreochromis sp.*) y valores de IHP de entre 1.5 a 1.8; sin embargo, estos organismos se desarrollaban bajo condiciones controladas de temperatura, oxígeno disuelto, amonio, etc. En el caso de los organismos capturados en Xochimilco los factores ambientales antes mencionados pueden estar impactando la condición de los peces.

Los índices hepatosomáticos reportados en este caso van de 1.22 a 2.60 donde los peces capturados en la Asunción y Bordo son los que presentan los valores máximos de este índice, por lo tanto tienen una mejor condición nutricional. La tilapia al ser un organismo omnívoro ha logrado establecerse en canales con altas y bajas concentraciones de materia orgánica. Arcos (2004) ha reportado porcentajes parecidos de materia orgánica en el Bordo y la Asunción, 35.42% y 31.62% respectivamente; a pesar de presentar porcentajes similares, el origen de la materia orgánica es diferente, pues en el Bordo predomina la de origen vegetal y en la Asunción de origen doméstico. Sin embargo, este es un factor que ha permitido la adecuación de la tilapia en dichos canales, permitiendo que éstas muestren un mejor estado nutricional en comparación con los organismos provenientes de Apampilco y Apatlaco.

Respecto a las concentraciones de bacterias mesofílicas asociadas a la tilapia (piel, branquias y contenido estomacal), agua y sedimento, las concentraciones fueron mayores en sedimento siendo en Apampilco donde se registró el valor máximo de 4 050 000 UFC/g PH de sedimento. En el caso de las muestras de agua, las máximas concentraciones corresponden a Apatlaco. Las muestras de piel, branquias y contenido estomacal provenientes de peces capturados en la Asunción presentaron las máximas concentraciones de bacterias mesofílicas. Para el caso del Bordo, aquí se presentaron las concentraciones más bajas para todas las muestras, excepto para las de contenido estomacal, donde el valor mínimo se registró en muestras provenientes de Apampilco. García (2013) reportó concentraciones de bacterias mesofílicas en el agua de los canales de Xochimilco, de entre 495 000 y 42 250 000 UFC/100mL. En el presente estudio se registraron concentraciones menores, las cuales fueron de 1600 a 205 000 UFC/100mL. Los datos anteriores nos brindan información acerca de las concentraciones de bacterias viables por mL de agua, por g PH de sedimento y contenido estomacal y por cm² en piel y branquias en tilapias. La presencia de un número elevado de bacterias mesofílicas puede deberse a factores ambientales, como la temperatura. Es importante mencionar que si bien estas concentraciones proporcionan información acerca del número de bacterias viables, no significa que todas sean patógenas, sino que la mayoría son saprofitas. Dentro de este grupo de bacterias mesofílicas están incluidas las especies del género *Aeromonas*; sin embargo, el porcentaje de *Aeromonas* presuntivas, obtenidas en el presente trabajo, con respecto a las bacterias mesofílicas fue muy bajo (0.082%).

En relación a las concentraciones de bacterias coliformes totales y fecales, estas fueron mayores en la Asunción, mientras que los valores mínimos correspondieron a la zona del Bordo. La presencia de estas bacterias está relacionada con contaminación de origen fecal, debido a que si bien algunas bacterias coliformes se pueden distribuir ampliamente en la naturaleza, las coliformes fecales son bacterias que provienen de la microbiota intestinal de animales de sangre caliente (Megchún, 2013) Las coliformes fecales difieren de las totales en su capacidad de soportar temperaturas altas (45°C) (Harwood *et al.*, 2005). Sin embargo, el análisis estadístico realizado nos indica que hay una estrecha asociación entre ambos grupos, si bien es importante considerar que la presencia de coliformes totales en una muestra no puede asegurar la presencia también de coliformes fecales en la misma. Soto y

Esquivel (2003) reportan para Xochimilco altas concentraciones de coliformes totales y fecales, señalando que las concentraciones de ambas se encuentran por arriba del 50% de lo especificado por la NOM-003-ECOL-1997. Esta Norma Oficial Mexicana establece que los límites máximos permisibles de coliformes totales son de 1000 número más probable (NMP)/ 100 mL. En el presente estudio, el valor máximo que se registró fue de 11000 NMP/100 mL, por lo que los valores se encuentran por arriba de lo establecido en la Norma. La presencia de estos grupos de bacterias es mayor en la zona de la Asunción debido al alto impacto urbano que sufre la zona, ya que se encuentra totalmente rodeada por descargas domésticas. En el caso de Apatlaco, se registraron valores de entre 430 y 11000 NMP/100mL de coliformes fecales; lo anterior se puede deber a que es una zona rodeada por invernaderos, lo que implica la práctica de fertilización con estiércol. En cuanto a la zona de Apampilco y el Bordo, al presentar un medio y bajo impacto agrícola y urbano la concentración de coliformes totales y fecales es menor en comparación con las zonas antes mencionadas.

Las concentraciones registradas en agua fueron mayores en comparación con el sedimento. No obstante a que se ha reportado que puede existir un número mayor de coliformes totales en sedimento que en agua, debido a las acciones de remoción del sedimento se pueden resuspender e incrementar su concentración en agua (Fernández y Barrera, 2013); tal pudiera ser el caso de los canales de Xochimilco, ya que el empleo de trajineras implica una remoción del sedimento al utilizar pértigas para lograr el movimiento de las mismas. Esta constante resuspensión del sedimento favorece el incremento de coliformes en agua.

Dentro del grupo de bacterias coliformes se incluyen géneros como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. En este estudio sólo se consideraron las concentraciones de coliformes fecales; sin embargo, no se identificaron las especies pertenecientes a alguno de los géneros antes mencionados.

En cuanto a los aislados de probables *Aeromonas*, se obtuvieron un total de 501 aislados, de los cuales, a través de la realización de diversas pruebas bioquímicas, solo 223 se consideraron como probables *Aeromonas*, El 31 % de éstos fueron aislados de muestras provenientes del Bordo, el 11% de Apampilco, el 26% y el 32% de la Asunción y Apatlaco respectivamente; a su vez 39 de las 223 *Aeromonas* presuntivas fueron aisladas de Agua, 45 de sedimento, 43 de piel, 50 de branquias y 66 de contenido estomacal, por lo que la mayor parte de los aislados provienen de las tilapias capturadas.

Las *Aeromonas* forman parte de la microbiota del intestino de peces, anfibios y reptiles, por lo que no se encuentran formando parte de la microbiota de animales homeotermos; sin embargo, pueden llegar a aislarse de los mismos debido a infecciones causadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con esta bacteria. De acuerdo con García (2013) no existe ninguna relación entre las concentraciones de coliformes fecales y las de este género. Contrario a esto Peittibone (1998) al realizar una investigación sobre la presencia de *Aeromonas* en el río Búfalo en Nueva York, reportó que existe una estrecha correlación entre *Aeromonas* sp y coliformes fecales. Otros autores como González y colaboradores (1996) describen que existe una correlación estadísticamente significativa e inversamente proporcional entre coliformes fecales y *Aeromonas* sp. En este estudio el análisis estadístico mostró que la asociación entre coliformes fecales y *Aeromonas* no es significativa, es decir no hay correlación entre las variables. Arcos y colaboradores (2005) consideran que las *Aeromonas* son microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza, sobre todo en agua, y por lo tanto pueden estar presentes en altas concentraciones en presencia o ausencia de contaminación fecal. De igual manera, Holmes (1996) considera que diferentes especies de *Aeromonas* pueden ser aisladas en diversos

cuerpos de agua con distintos estados tróficos y varios grados de contaminación fecal. En el presente estudio, las concentraciones de coliformes fecales y de *Aeromonas* en las cuatro zonas de muestreo indican que no hay una relación entre la presencia de contaminación fecal y la presencia de *Aeromonas*, por lo que la ausencia o baja concentración de coliformes fecales no determina el que se aislen más o menos *Aeromonas*.

Con respecto a la identificación de las especies, solo 100 de los aislados de *Aeromonas* presuntivas fueron secuenciados. Se identificaron 8 especies: *A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. allosaccharophila*, y *A. piscicola*.

El 62% de los aislados fueron identificados como *Aeromonas veronii*. Existen diversas especies de *Aeromonas* que sólo se han logrado aislar de muestras clínicas, *Aeromonas veronii* ha sido aislada principalmente de muestras clínicas (Castro, 2003). No obstante se ha aislado también de piel de ajolote comprobando que forma parte de la microbiota normal de este anfibio (García 2013). Así mismo se ha estudiado la relación existente entre esta especie y las sanguijuelas, ya que contribuye a la degradación de la sangre que succionan las mismas (Kikuchi *et al.*, 2009). En el presente estudio, el 36% de estos aislados fueron recuperados de tilapia aunque las *Aeromonas* no pueden ser consideradas como microbiota normal en estos organismos. De acuerdo con Gatesoupe (2000) la microbiota es generalmente considerada como transitoria en organismos acuáticos, debido a que puede variar con los cambios en temperatura, salinidad y otros parámetros fisicoquímicos; por lo tanto si bien las bacterias pueden encontrar en la piel, branquias e intestino un medio apto para su desarrollo no significa que éstas sean parte de la microbiota natural de los mismos. Sin embargo es importante considerar que la presencia de algunos genes de virulencia si les podrían otorgar la capacidad de colonizar, penetrar, establecerse y multiplicarse y por lo tanto provocar daños o lesiones en los tejidos del huésped.

Una de las especies menos frecuentemente aislada fue *Aeromonas hydrophila*, esta es una de las especies que más se ha estudiado debido a su implicación en infecciones gastrointestinales en seres humanos aunque también ha sido reportada en charal (*Chirostoma humboldtianum*), tilapia roja (*Piaractus brachypomusoreochromis spp*), trucha, pez gato, bacalao, salmón y salamandra, provocando septicemias hemorrágicas y úlceras (Reith *et al.*, 2008). En el caso de la especie *Aeromonas allosaccharophila* es una especie recientemente identificada; en un inicio solo había sido aislada de muestras de anguilas, pero actualmente se ha aislado de casos clínicos de gastroenteritis (Saavedra *et al.*, 2007). Una de las especies más importante es *A. salmonicida*, debido a que se ha reportado la presencia de varios genes de virulencia, además de la posibilidad de transferir genes hacia otras bacterias (Aujoulat, *et al.*, 2012)

En cuanto a la presencia de genes, el 83% de los aislados presentó más de un gen de virulencia. Todos los aislados presentaron el gen *gcat* (glicerofosfolípido colesterol acil transferasa), el cual de acuerdo con Chacón y colaboradores (2002) es exclusivo del género *Aeromonas*; esta lipasa está asociada a infecciones en peces favoreciendo la invasión de la bacteria en el hospedero. La presencia de lipasas, está relacionada también con la nutrición de la bacteria y actúan como factores de virulencia por su interacción con los leucocitos humanos o bien afectando diversas funciones del sistema inmune mediante los ácidos grasos libres que se generan a través de la actividad lipolítica que poseen (Kirov, 1997). El segundo gen más abundante fue el gen *aer/hem* (aerolisina/hemolisina), que es una toxina formadora de poro asociada a diarreas y a infecciones internas en humanos (Fivaz *et al.*, 2002); estas enterotoxinas citotóxicas se han secuenciado a partir de cepas de *Aeromonas*, que incluyen *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. sobria*. Además las *Aeromonas* producen otro tipo

de hemolisinas que provocan la formación de agujeros en las membranas celulares provocando lisis osmótica y destrucción de los eritrocitos. (Namdari y Bottone, 1991).

Heuzenroeder y colaboradores (1999) consideran que la presencia del gen aerolisina es un fuerte indicador de virulencia, debido a que, al igual que las lipasas e hidrolipasas, alteran la estructura de la membrana citoplasmática del huésped, siendo por tanto factores importantes para que la bacteria logre colonizar los tejidos del huésped. La presencia del gen *aer* ha sido reportado principalmente en cepas pertenecientes a *A. hydrophila* (Kareem, 2012). Sin embargo, en el presente estudio el 79% de las cepas identificadas como *A. veronii* presentaron este gen de virulencia y el 44% de éstas fueron aisladas de la tilapia; lo anterior aporta indicios de que estas cepas pueden representar un peligro para los organismos acuáticos que se desarrollan en los canales de Xochimilco. Sólo el 27% de los aislados indicaron la presencia del gen *lafA* (Flagelo lateral). La presencia de flagelo está relacionada con diferentes aspectos de patogenicidad, principalmente adhesión e invasión de células eucariotas donde el proceso de adhesión es vital como paso previo a la colonización e invasión en peces y humanos (Gavin, 2003). En este estudio, las especies que presentaron este gen corresponden a *A. veronii* y *A. hydrophila*. De acuerdo con Gavin (2002) la presencia de este gen en *Aeromonas* juega un papel indispensable en la adherencia y formación de biopelícula, sin embargo a pesar de que este gen es distinto del flagelo polar, la síntesis del flagelo lateral depende de la presencia de un flagelo polar. En cuanto a los genes *ast* (proteasa) y *alt* (enterotoxina citotónica) sólo lo presentaron el 3% de los aislados, en las especies de *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. piscícola* y *A. salmonicida*. En cepas aisladas de pacientes con diarrea (Albert et al, 2000) se encontró que estos genes actúan sinérgicamente para inducir diarreas severas. En este estudio solo los aislados de *A. hydrophila* y *A. salmonicida* presentan ambos genes, lo que aumenta su potencial patógeno.

Diversos estudios en humanos (Sha et al, 2002; Albert et al 2000) y peces (Nawaz et al, 2010; Silva et al, 2005) indican que existe una correlación positiva entre un mayor número de genes de virulencia y un mayor potencial para la determinación de enfermedades en el huésped. En relación a la presencia de genes de virulencia, se registraron las siguientes combinaciones: con 2 genes (*gcat-aer/hem*, *gcat-lafA*), 3 genes (*gcat-aer/hem-lafA*, *gcat-ast-alt*, *gcat-aer/hem-ast*), 4 genes (*gcat-aer/hem-lafA-alt*) y 5 genes (*gcat-aer/hem-lafA-alt-ast*). El 47% de los aislados presentó dos genes, el 37% tres genes, sólo el 1% presentaron cuatro y cinco genes. *A. veronii*, que fue la especie más frecuentemente aislada, presentó de 1 a 3 genes de virulencia, los cuales incluyen *gcat*, *aer/hem* y *lafA*, *A. piscícola* presentó 4 genes de virulencia y *Aeromonas salmonicida* 5 genes; ambas especies fueron aisladas en tilapia. Los datos anteriores son de suma importancia, debido a que ya se ha reportado que *A. salmonicida* puede llegar a presentar distintos factores de virulencia, lo que ha permitido atribuir el potencial patógeno de estas especies (Castro et al. 2003). García (2013) reportó también la presencia de *A. salmonicida* con 3, 4 y 5 genes de virulencia, aislados en piel de ajolote provenientes de los canales de Xochimilco. Con lo anterior se puede asegurar que esta especie puede ser considerada con potencial patógeno y por tanto representar un riesgo, debido a que la presencia de genes de virulencia le permitiría infectar con mayor facilidad a peces y otros organismos acuáticos presentes en los canales de la zona lacustre de Xochimilco. Es importante mencionar que la mayoría de los autores que realizó trabajos de investigación sobre la presencia de *Aeromonas* en peces y otros animales de sangre fría, reportan daño epitelial, así como presencia de úlceras y otros daños en diferentes órganos internos de los organismos en los que se realizó el estudio (Oliveira et al 2012; Wang et al, 2012) En el presente estudio, ninguna de las 12 tilapias que fueron capturadas presentó signos de daño epitelial y al realizar la disección del organismo tampoco se observó daño en los órganos de los mismos debido quizá al tamaño de muestra.

Si bien estos organismos no presentan signos de enfermedades causadas por la presencia de *Aeromonas*, si están actuando como reservorio de cepas que como ya se mencionó anteriormente, deben ser consideradas como potencialmente patógenas.

Además, otro aspecto importante a considerar es que diferentes especies de *Aeromonas* se han reportado con resistencia a antibióticos betaláctamicos, Castro y colaboradores (2002) reportaron la resistencia de dichas cepas a ampicilina y cefalotina; Imzilin (2001) reportó también la resistencia a amoxicilina, novobiocina, sulfametoxazol, ácido nalidíxico e imipenem. En este estudio los aislados a los que se les realizó la prueba de susceptibilidad resultaron resistentes a ampicilina, cotrimoxazole y ácido nalidíxico lo cual es de suma importancia debido a que algunas especies de *Aeromonas* no sólo han surgido como un importante problema de salud pública, sino que también han presentado resistencia a una amplia gama de antibióticos. De acuerdo con Bécares (2009) las bacterias resistentes a antibióticos se distribuyen a través de las aguas residuales, llegando a los medios acuáticos, naturales o recreativos; sin embargo la causa de la resistencia a antibióticos es natural, pues las bacterias han desarrollado mecanismos para inactivar las sustancias antibióticas, pero esta estrategia está potenciada por la actividad humana con el uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades humanas y animales. En el caso de Xochimilco se sabe que hay presencia de antibióticos (Otto, 1998) y de poblaciones de bacterias resistentes, lo cual puede estar generando intercambio genético entre poblaciones resistentes y sensibles.

En el caso de las *Aeromonas*, al producir metalobetalactamas y betalactamasas que hidrolizan cefalosporinas y carbenicilina, tienen la capacidad de presentar resistencia a antibióticos como penicilina, ampicilina y cefalotina, como en este estudio, en el que el 100% de los aislados presentaron resistencia a ampicilina. El 18% de los aislados presentaron resistencia a cotrimoxazole, el cual es un antibiótico empleado para tratar infecciones bacterianas, como neumonía, bronquitis e infecciones gastrointestinales; esto último es importante si consideramos que las *Aeromonas* causan este tipo de infecciones. Así mismo, el 18% también presentó resistencia a ácido nalidíxico, quinolona que presenta un espectro antibacteriano dirigido principalmente contra bacterias Gram-negativas, por lo que bien podría ser empleado para combatir infecciones causadas por este género. En este estudio se registró que sólo el 4% de los aislados presentó multiresistencia, es decir presentaron resistencia a ampicilina, ácido nalidíxico y cotrimoxazole; a pesar de que la resistencia presentada a ampicilina es natural, la resistencia a otros antibióticos no lo es y debe estar generada por el uso excesivo de antibióticos en la población.

En el árbol filogenético se muestran las relaciones que guardan las especies identificadas en tilapia, agua y sedimento. La construcción del árbol se llevó a cabo por el método del vecino más cercano, permitiendo observar el grado de similitud entre los diferentes aislados; por lo tanto aquellos pertenecientes a una misma especie formaron grupos aislados en función del nivel de semejanza entre los mismos.

El empleo de este método permitió calcular la distancia total entre todas las secuencias, basándose en una matriz de distancias; al comparar las secuencias de los aislados se obtiene una medida resultante en base a la frecuencia y orden de los pares de bases en las mismas, lo cual permite entonces la construcción del árbol. En este caso se pudo observar que debido a que en la matriz de datos se incluyeron secuencias de cepas tipo de cada una de las especies que se identificaron, las secuencias con un mayor grado de similitud se agruparon con las mismas. Se formaron 20 clusters, los cuales parecen estar agrupados en función a las diferentes especies identificadas. En el fenograma resalta la formación de 4 grupos principalmente. En el cluster 20 se observan 4 subgrupos, uno de los anteriores está formado por los 5 aislados identificadas como *Aeromonas caviae*, los cuales provienen de

muestras de tilapias, agua y sedimento de Apatlaco; a pesar de que las *Aeromonas caviae* provienen sólo del canal anterior, no se puede asegurar que sólo estén presentes en este, pero si fueron abundantes en el mismo, ya que no se aislaron en otro canal. En otro subgrupo se encuentra agrupada la cepa tipo *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 y *Aeromonas hydrophila*, las cuales están muy relacionadas con los aislados identificados como *Aeromonas caviae* y *Aeromonas media*. En el cluster 18 se agrupan los aislados identificados como *Aeromonas allosaccharophila*, los cuales provienen de los 4 sitios de muestreo; en uno de los clusters se agruparon las *Aeromonas jandaei*, provenientes en su mayoría de muestras de tilapia de la zona de la Asunción.

Uno de los principales problemas en la identificación de las diferentes especies de *Aeromonas*, es el grado de similitud que presentan las secuencias del 16S ribosomal. Con la realización de este árbol se pudo observar que las secuencias guardan hasta un 99% de similitud; por lo tanto, el agrupamiento obedeció principalmente a esta característica más que a la zona en la que se tomó la muestra. Los canales se encuentran conectados, por lo tanto es probable que las mismas especies que se aíslan en un canal se encuentren en otros donde si bien puede tratarse de la misma especie, son cepas con características genéticas diferentes.

9. CONCLUSIONES

- La Asunción fue la zona de mayor perturbación, con niveles bajos de oxígeno y pH, así como niveles altos de temperatura y conductividad debido en parte a la acumulación de materia orgánica por la influencia urbana. Con base en los parámetros físicoquímicos se puede considerar que el Bordo es una de las zonas menos impactada en comparación con las otras zonas en las que se realizó el muestreo.
- Las concentraciones de coliformes totales y fecales en las cuatro zonas de muestreo sobrepasan los límites permisibles en agua para el desarrollo de organismos acuáticos y de uso recreativo, confirmando así la presencia de contaminación de origen fecal.
- Se logró aislar y caracterizar fenotípica y genotípicamente ocho especies de *Aeromonas*: *A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. allosaccharophila*, y *A. piscícola*, presentes en tilapias, agua y sedimento.
- La especie dominante fue *Aeromonas veronii*, misma que presentó al menos tres genes de virulencia (*gcat*, *aer/hem*, *laf A*). También se logró aislar e identificar a *A. salmonicida*, la cual presentó 5 genes de virulencia (*gcat*, *aer/hem*, *laf A*, *ast*, *alt*). Ambas especies son de suma importancia, debido a que se han considerado como patógenas no sólo de peces sino también de humanos.
- Todos los aislados fueron resistentes a ampicilina y el 15% resistentes al menos a tres antibióticos (ampicilina, cotrimoxazole y ácido nalidíxico), esto indica que en los sitios de muestreo existen fuentes de contaminantes donde los antibióticos están presentes, principalmente los de uso extensivo, representando un riesgo para la adquisición de multiresistencia por conjugación.
- La tilapia puede actuar como reservorio de cepas potencialmente patógenas, debido a que el 59% de los aislados provienen de los peces y presentaron al menos dos genes de virulencia. Por lo anterior estos organismos representan un riesgo para la población local que los manipula y consume. De igual manera el agua y sedimento están actuando como reservorio de diferentes especies.

10. BIBLIOGRAFÍA

- **Abbott, S. L., W. Cheung, S. Kroske-Bystrom, T. Malekzadeh, J. M. Janda.** 1992. Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 30:1262–1266.
- **Aguilera, M., C. Hernández, G. Zúñiga, M. Figueras, G. Castro.** 2005. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiol Lett.* 242: 231 – 240.
- **Aguilera, M., C. Hernández, G. Zúñiga, M. Figueras, R. Garduño, G. Castro.** 2007. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolated from Mexico and Spain: a comparative study. *Can J. Microbiol.* 53: 877 – 887.
- **Aguilera, M., A. Carmona, G. Castro.** 2011. An in-house multiplex PCR method to detect of putative virulence factors in *Aeromonas* species. *Brazilian J. Microbiol.* 42: 1314 – 1320.
- **Albert, M. J., M. Ansaruzzaman, K. A. Talukder, A. K. Chopra., I. Kuhn , M. Rahman, A. S. Faruque, R. B. Sack, R. Mollby .** 2000. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas spp.* isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J. Clin. Microbiol.* 38:3785-3790.
- **Al- Harbi, A. Uddin.** 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* 250: 566-572.
- **Ali, A., M. Carnahan, M. Altwegg, J. Lüthy-Hottenstein, W. Joseph.** 1996. *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (Formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non human sources. *Med. Microbiol. Lett.* 5:156–165.
- **Altwegg, M., R. Altwegg-Bissig, A. Demarta, R. Peduzzi, M. W. Reeves, B. Swaminathan.** 1988. Comparison of four typing methods for *Aeromonas species*. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 6:88–94.
- **Altwegg, M., W. Reeves, R. Altwegg-Bissig, J. Brenner.** 1991. Multilocus enzyme analysis of the genus *Aeromonas* and its use for species identification. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt.*
- **Altwegg, M., J. Martinetti, M. Lüthy, Rohrbach.** 1991. *Aeromonas* associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 44-45.
- **Altwegg, M.** 1999. *Aeromonas* and *Plesiomonas*, in: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM press.507-538.

- **Arcos, R., J. González, L. Ramos, F. Rosas.** 2004. Evaluación del componente orgánico como un factor indicativo del estado trófico del lago de Xochimilco. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
- **Arismendi, I., B. Penaluna, D. Soto.** 2011. Body condition indices as a rapid assessment of the abundance of introduced salmonids in oligotrophic lakes of southern Chile. *Lake and Reservoir Management*, 27: 61–69.
- **Aujoulat, F., F. Roger, A. Bourdier, A. Lotthé, B. Lamy, H. Marchandin, E. Jumas-Bilak.** 2012. From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. *Genes*. 3: 191 – 232.
- **Bécares, E.** 1995. Biología de una planta depuradora de fangos activados de doble etapa tratando aguas residuales de la industria farmacéutica. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- **Bécares, E., J. Villacorta, M. Hinojosa, R. Cardona.** 2009. Bacterias resistentes a antibióticos en medios acuáticos. Fundación MAPFRE, Convocatoria ayuda a la Investigación.
- **Beltrán, R., L. Ramírez, J. Sánchez-Palacios.** 2012. Comportamiento de la temperatura y oxígeno disuelto en la presa Picachos. Sinaloa, México. *Hidrobiológica*. 22:94-98.
- **Borrell, N., M. Figueras, J. Guarro.** 1998. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol*. 44:7-12.
- **Bravo, L., E. Cabrera, M. Ramírez, A. Hernández, J. Verdecía, G. Borrego, Fernández.** 2007. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Aeromonas spp.* aisladas de pacientes con bacteriemia. *Revista Biomed; Ciudad de la Habana, Cuba*. 18: 176-181.
- **Cahill, M.** 1990. Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology* 19: 21-41.
- **Carabias, J.** 2005. Agua, medio ambiente y sociedad hacia la gestión integral de los recursos hídricos en México. Universidad Nacional Autónoma de México, Fundación Gonzalo Río Arronte. México, D.F. 221 pp.
- **Castro, G.** 2002. Aplicación de técnicas moleculares en cepas de *Aeromonas* aisladas de México. Tesis de grado: Doctorado; IPN, ENCB. México D.F.
- **Castro, G., M. J. Figueras, G. Aguilera, L. Soler, E. Fernández, G. Aparicio, J. Guarro, M. R. Chacón.** 2003. Characterization of *Aeromonas spp.* isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int. J. Food Microbiol*. 84: 41 – 9.
- **Chacón, M. R., G. Castro, L. Soler, J. Guarro, M. J. Figueras.** 2002. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagnostic Microbiol Infec Dis*. 44: 221 – 225.

- **Collins, A.L. y T.A. Anderson.** 1995. The regulation of endogenous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *J. Fish Biol.* 47:1004-1015.
- **CONACYT-CONAGUA.** 2012. Segundo informe de validación en campo. Zona lacustre ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco. Fondo Sectorial de Investigación y desarrollo sobre el agua. Proyecto 8469. México, D.F. 29 pp.
- **De la Ossa, J. y L. Botero.** 2003. Guía para la cría, manejo y aprovechamiento sostenible de algunas especies animales promisorias y otras domésticas. Convenio Andrés Bello, Bogotá, Colombia. 50 pp.
- **Díaz, R.** 2003. Calidad del agua en el proceso de eutrofización en el lago de Xochimilco considerando parámetros físicos y químicos. Servicio social. Biología. F.E.S. Zaragoza. UNAM. México.
- **Fernández, L. y G. Barrera.** 2013. Comparación de técnicas para la extracción de bacterias coliformes del sedimento del lago de Xochimilco, México. *Rev. Argent. microbiol.* 45: 180-184.
- **Fivaz, M., F. Vilbois, S. Thurnheer, C. Pasquali, L. Abrami, P. Bickel, R. Parton, F. Van Der Goot.** 2002. Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *EMBO J.* 21: 3989–4000.
- **Froese, R.** 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 241-253.
- **Fuentes, M., J. Valladaes, G. Grass, J. Pico.** 2011. Microbiota de interés para la salud pública de *Oreochromis spp.* (Tilapia roja) cultivada en jaulas flotantes en agua dulce. *Revista Cubana de investigaciones Pesqueras.* 28: 74-80.
- **Furmanek, B.** 2013. Phenotypic and molecular characteristics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from the River Nile. *Microbiological Research.* 169: 547–552.
- **Gaceta Oficial del Distrito Federal,** No. 5. Impresa por Corporación mexicana de impresión; Enero 11, 2006.
- **García, P.** 2013. Detección de factores putativos de virulencia en especies de *Aeromonas* aisladas del agua y de la piel del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) en la zona lacustre de Xochimilco, México. Tesis de grado: Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología. México, D.F. 100 pp.
- **Gatesoupe, F. J.** 2000. Uso de probióticos en acuicultura. 463-472 pp. En: Civera-Cerecedo, R., C. J, Pérez-Estrada, D. Ricque y L.E. Cruz. 1998. Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposiumn Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B.C.S., México.

- **Gavín, R., A. A. Rabaan, S. Merino, J. M. Tomás, I. Gryllos, J. G. Shaw. 2002.** Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 43: 383-397.
- **Gavín, R. 2003.** Caracterización genética y fenotípica del flagelo de *Aeromonas*. Tesis de Grado. Doctorado en Biología. Departamento de Microbiología. Universidad de Barcelona. España. 188 pp.
- **González, M., T. Torres, T. Nolasco. 1996.** Bacterias enteropatógenas e indicadores de contaminación en aguas recreativas para campismo. En: Serie Salud Ambiental, Cuba: ECIMED. 4: 127-35.
- **Harwood, J., T. Levine, V. Scott, J. Chivukula, S. Lukasik, R. Farrah, J. B. Rose. 2005.** Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3163-3170.
- **Henry, G. y G. Heinke. 1999.** Ingeniería Ambiental. Prentice Hall, México.
- **Heuzenroeder, M. W., C. Y. Wong, R. L. Flower .1999.** Distribution of two haemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: Correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiol Lett.* 174:131–136.
- **Holmes, P., L. Nicolls, D. Sartory 1996.** The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. En: Austin B, M . Altwegg, PJ. Gosling, S. Joseph. The Genus *Aeromonas*. United Kingdom.
- **Imaz, M., L. Zambrano., J. Cruz., A., Martínez y L.Gutiérrez. 2014.** Análisis del estado de conservación ecológica del sistema lacustre chinampero de la superficie reconocida por la UNESCO como Sitio Patrimonio de la Humanidad en Xochimilco, Tláhuac y Milpa Alta. Informe Final. Universidad Nacional de México. México, D.F. 97 pp.
- **Imzilin, B. 2001.** Occurrence and Antibiotic resistance of mesophilic *Aeromonas* in three riverine freshwater of Marrakech, Morocco. Laboratory of Microbiology, Department of Biology. The Scientific World.
- **INEGI. 1998.** Xochimilco Distrito Federal. Cuaderno Estadístico Delegacional. México.
- **Introzzi, A. y G. Duhalde. 1986.** Estudio de las concentraciones de los ácidos nucleicos (RNA, DNA) en músculo blanco e hígado de la lisa (*Mugil brasiliensis*) a lo largo de sus periodos de reposo y maduración gonadal. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero.* .6:117-129.
- **Janda, J. 2001.** *Aeromonas* and *Plesiomonas*, in: Sussman M, ed. *Molecular Medical Microbiology*. San Diego: Academic Press.
- **Jiménez, A., C. Iregui, J. Figueroa. 2008.** Caracterización y evaluación *in vivo* e *in vitro* del lipopolisacárido de *Aeromonas hydrophila*. *Acta biol. Colomb. Bogotá, Colombia.* 13: 147-162.

- **Kagalou, I.** 2003, Evaluation of the trophic state of lake Pamvotis Greece, a shallow urban lake, en *Hydrobiologia* 506-509: 745-752 pp.
- **Kareem, A.** 2012. Detected of aero gene in *Aeromonas hydrophila* isolates from shrimp samples in local markets. *Journal of Microbiology, Biotechnology and food sciences.* 2: 634-639.
- **Kikuchi, Y., L. Bomar, J. Graf.** 2009. Stratified bacterial community in the bladder of the medicinal leech, *Hirudo verbana*. *Environ Microbiol.* 11: 2758–2770.
- **Kirov, S.** 1997. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Doyle, Benchat, Motville. ASM Press.
- **Kirov, S.** 1993. Adhesion and piliation of *Aeromonas* spp., *Med. Microbiol. Lett.* 2: 274-280.
- **Kirov, S., B. Tassel, L. Semmler, A. O'Donovan, J. G. Rabaan.** 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J. Bacteriol.* 184: 547-555.
- **Kirov, S., M. Castrisios, J. G. Shaw.** 2004. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect. Immun.* 72: 1939–1945.
- **Kümmerer, K.** 2004. Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother* 54:311-320.
- **Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., Duncan, K. y Harris, R. N.** 2007. Common cutaneous bacteria from the eastern red-backed salamander can Inhibit pathogenic fungi. *Copeia.* 3: 630 – 640.
- **Lauer, A., Simon, M. A., Banning, J. L., Lam, B. A. y Harris, R. N.** 2008. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *The ISME Journal.* 2: 145–157.
- **Lot, A. y A. Novelo,** 2004. Iconografía y estudio de plantas acuáticas de la ciudad de México y sus alrededores. Instituto de Biología, UNAM.
- **Macfaddin, J.** 2000. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. 345 pp.
- **Martínez, J. L.** 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. R. Soc. B* 276:2521-2530.
- **Megchún, J.** 2013. Contaminación del agua subterránea y superficial por coliformes en el agroecosistema con caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*) del módulo de riego I-1 La Antigua, Ver. México. Tesis de grado: Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados, Campus Veracruz. Tepetates, Veracruz. 82 pp.
- **Namdari, H. y E. J. Bottone.** 1991. *Aeromonas caviae*: ecologic adaptation in the intestinal tract of infants coupled to adherence and enterotoxin production as factors in enteropathogenicity. *Experientia.* 47: 432-436.

- **Nawaz, M., S. A. Khan, K. Sung, Q. Tran, K. Kerdahi, R. Steele .2010.** Detection and characterization of virulence and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. Food Microbiol. 27:327-331.
- **NOM-003-SEMARNAT-1997.** Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en bienes y aguas nacionales, Diario oficial de Nación.
- **Notederdaeme, L, S. Bigawa, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner, F. Ollevier.** 1996. Numerical taxonomy and biochemical identification of fish associated motile *Aeromonas* spp. Syst Appl Microbiol; 19:624-33.
- **Núñez, M.** 2011. Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta. Tesis de grado: Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 116 pp.
- **O’Leary W. M.** 1989. Practical Handbook of Microbiology. CRS Press, Inc. EUA.
- **Oliveira, S., G. Veneroni, M. Costa.** 2012. Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish. Pesquisa Veterinária Brasileira, Vol. 32. No.8. Río de Janeiro, Brasil. 701-706.
- **Otto Parrodi, E. S.,** 1999. Conservación del ajolote (*Ambystoma mexicanum*) mediante su cultivo y siembra en el Parque Ecológico de Xochimilco. Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco AC. Hoja de cálculo SNIB-CONABIO proyecto No. J087. México D. F.
- **Paniagua, L., E. Monroy, M. Perches, E. Negrete, O. García, S. Vaca.** 2006. Resistencia a antibióticos y metales pesados en *Aeromonas hydrophila* aislados de charal (*Chirostoma humboldtianum*, Valenciannes, 1835). Hidrobiológica 1: 75-80.
- **Pérez, J., R. Vázquez. , C. Rodríguez., R. Miranda Romo y E. Nader.** 1987 Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México.
- **Peterson, M., W. Slack, N. Brown, J. McDonald.** 2004 Reproduction in Non native Environments: Establishment of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Coastal Mississippi Watersheds.
- **Pettibone, G.** 1998. Population dynamics of *Aeromonas* spp. in an urban river watershed. J Appl Microbiol , 85:723-30.
- **Piñeros, M., S. Rondón, L. Restrepo, R. Eslava.** 2010. Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* spp. Revista ORINOQUIA, Colombia. 14: 33-44.
- **Ramos, C.** 2011. Presencia de coliformes totales y fecales en el agua del río Matlacobat, Xico, Veracruz, México. Tesis de grado: Licenciatura en Biología. Universidad Veracruzana, Facultad de Biología. Xalapa, Veracruz. 67 pp.

- **Reid, K. y D. Wood.** 1976. Ecology of Inland Water and Estuaries. 2a ed. Ed: D. Van Nostrand. Nueva York.
- **Reith, M., R. Singh, B. Curtis, J. Boyd, M. Bouevitch, A. Jennifer, J. Munholland, C. Murphy, D. Sarty, J. Williams, J. Nash, S. Johnson, L. Brown.** 2008. The genome of *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. BMC Genomics. 9: 1 – 15.
- **Ricker, W.** 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. Bulletin Fisheries Research. Board of Canada. 191:382.
- **Rodríguez, H., A. Hernández, H. Villarel, P. Saucedo, M. Ulloa, C. Rodríguez.** 2006. Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the Gonadosomatic Index at first maturation. Aquaculture.
- **Rojo, A.** 2009. Evaluación de la factibilidad técnica y económica del policultivo de la tilapia roja *Oreochromis sp.* con el langostino *Macrobrachium americanum* (Bate 1868). Tesis de grado: Maestría en recursos naturales y medio ambiente. Instituto Politécnico Nacional, Centro interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa. Sinaloa, México. 94 pp.
- **Romero, R. y I. Benavente.** 2002. Síndrome diarreico infeccioso. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. 176 pp.
- **Saavedra, M., S. Guedes, P. Rema, M. Tacao, A. Correia, A. Martínez.** 2004. Resistance to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Microbiology 7:207-211.
- **Sandoval, J.** 2003. Calidad microbiológica y fisicoquímica del agua de los canales de Xochimilco. Tesis de grado: Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- **Sha, J., E. V. Kozlova, A. K. Chopra.** 2002. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: Generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. Infect. Immun. 60(4):1924-1935.
- **Silva, L. J.** 2011. *Aeromonas hydrophila* em organismos aquáticos no Vale do São Francisco: fatores de virulência e perfil de resistência à antimicrobianos e metais pesados. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE. 60p.
- **SINCOAGRO, S.C.** 2009. Manual de producción de tilapia con especificaciones de calidad e inocuidad. 10- 17 pp.
- **Soto, R. y A. Esquivel.** 2003. Niveles de contaminación sus problemas históricos y perspectivas de solución. III Seminario Internacional de Investigadores de Xochimilco; México, DF.

- **Suárez, W. y F. Herrera.** 2011. Aislamiento de *Aeromonas spp.* en muestras de pescado fresco comercializado en Pamplona (Norte de Santander). Revista U.D.C.A Act. y Di. Cient. 14:7-13.
- **Tena, D., A. González, C. Gimeno, T. Pérez, J. Bisquert.** 2006. Infección extraintestinal por *Aeromonas spp.*: revisión de 38 casos. Sección de Microbiología. Hospital Universitario e Guadalajara, España.
- **Wang, L., Y. Wei, G. Yuan, M. Dai, X. Chen.** 2012. Molecular Characterization and Virulence genes of *Aeromonas hydrophila* isolated from the Chinese Giant salamander (*Andrias davidianus*). Asian Herpetological Research. 3: 303-309.
- **Xolalpa, F.** 2009. Monitoreo quincenal de clorofila a y parámetros fisicoquímicos en tres localidades de los canales de Xochimilco (El Bordo, La Virgen y El Japón) Período 11 de agosto al 3 de noviembre 2008. Tesis de grado: Licenciatura en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México, D.F. 66 pp.
- **Zambrano-González, L., Reynoso, V. H., G. Herrera.** 2003. Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. AS004. México D. F.
- **Zambrano, L., E. Valiente., K. Levy., F. Córdova., A. Tovar., L. Sastré., M. Rubio., J. Giménez., M. Almazán., C. Sumano., M. Alvarado., S. López., C. González., M. Mazari., G. Pérez., A. Aguilar., F. Contreras., V. Mondragón.** 2012. Programa de Análisis y Restauración del Sistema Lacustre de Xochimilco y del Ajolote. Informe final. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. México, D.F. 110 pp.
- **Zambrano, L., A. Tovar., C. Sumano., C. Ayala., M. Rubio., A. Trejo.** 2014. Rehabilitación de la red chinampera y del hábitat de especies nativas de Xochimilco. Informe final. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. México, D.F. 135 pp.
- **Zhang, Y., C. Ong, Y. Leung.** 2000. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. Microbiology. 146: 99-109.