



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE CASO: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS
SUSCEPTIBLES O RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN *Oncorhynchus mykiss* DE UN
CENTRO PISCÍCOLA EN EL ESTADO DE HIDALGO**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

Presenta

ANGELA SARAHI VALDERRABANO ALVAREZ

DIRECTORA

DRA. SYLVIA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO 2025



Mineral de la Reforma, Hgo., a 7 de mayo de 2025

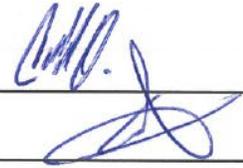
Número de control: ICBI-D/751/2025
 Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
 DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado a la egresada de la Licenciatura en Biología **Angela Sarahi Valderrabano Alvarez**, quien presenta el trabajo de titulación "**Estudio de caso: Aislamiento e identificación de bacterias patógenas susceptibles o resistentes a antibióticos en *Oncorhynchus mykiss* de un centro piscícola en el estado de Hidalgo**", ha decidido, después de revisar dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente: Dra. Claudia Coronel Olivares



Secretario: Dra. Gabriela Marisol Vázquez Cuevas



Vocal: Dra. Sylvia Martínez Hernández



Suplente: Dra. Dulce María Galván Hernández

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez
 Director del ICBI



GVR/YCC

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
 Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx,
 vergara@uaeh.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es el resultado de mi formación profesional como bióloga. Una vez concluida esta fascinante investigación, espero encontrar un camino donde pueda ejercer la carrera de manera satisfactoria para mí, en donde me siga encontrando con nuevos desafíos y aprendiendo nuevas cosas que sin duda solamente a través de los ojos de un biólogo se pueden apreciar en todo su esplendor.

Al finalizar esta fase escolar, me he dado cuenta que mi trayectoria en la carrera estuvo llena de personas que sin duda fueron un ejemplo a seguir y que no solamente demostraron ser excelentes profesionales, sino que también son personas admirables, bondadosas, humanitarias y que me motivaron en algún punto de la carrera. De entre las personas más importantes y fuente de inspiración durante mi formación debo agradecer a la Dra. Sylvia, Dr. Pablo, Dra. Dulce, Dra. Rocío e Ing. Raúl.

Particularmente agradezco a mi directora de tesis, Dra. Sylvia, quien fue un apoyo sumamente importante en la elaboración de esta tesis y sobre todo agradezco su paciencia y confianza que me ha brindado. Sin duda ha sido una inspiración desde mi primer semestre de la carrera y de quien he encontrado pasión por las bacterias. Su apoyo sincero por el futuro profesional de sus estudiantes me permitió experimentar nuevos retos que nutrieron mis habilidades.

Realmente agradezco a cada persona y amigo que conocí durante mis años de formación, pues todos ellos demostraron ser personas de buen corazón. Y, sin duda en mi corazón siempre van a estar Xóchitl, Elisa y Karina, quienes han sido un pilar en mi vida y quienes siempre me alentaron a terminar este proyecto.

Agradezco a mi familia y amigos ajenos a la carrera, pues sin ellos este logro no hubiera sido posible. Así como a mi fuente incondicional de apoyo emocional durante todos estos años, mi perrita Maggy. Y aunque mi abuelita ya no está presente para ver el resultado de mi esfuerzo, siempre le agradeceré todo el cariño y apoyo que me dio en vida y es a quien le dedico todos y cada uno de mis esfuerzos - de mi pasado, mi presente y mi futuro-.

Índice

Resumen.....	6
1. Introducción	7
2. Antecedentes	8
2.1 Trucha arcoíris	8
2.1.1 Generalidades.....	8
2.1.2 Producción en México.....	8
2.2 Patógenos zoonóticos que afectan a los peces.....	9
2.3 Bacterias	10
2.3.1 Enfermedades bacterianas reportadas en trucha arcoíris	10
2.3.2 Mesófilos aerobios.....	11
2.3.3 Enterobacteriaceae	11
2.3.4 Pseudomonadaceae	11
2.4 Identificación de bacterias	12
2.4.1 Métodos tradicionales.....	12
2.4.2 Métodos modernos (MALDI-TOF).....	13
2.5 Resistencia a antibióticos de bacterias	14
3. Objetivos	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. Materiales y método	16
4.1 Sitio de estudio y muestreo.....	16
4.2 Medición de parámetros fisicoquímicos del agua.....	18
4.3 Determinación de la calidad microbiológica del agua	18
4.3.1 Aislamiento de bacterias: diluciones decimales seriadas.....	18
4.3.2 Siembra microbiológica	19
4.4 Procesamiento de ejemplar juvenil de <i>Oncorhynchus mykiss</i>	20
4.4.1 Obtención del ejemplar	20
4.4.2 Siembra microbiológica	21
4.4.3 Tinción de Gram	22
4.4.4 Prueba de catalasa.....	22

4.5 Aislamiento de cepas.....	22
4.6 Identificación mediante MALDI-TOF	23
4.7 Prueba de resistencia/susceptibilidad a antibióticos.....	24
4.7.1 Activación de la cepa bacteriana.....	24
4.7.2 Ajuste del patrón de turbidez McFarland 0.5	24
4.7.3 Aplicación de antibiogramas	25
5. Resultados	27
5.1 Parámetros fisicoquímicos del agua.....	27
5.2 Calidad microbiológica del agua y conteo de UFC	27
5.3 Análisis microbiológico de <i>Oncorhynchus mykiss</i>	28
5.3.1 Tinción de Gram y prueba de la catalasa	33
5.4 Identificación mediante MALDI-TOF	35
5.5 Prueba de resistencia/susceptibilidad a antibióticos.....	35
6. Discusión.....	37
7. Conclusiones.....	42
8. Perspectivas.....	43
9. Bibliografía.....	44
Anexo I.....	52

Resumen

Desde hace 15 años la producción acuícola en México ha logrado un crecimiento favorable, pues los beneficios y facilidad de cultivo que representa este sector en comparación con otros sistemas agroalimentarios lo ha posicionado como prioritario en los planes a futuro del país en cuanto a seguridad alimentaria. Sin embargo, el crecimiento acelerado de este sector conlleva ciertos riesgos. Uno de ellos es la aparición de enfermedades zoonóticas, las cuales podrían ser subestimadas debido a la falta de monitoreo y vigilancia.

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de bacterias patógenas susceptibles o resistentes a antibióticos en un ejemplar de *Oncorhynchus mykiss* cultivado en un centro piscícola de Hidalgo.

Durante los muestreos del centro piscícola se registraron valores correspondientes a indicadores fisicoquímicos y microbiológicos del agua empleada en el cultivo de *O. mykiss*, lo que denotó las condiciones que favorecieron la aparición de enfermedad en el cultivo.

Se utilizaron medios selectivos para el aislamiento de las bacterias, y posteriormente se realizaron técnicas como la tinción de Gram y la prueba de la catalasa para una pre-identificación. Sin embargo, para asegurar la identificación taxonómica, se empleó la técnica molecular MALDI-TOF, que permitió identificar a nivel de especie a las cepas aisladas como *Pseudomonas stutzeri*.

Finalmente, mediante la aplicación de antibiogramas se determinó la susceptibilidad o resistencia de *P. stutzeri* frente a los antibióticos; de acuerdo a lo propuesto en los manuales correspondientes.

De los antibióticos evaluados, las cepas fueron resistentes a cefotaxima y carbenicilina.

1. Introducción

La acuicultura está definida en la Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables (Secretaría de Servicios Parlamentarios, 2023, México), como el “conjunto de actividades dirigidas a la reproducción controlada, pre engorda y engorda de especies de la fauna y flora realizadas en instalaciones ubicadas en aguas dulces, marinas o salobres, por medio de técnicas de cría o cultivo, que sean susceptibles de explotación comercial, ornamental o recreativa” (Art. 4).

Este sector es reconocido internacionalmente por su gran contribución a la seguridad alimentaria y se estima que la producción mundial ha incrementado significativamente. En los últimos siete decenios, se ha registrado un valor de venta de hasta 265,000 millones de dólares, de acuerdo a datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) (FAO, 2022).

En el caso de México, la acuicultura es el sistema agroalimentario que presenta la mayor tasa de crecimiento anual (TCA), de hasta 10.3%, de acuerdo con los datos recopilados de 2010 a 2020; posicionándola por encima de la agricultura y la ganadería, las cuales solamente han alcanzado un TCA de 1.4% y 2.6%, respectivamente. Por ende, para el año 2030, se espera un crecimiento a 296 toneladas de producción, en comparación con lo registrado en el año 2019 de 251 toneladas (García Medel, 2022).

Asimismo, se resalta la importancia de esta actividad agroalimentaria en México al ser reconocida como proyecto prioritario para la autosuficiencia alimentaria en el Plan Nacional de Pesca y Acuicultura emitido por el gobierno federal a finales de 2020. Por ello, de acuerdo a datos del Registro Nacional de Pesca y Acuicultura, aproximadamente 56,250 personas se dedican a esta actividad en un total de 9,443 instalaciones registradas (Vázquez-Vera y Chávez-Carreño, 2022).

De acuerdo a la Carta Nacional Acuícola, documento que realiza el Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INAPESCA), en México se han registrado 16 especies para la acuicultura comercial, 27 para la acuicultura de fomento y siete con potencial acuícola (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022). De las cuales, por su volumen y valor de producción destacan: el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*), el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), la carpa (*Cyprinus spp.*), el ostión japonés (*Crassostrea gigas*), la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (García Medel, 2022).

Sin embargo, el crecimiento acelerado de la acuicultura implica ciertos riesgos; como la aparición de enfermedades zoonóticas. Las cuales se han generalizado como de baja incidencia, pero, algunos autores establecen la posibilidad de que se estén subestimando debido a la falta de monitoreo y vigilancia (Ziarati *et al.*, 2022).

2. Antecedentes

2.1 Trucha arcoíris

2.1.1 Generalidades

Oncorhynchus mykiss (Walbaum 1792), mejor conocida como trucha arcoíris, pertenece a la familia Salmonidae, que se caracteriza por tener un cuerpo de forma alargada y fusiforme, el dorso verdoso con flancos más claros y una banda irisada en todo el cuerpo. Característicamente presenta numerosas manchas negras en el dorso, en los flancos y sobre las aletas dorsal, adiposa y caudal. Es nativa de las cuencas que drenan al Pacífico en Norte América, y desde 1874 ha sido introducida en las aguas de todos los continentes, excepto la Antártica, con propósitos recreacionales para pesca deportiva y para acuicultura. (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021).

Tiene un crecimiento rápido y es tolerante a una amplia gama de ambientes y manipulaciones. El hábitat natural de *O. mykiss* es en ríos, lagos y lagunas de aguas frías, limpias y cristalinas, donde prefieren corrientes moderadas y fondos pedregosos. Pero, es capaz de ocupar muchos hábitats diferentes, en donde puede presentar un ciclo de vida anádromo (vive en océano, pero desova en ríos y corrientes con fondos de grava) o habitar de manera permanente en lagos. La variedad con un ciclo anádromo es caracterizada por alcanzar rápidamente de 7-10 kg en tres años, mientras que la variedad de agua dulce solamente alcanza 4.5 kg en ese mismo periodo (FAO, 2024).

Cabe mencionar que las truchas no desovan naturalmente en los sistemas de cultivo, por lo que los juveniles deben ser obtenidos por desove artificial o por recolección de huevos de poblaciones silvestres (FAO, 2024).

2.1.2 Producción en México

En el país, el cultivo de esta especie inició a finales del siglo XIX en un vivero natural del Estado de México con fines de repoblamiento en embalses y cuerpos de agua nacionales. Actualmente, 17 Entidades han registrado su cultivo con fines comerciales: Baja California, Chihuahua, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz. Esta actividad se realiza principalmente en zonas con climas de templado a frío y en sitios con altitud superior a 1,200 metros sobre el nivel del mar (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021).

En el año 2021, el sector acuícola produjo 1,083 toneladas en peso vivo de *O. mykiss* con un valor aproximado de \$68,181 pesos mexicanos (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2022). La comercialización se enfoca a mercados regionales, usualmente en corredores turísticos. Mientras que, en las grandes ciudades, el producto tiene poca introducción debido a que el volumen de producción solo alcanza para abastecer los requerimientos del mercado local (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021).

En México, generalmente se emplean tres diferentes sistemas de producción: extensivo, semi-intensivo e intensivo. Los cuales están clasificados de acuerdo a la densidad de organismos por

metro cuadrado o cúbico, tipo de alimentación, flujo de agua, tecnología empleada, capital a invertir, especie acuática a producir, entre otros (Gómez *et al.*, 2023).

El sistema extensivo está asociado al modelo básico de gestión, por lo que se conoce también como “acuicultura de repoblación”. Este sistema se realiza en embalses (presas, jagueyes, lagos y lagunas) o en estanques rústicos de tierra. La práctica de crianza, preengorda y engorda de las especies es a expensas de la productividad natural del sitio de cultivo. La densidad de organismos es de 3 peces/m³. El recambio de agua se da de manera natural (afluente de río, lluvia, etc.). La supervivencia es baja y existe una amplia competencia entre especies. No se lleva a cabo la medición de parámetros físicoquímicos del agua y no se tiene tecnología alguna (Gómez *et al.*, 2023) (Ramírez *et al.*, 2018).

El sistema semi-intensivo, también conocido como “acuicultura de subsistencia o rural” utiliza estanques con superficies manejables, donde los suelos están impermeabilizados. La densidad de organismos puede llegar a ser de 1 a 10 peces/m³. Los peces se alimentan parcialmente del alimento natural del agua complementándose con alimento balanceado provisto por los acuicultores. Se tiene control completo sobre el agua, realizándose recambios de 5-20% de agua por día, con base en la medición de los parámetros físicoquímicos. Se pueden tener mono o policultivos de peces (Gómez *et al.*, 2023) (Romero, 2020).

Dentro de este sistema frecuentemente se emplea el “sistema tradicional de agua”. El cual no contempla tratamiento del agua posterior a su uso. Por lo que, no es posible implementar técnicas de recirculación de agua para disminuir el gasto hídrico generado, y a su vez, contamina cuerpos de agua aledaños al cultivo, ya que el agua que emerge de dichos centros piscícolas tiene niveles altos de residuos tóxicos (amoníaco, amonio, nitritos, etc.) que ya no eran óptimos para el cultivo (Sánchez *et al.*, 2023).

El sistema intensivo se dedica exclusivamente a monocultivos de especies de alto valor mercantil para la venta en frontera y para la exportación. Puede utilizar estanques, jaulas flotantes o canales de corriente rápida (raceways), que permiten cultivar altas densidades de peces. Depende totalmente del alimento comercial. Realiza hasta 3 recambios de agua por día y diariamente se toman los parámetros físico químicos del agua para evitar problemas de sanidad por la densidad de los cultivos y de sus desechos orgánicos (Gómez *et al.*, 2023)

En algunos sistemas intensivos se han implementado estrategias para limpiar el agua y disminuir el gasto hídrico. Tal como el Sistema de Recirculación Acuícola (RAS, por sus siglas en inglés), en el cual se utilizan sedimentadores, filtros mecánicos, filtros biológicos y esterilización UV, con lo cual se busca reutilizar hasta un 90% total del agua. Sin embargo, presenta la desventaja de ser un reto económico para los productores (Sánchez *et al.*, 2023).

2.2 Patógenos zoonóticos que afectan a los peces

Una de las prioridades del sector acuícola es mantener el control de enfermedades dentro de los centros acuícolas, ya que las infecciones en peces pueden generar brotes que resulten en un

significativo daño económico debido a la alta morbilidad y muerte de las especies cultivadas, además de que pueden comprometer la salud humana, tal como en el caso de las zoonosis. (Irshath *et al.*, 2023).

Una zoonosis se define como aquella enfermedad infecciosa que es transmitida de especies animales a humanos. En el caso de aquellas de origen acuático existen dos principales rutas de transmisión: 1) mediante el consumo de pescado crudo o no lo suficientemente cocido y el consumo de agua contaminada con heces o mucosidades de pez y 2) mediante el contacto con el agente infeccioso a través de heridas abiertas o abrasiones (Ziarati *et al.*, 2022).

La diversidad de especies bacterianas asociadas a organismos acuáticos es vasta, derivado del amplio espectro de condiciones ambientales en las que viven y que les permiten estar en contacto con patógenos. Las bacterias Gram negativas son los principales patógenos de peces, aunque también las especies Gram positivas han sido registradas como potenciales zoonóticos (Lowry y Smith, 2007).

A escala mundial, en el cultivo de peces del sector acuícola se han reportado con más frecuencia las siguientes especies bacterianas: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia ruckeri*, *Piscirickettsia salmonis*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnare*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio carchariae*, *Moritella viscosa*, *Tenacibaculum maritimum*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus phocae* y *Mycobacterium marinum* (Irshath *et al.*, 2023).

Sin embargo, las especies anteriormente mencionadas no son las únicas que se pueden encontrar asociadas a los peces, pues la matriz ambiental se puede ver afectada por actividad humana; dando como resultado la aparición de bacterias patógenas de procedencia humana, tales como *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Flores *et al.*, 2021).

2.3 Bacterias

2.3.1 Enfermedades bacterianas reportadas en trucha arcoíris

De acuerdo con los datos recopilados a nivel mundial por la FAO (2024), se han reportado infecciones recurrentes generadas por *Aeromonas salmonicida* (furunculosis), *Aeromonas liquefaciens* (enfermedad similar a la furunculosis), *Vibrio anguillarum* (vibriosis), *Renibacterium salmoninarum* (enfermedad bacteriana del riñón) y *Myxobacterium* (enfermedad bacteriana de las agallas).

En México, de las bacterias previamente mencionadas, solamente se han reportado cepas de la especie *Renibacterium salmoninarum* en la Carta Nacional Acuícola, además de que está enlistada y monitoreada en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021).

Mientras que, con base en los resultados publicados de investigaciones científicas, se han identificado dentro del país las siguientes especies bacterianas en trucha arcoíris: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium branchiophilum*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri* y *Lactococcus garvieae* (Álcantara *et al.*, 2022).

Álcantara *et al.* (2022) menciona que a pesar de que se realizan esfuerzos de la comunidad científica para identificar a las bacterias patógenas de peces en la acuicultura, la difusión de esta información no ha sido prioridad. Lo que repercute en el control y monitoreo de las enfermedades de origen bacteriano; al no poder llevar un correcto registro que permita establecer si alguna otra especie bacteriana es capaz de generar brotes significativos en los cultivos.

2.3.2 Mesófilos aerobios

Los microorganismos mesófilos aerobios son reconocidos como parte de los grupos indicadores que advierten oportunamente un manejo inadecuado o contaminación de un alimento y/o sitio de producción (Sieger, 2020).

En el caso del agua, el conteo de mesófilos aerobios es ampliamente utilizado para estimar la calidad sanitaria; de acuerdo con la NOM-127-SSA1-2021, que establece los límites permisibles para diversos parámetros físicos, químicos, microbiológicos y radiológicos que deben cumplir el agua para considerarse potable (Secretaría de Salud, 2022). Estos microorganismos son heterótrofos, aerobios o anaerobios facultativos, mesófilos o criófilos, capaces de crecer en cualquier medio de agar nutritivo (Silva *et al.*, 2004).

2.3.3 Enterobacteriaceae

Las especies pertenecientes a esta familia forman parte natural de la microbiota de los peces, sin embargo, algunas cepas o serovariedades pueden causar ciertas enfermedades en humanos. Dentro de esta familia se incluyen especies como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. y *Salmonella* sp.; estos bacilos Gram negativos se pueden encontrar tanto en el ambiente acuático como en el tracto digestivo del pez. La ruta de infección en humanos se da mediante heridas abiertas, al estar en contacto con el pez o mediante rasguños que sirven como punto de entrada para estas bacterias (Ziarati *et al.*, 2022).

2.3.4 Pseudomonadaceae

Los microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* son Gram negativos caracterizados por presentar células en forma de bacilo recto o ligeramente curvado, pero no helicoidales. Móviles por uno o varios flagelos polares (dependiendo de la especie). Usualmente aerobios, aunque en algunos casos pueden utilizar nitrato como aceptor de electrones alternativo en el metabolismo respiratorio. Son catalasa positiva y pueden ser oxidasa negativa o positiva dependiendo de la especie. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza; en cuyo caso existen especies patógenas para humanos, animales o plantas (Brenner *et al.*, 2005).

Dentro de la variedad de especies pertenecientes a este género también se encuentran las de tipo patógenas oportunistas, que son caracterizadas por el potencial de producir enfermedad solamente cuando la resistencia del hospedador es deficiente; lo que podría ser ocasionado por inflamación, infecciones previas, inmunodeficiencia, altos niveles de estrés generado por el medio o incluso la edad (Tavera, Acosta y Rodríguez, 2015).

De acuerdo con el manual Bergey's de Sistemática Bacteriológica (Brenner *et al.*, 2005) y con la actualización sobre el phylum aprobada por el Comité Internacional de Sistemática de Procariontas (Oren y Garrity, 2021), está clasificada taxonómicamente de la siguiente manera:

Phylum XIV: Pseudomonadota

Clase III: Gammaproteobacteria

Orden IX: Pseudomonadales

Familia I: Pseudomonadaceae

Género I: *Pseudomonas*

Especie: *Pseudomonas stutzeri*

Las células poseen un diámetro de 0.7 - 0.8 μm y una longitud de 1.4 - 2.8 μm . Las colonias tienen una textura rugosa y adherente, sin pigmento. Aunque algunas pueden presentar un color café oscuro debido a la alta concentración de citocromo C de las células. Usualmente crecen a 43 °C, pero el óptimo de temperatura es alrededor de 35 °C. Las cepas de *P. stutzeri* pueden producir, bajo ciertas condiciones, un flagelo lateral de longitud de onda corta adicional al flagelo polar que caracteriza al género bacteriano (Brenner *et al.*, 2005).

2.4 Identificación de bacterias

2.4.1 Métodos tradicionales

Los métodos tradicionales, también conocidos como métodos fenotípicos, permiten identificar microorganismos aislados hasta nivel de género o especie, en función del número de observaciones macroscópicas, microscópicas y de pruebas bioquímicas realizadas (Carrasco *et al.*, 2020).

Se toma en cuenta la forma celular (tamaño, aspecto, endosporas, cápsulas, flagelos, tipo de tinción, etc.), el aspecto en los medios de cultivo sólidos (tamaño, forma, borde, transparencia, brillo, color, textura, elevación, y consistencia), las propiedades fisiológicas (margen de crecimiento a distintas temperaturas, pH y cloruro sódico, etc.), las necesidades nutricionales, así como las propiedades bioquímicas (prueba de la catalasa, de oxidasa, la reducción de nitratos, el rojo de metilo, etc.) (Hervé, 2015) (Gobernado y López, 2003).

Generalmente, el uso de medios de cultivo es el método diagnóstico de elección, ya que permite el aislamiento de la bacteria implicada, su identificación, y la aplicación del estudio de sensibilidad a

los antibióticos. Para ello, es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación (Bou *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, se utilizaron medios de cultivo selectivos y no selectivos. La diferencia radica en que los selectivos incluyen ingredientes que inhiben el desarrollo de determinados microorganismos y contiene sustancias que favorecen el crecimiento de otros. Mientras que los medios no selectivos favorecen el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos sin satisfacer específicamente algún requerimiento nutricional (Rodríguez y Zhurbenko, 2018).

El agar cuenta estándar es un medio no selectivo utilizado para la cuantificación de la carga microbiana presente en muestras de aguas de consumo, aguas residuales, bebidas lácteas, entre otros alimentos. Está compuesta por extracto de levadura, tripteína, glucosa y agar, que permiten el desarrollo de bacterias aerobias no exigentes. Particularmente busca determinar la cantidad de bacterias del tipo mesófilas aerobias que se desarrollan entre 25° C y 40 °C (Gil, 2023).

Por otro lado, el agar para *Aeromonas* (Ryan) es un medio selectivo de *Aeromonas hydrophila* a partir de muestras clínicas y ambientales. El medio además de tener sustancias que proporcionan los requerimientos nutricionales básicos de las bacterias deseadas, contiene sustancias indicadoras (azul de bromotimol y azul de timol) e inhibidoras de ciertos microorganismos (sales biliares inhibidoras de Gram positivos) (Condalab, 2022).

Cabe mencionar que el medio *Aeromonas* (Ryan), si bien su objetivo es aislar *A. hydrophila*, caracterizada por presentar colonias verdes con un centro negro, también existe la posibilidad de aislar otra especie bacteriana. De acuerdo al test microbiológico de la ficha técnica del agar, puede darse el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales reaccionan con el medio formando colonias azul-verdes (Condalab, 2022).

2.4.2 Métodos modernos (MALDI-TOF)

Los métodos modernos, también conocidos como métodos moleculares, son una respuesta a la necesidad de obtener la identificación bacteriana de una forma más rápida y precisa. Aunque usualmente estos métodos se utilizan de manera complementaria a los tradicionales (García *et al.*, 2012).

Los primeros métodos de identificación molecular se basaron en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión. Por ello, se han implementado técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), y la pirosecuenciación, entre otros (Palomino y González, 2014).

Asimismo, existen métodos basados en la proteómica, que se encarga de estudiar y caracterizar al conjunto de proteínas expresadas por un genoma. Las técnicas más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas (Bou *et al.*, 2011).

La desorción-ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (mejor conocida como MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) es una técnica de identificación de microorganismos basada en la espectrometría de masas. Esta técnica se realiza mediante el análisis

de proteínas, principalmente ribosomales, que conduce a la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie (Zárate *et al.*, 2014).

Es una herramienta útil para el laboratorio de microbiología, ya que permite identificar bacterias y levaduras de manera rápida, e incluso es capaz de diferenciar a nivel de subespecie, donde los espectros obtenidos en el análisis de proteínas se comparan con una base de datos amplia (Rellos *et al.*, 2015).

2.5 Resistencia a antibióticos de bacterias

La resistencia antimicrobiana se define como la capacidad de los microorganismos para resistir los efectos de los antibióticos; es una característica inherente de las bacterias o puede ser una capacidad adquirida durante el proceso infeccioso (Giono *et al.*, 2020).

Específicamente hablando del sistema de salud en México, es una situación compleja, pues en los últimos años, la población ha crecido hasta alcanzar los 127 millones de habitantes y, en contraste, el gasto en salud pública pasó de una inversión del 2.8% del total del Producto Interno Bruto en 2012 a tan solo 2.6% en 2021. Estas cifras indican que el gasto público de salud en México está por debajo del 6% recomendado por la Organización Panamericana de la Salud (Medina, 2020).

Incluso para el 2021, aunque se registró un ligero incremento de \$683,221 millones de pesos destinados a este sector, a causa de la pandemia por Covid-19, sigue considerándose como un estancamiento de los recursos monetarios al sector salud (Saldívar, 2022). Esas cifras posicionan a México como un país vulnerable ante enfermedades infecciosas e infecciosas emergentes. Pues sin una inversión significativa, disminuyen las probabilidades de atender de manera eficiente a la población, especialmente a los grupos vulnerables.

Agravando el tema de salud, no solo en México, sino a nivel mundial, se presenta el rápido incremento de la resistencia a antibióticos de las cepas bacterianas. Esta resistencia a antibióticos implica que una bacteria, que en un principio era sensible al efecto de un activo antibacteriano, ya no lo es. Dicha resistencia puede obtenerse por alguna mutación en sus genes, o al haber adquirido esos genes de resistencia de otra bacteria con la que estuvo en contacto en algún medio (Székely, 2018).

La problemática de la resistencia a antibióticos está relacionada con el uso excesivo y extendido de éstos. No solamente en el ámbito médico, sino que, de acuerdo a Ochoa (2017), el uso de antibióticos en seres humanos representa el 50% del consumo global de los mismos. Mientras que el porcentaje restante comprende al uso de antibióticos en actividades agropecuarias (40%) y un porcentaje desconocido en actividades de investigación y desarrollo de productos higiénicos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de bacterias patógenas resistentes a antibióticos en un ejemplar de *Oncorhynchus mykiss* cultivado en un centro piscícola, empleando medios de cultivo selectivos y espectrometría de masas, para contribuir a los reportes actuales relacionados al estado sanitario de esta actividad en Hidalgo.

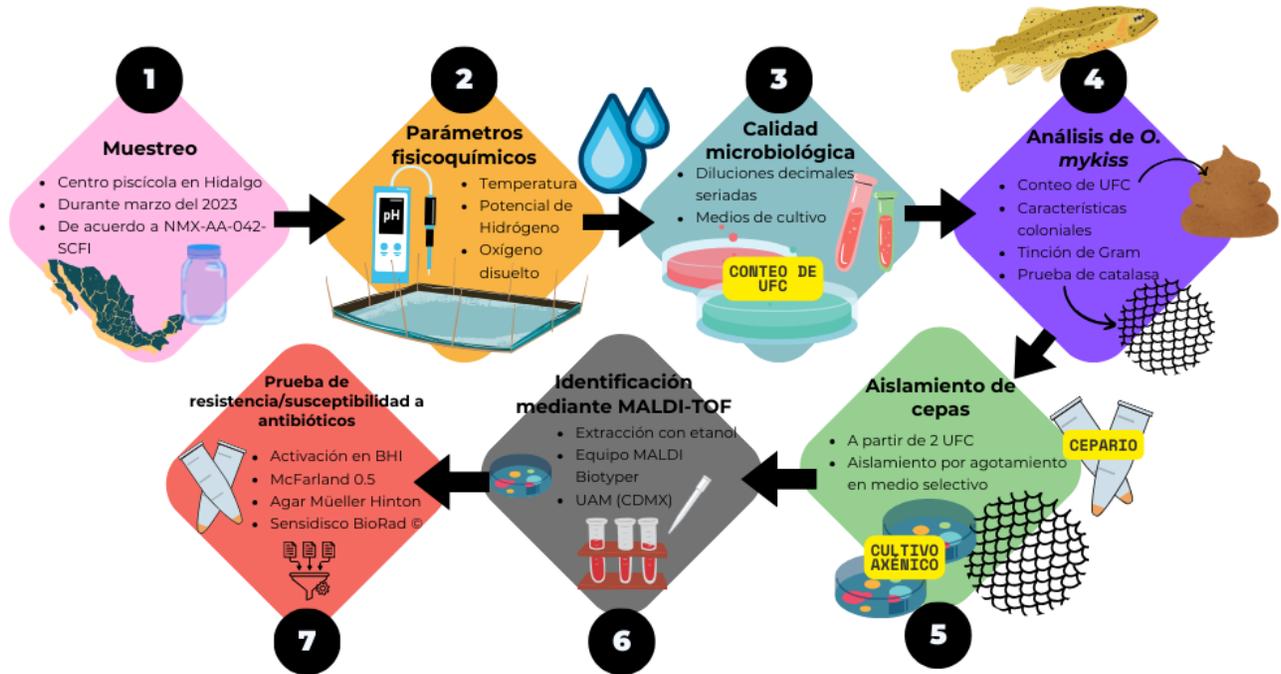
3.2 Objetivos específicos

- Determinar la calidad del agua empleada en el cultivo de *Oncorhynchus mykiss* con base en la toma *in situ* de los parámetros fisicoquímicos pH, temperatura y oxígeno disuelto, y el análisis microbiológico mediante el uso de agar cuenta estándar y medios de cultivo selectivos.
- Identificar morfológica y bioquímicamente bacterias presentes en escamas y heces de un ejemplar de *O. mykiss* enfermo.
- Identificar taxonómicamente a nivel de especie las bacterias aisladas a partir de escamas de un ejemplar de *O. mykiss* enfermo utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF.
- Evaluar la susceptibilidad/resistencia a antibióticos de las bacterias identificadas del ejemplar de *O. mykiss* mediante antibiogramas.

4. Materiales y método

Figura 1.

Resumen gráfico de la metodología



Nota. Figura de elaboración propia realizado en la versión gratuita de la plataforma online © Canva 2025. Los derechos de autor de la plantilla y elementos utilizados son propiedad de ©[Yadira Inza] a través de Canva.com

4.1 Sitio de estudio y muestreo

El proyecto de investigación fue realizado en un centro piscícola ubicado en el Estado de Hidalgo; datos más específicos no pueden ser proporcionados debido a un acuerdo verbal de confidencialidad.

Dicho centro piscícola se dedica al monocultivo de *Oncorhynchus mykiss* (Figura 2), comúnmente conocida como trucha arcoíris. Cuenta con un sistema de producción semi intensivo, con un sistema tradicional de agua. Se alimenta de agua (Figura 3) proveniente de un lago, fluyendo de manera vertical por los estanques destinados al mantenimiento de los ejemplares de *O. mykiss*. Finalmente, el efluente desemboca en una pileta que reúne toda el agua de las tres hileras de estanques y es vertido al siguiente cuerpo de agua que se encuentra cuesta abajo.

Figura 2.

Ejemplar adulto de Oncorhynchus mykiss



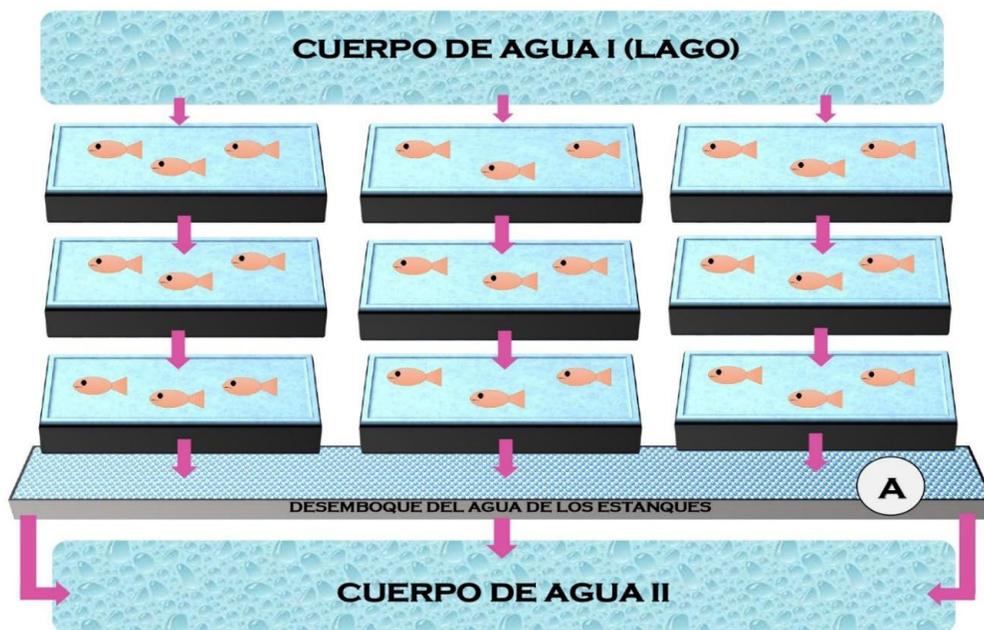
Nota. Tomado de *Female Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss* [Fotografía], por Anderson Mike, 2014, Wikimedia Commons (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Female_Rainbow_Trout_in_hand.JPG). CC BY-SA 3.0

Se realizaron tres muestreos de agua; durante los días 01, 15 y 29 de marzo del 2023. Todas las muestras se colectaron alrededor de las 10:00 am del desemboque de agua de los estanques (Punto A, Figura 3).

El muestreo se realizó de acuerdo con lo indicado en la norma mexicana NMX-AA-042-SCFI (Secretaría de Economía, 2016a). Se emplearon frascos de vidrio de 250 mililitros previamente esterilizados. Se sumergieron los frascos cerrados a 30 cm de profundidad y se procedió a abrirlos hasta llenarlos a $\frac{2}{3}$ de su capacidad para inmediatamente retirarlos del agua con la tapa nuevamente cerrada. Se mantuvo el uso de cubre bocas y guantes estériles durante todo el procedimiento. Finalmente, los frascos se colocaron en una hielera a 4 °C para ser transportados al laboratorio de Genética del Centro de Investigaciones Biológicas para su análisis inmediato.

Figura 3.

Esquema del sistema tradicional de agua del centro piscícola.



Nota. Las flechas indican el flujo de agua. El punto A indica el sitio en donde se tomaron las muestras de agua. Elaboración propia

4.2 Medición de parámetros fisicoquímicos del agua

De manera complementaria y siguiendo las respectivas normas mexicanas y manual técnico del instrumento, durante cada muestreo se tomaron *in situ* los parámetros fisicoquímicos: temperatura NMX-AA-007-SCFI-2000 (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 2014), potencial de hidrógeno NMX-AA-008-SCFI-2016 (Secretaría de Economía, 2016b), y oxígeno disuelto en agua (HANNA Instruments, 2015).

4.3 Determinación de la calidad microbiológica del agua

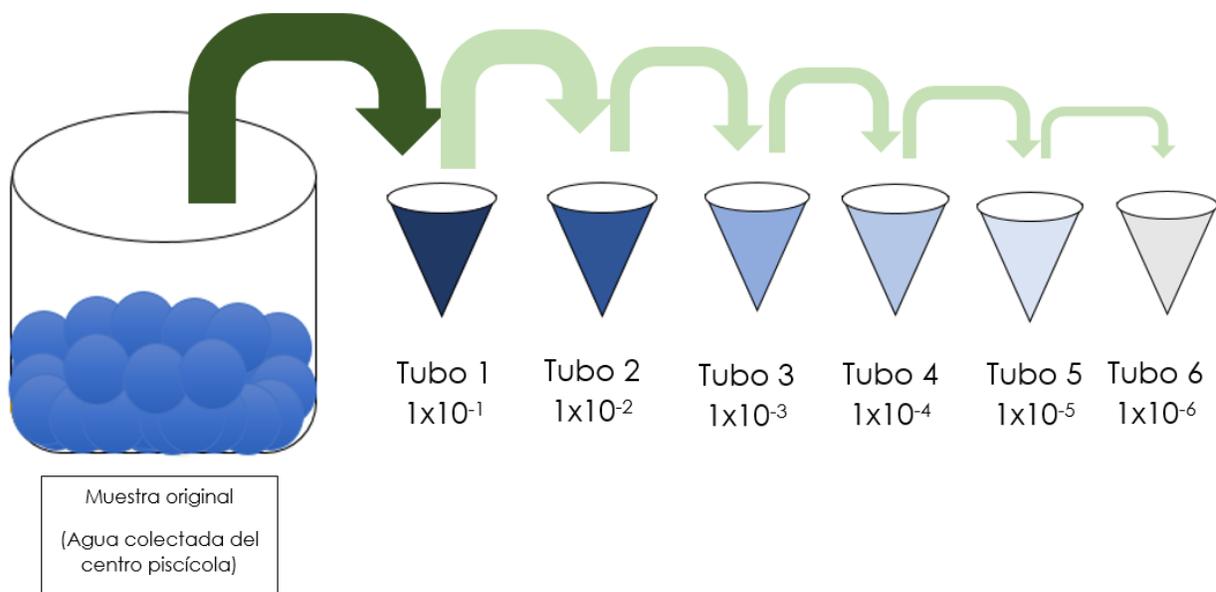
4.3.1 Aislamiento de bacterias: diluciones decimales seriadas

A partir de cada una de las tres muestras colectadas, se realizaron diluciones decimales seriadas para contabilizar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de mesófilos aerobios. Esta técnica es una reducción sistemática de una entidad conocida o desconocida, mediante la resuspensión sucesiva de una solución inicial en volúmenes fijos de un diluyente líquido (Blaize J., Suter E. y Corbo C., 2022).

A seis tubos de 1.5 mL de capacidad, rotulados de 1×10^{-1} a 1×10^{-6} se les añadió 900 μL de solución salina isotónica al 0.6%, esterilizada. Luego, se tomaron 100 μL de la muestra original colectada y se añadieron al tubo 1×10^{-1} (primera dilución), posteriormente se agitó en vórtex para homogenizar la muestra. A continuación, se transfirieron 100 μL de la dilución 1×10^{-1} al tubo 1×10^{-2} , y así sucesivamente. El procedimiento se repitió hasta la dilución 1×10^{-6} . El proceso fue realizado en condiciones estériles (Figura 4).

Figura 4.

Dilución en serie decimal a partir de las muestras colectadas de un centro piscícola.



Nota. Elaboración propia.

4.3.2 Siembra microbiológica

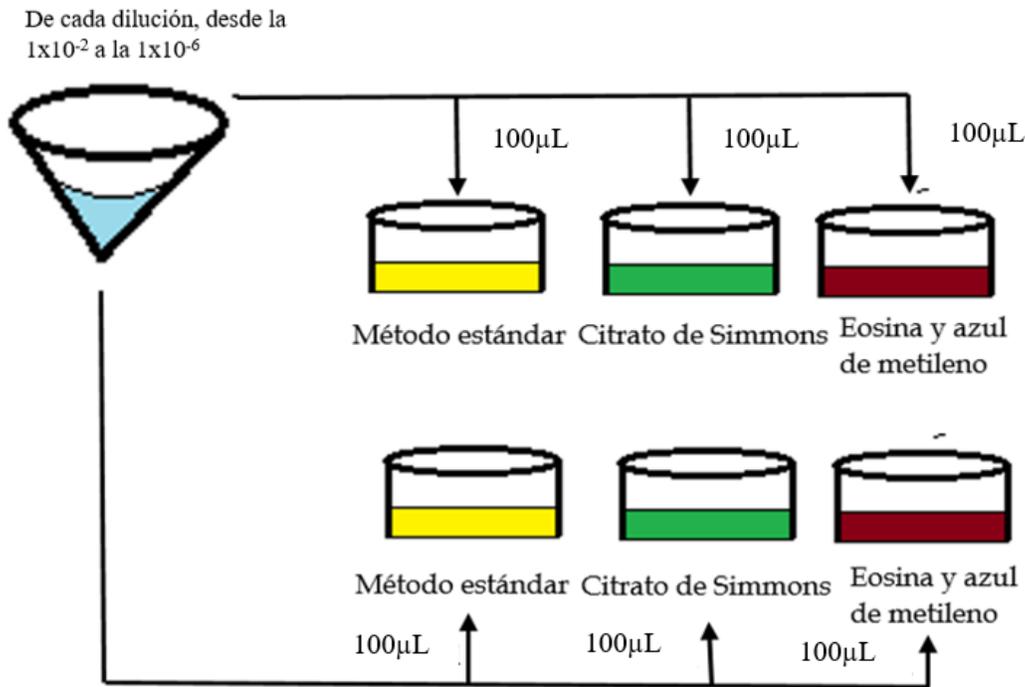
A partir de cada dilución se sembraron 100 μL en cajas de Petri, con la técnica de extensión en superficie. Dicho proceso consiste en colocar el volumen de la muestra directamente sobre el agar solidificado y, con ayuda de un asa de Drigalsky esterilizada, se extiende la muestra hasta cubrir toda la superficie (Figura 5) (García Martos, Fernández del Barrio y Paredes Salido, 1996). Se hizo por duplicado.

Los medios de cultivo empleados para la siembra fueron; 1) agar cuenta estándar (ACE), para determinar la carga de mesófilos aerobios y; 2) agar citrato de Simmons (ACS) y eosina azul de metileno (EAM), para aislar bacterias de la familia Enterobacteriaceae (Anexo I).

Posteriormente, las cajas Petri se incubaron en posición invertida, para evitar formación de gotas por condensación, a 36 °C durante 48 horas. Una vez transcurrido el periodo de incubación se contabilizaron las UFC, de acuerdo con lo establecido por la NOM-092-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1995).

Figura 5.

Siembra microbiológica de diluciones decimales seriadas en agar para cuenta estándar y agares selectivos.



Nota. Elaboración propia

4.4 Procesamiento de ejemplar juvenil de *Oncorhynchus mykiss*

4.4.1 Obtención del ejemplar

Durante el segundo muestreo, los operarios del centro piscícola en estudio notificaron la muerte de ejemplares juveniles (menores a 15 meses de edad) de *O. mykiss* por una supuesta infección por *Aeromonas*. Los síntomas que reportaron los encargados fueron: nado errático, letargo, falta de apetito, ampollas cerca del área del opérculo y a lo largo de la zona troncal de los ejemplares.

Al momento del muestreo, los estanques en donde se encontraban dichos ejemplares, ya estaban drenados para proceder a la limpieza y desinfección. Los ejemplares sobrevivientes fueron separados en estanques de menor tamaño para iniciar el protocolo de cuarentena, así como para administrarles un antibiótico de amplio espectro; oxitetraciclina.

Por ende, se solicitaron al encargado del centro piscícola ejemplares para realizar el análisis en el laboratorio y confirmar la presencia de *Aeromonas*. Sin embargo, solo fue proporcionado un ejemplar juvenil, que presentaba comportamiento errático y letargo.

Para facilitar el transporte, el personal del centro realizó el debido sacrificio del animal. De modo que el pescado se colocó dentro de una bolsa limpia sellada y fue transportado en una hielera con temperatura de 4 °C, para ser procesado en el laboratorio.

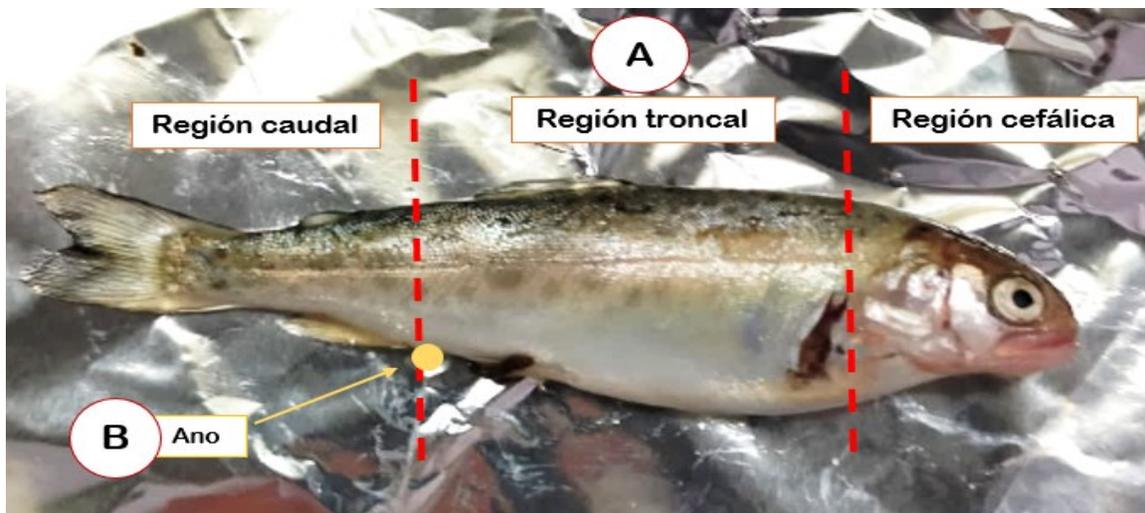
4.4.2 Siembra microbiológica

Se tomaron muestras a partir de las escamas (Punto A, Figura 6) y del excremento (Punto B, Figura 6). Con ayuda de hisopos estériles, previamente sumergidos en solución salina isotónica al 0.6%, se realizó un frotis de las escamas de la región troncal del ejemplar. Y, para la obtención de la muestra del excremento, se aplicó presión en la zona baja troncal del organismo con dirección al ano para coleccionar con los hisopos una muestra de las heces (metodología modificada de Soto-Calderón et al., 2023).

Ambas muestras fueron sembradas por la técnica de hisopo en agar *Aeromonas* (Ryan) (Anexo I). La muestra proveniente de las escamas se sembró por triplicado y se sometió a incubación durante 48 horas a 36 °C en condiciones aeróbicas. Mientras que, para el excremento, se sembró por duplicado y se sometió a incubación en condiciones anaeróbicas a 36°C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se registraron el número de UFC presentes, así como las características coloniales, de acuerdo con lo descrito por Ramírez (2020).

Figura 6.

Ejemplar juvenil de O. mykiss proporcionado por el centro piscícola.



Nota. El punto A indica la zona de donde se tomó la muestra de las escamas y el punto B indica la ubicación del ano, de donde se extrajo las heces empleadas para la siembra microbiológica. Fuente propia.

4.4.3 Tinción de Gram

Se empleó la técnica de tinción de Gram, que permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram negativas y Gram positivas, basado en el grosor de la pared celular (López-Jácome et al., 2014).

Para ello, de las UFC crecidas en medio *Aeromonas* (Ryan), se tomó una pequeña empleando un asa de siembra de punta redonda, esterilizada, y se colocó la muestra en un portaobjetos limpio realizando un pequeño frotis para incorporar uniformemente y poder fijar la muestra con calor.

Posteriormente, se realizó el siguiente procedimiento (Casasola, 2022): 1) se añadió una gota de cristal violeta, dejándolo reposar durante un minuto, 2) se añadió una gota de yodo-lugol, dejándolo reposar un minuto, 3) se agregó una gota de alcohol-cetona al 50%, dejándolo reposar solamente treinta segundos y, 4) se añadió una gota de safranina, dejándola reposar un minuto. Entre todos los pasos las muestras fueron enjuagadas con agua destilada.

Al terminar el procedimiento, se dejaron secar los portaobjetos y se observó en el microscopio óptico marca Velab (VE-B400) a un aumento de 100X, con ayuda de una gota de aceite de inmersión, para visualizar alguno de los siguientes resultados:

- Gram negativas: las bacterias se tiñen de color rosa o rojizo.
- Gram positivas: las bacterias se tiñen de color morado o azul.

4.4.4 Prueba de catalasa

A las UFC anteriores también se les realizó la prueba de catalasa (García-Tinajero y Córdoba-Ponce, 1988) para comprobar si las bacterias aisladas son aerobias al producir H_2O_2 . Si las bacterias presentan la enzima catalasa se desdobra el peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno libre.

Para realizar la prueba se tomó una pequeña cantidad de la UFC aislada de interés, con ayuda de un asa de siembra esterilizada de punta redonda y se colocó en un portaobjetos. Inmediatamente se le añadieron unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% y se analizaron los resultados de acuerdo a lo siguiente:

- Prueba positiva: se observa formación inmediata de burbujas (liberación de oxígeno).
- Prueba negativa: no hay formación de burbujas.

El procedimiento se realizó en campo estéril para evitar contaminación del ambiente.

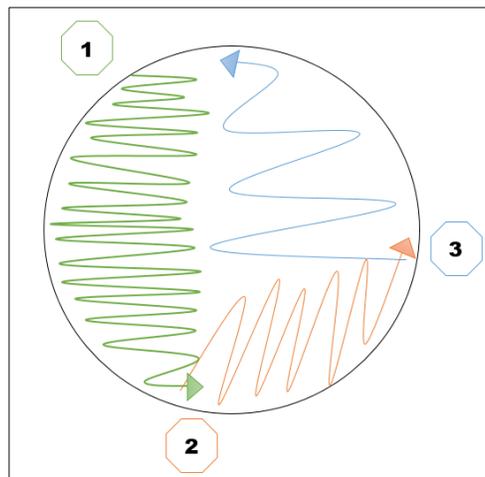
4.5 Aislamiento de cepas.

Con la finalidad de determinar molecularmente mediante MALDI-TOF hasta nivel de especie y aplicar satisfactoriamente la prueba de resistencia/susceptibilidad a antibióticos, se conformó un cepario a partir de las bacterias aisladas de las escamas de *O. mykiss*.

Para ello, se seleccionaron solamente dos UFC bien diferenciadas de las cajas de Petri sembradas en el punto 4.4.2, y se resembraron en medio de cultivo *Aeromonas* (Ryan) (Ver anexo I). La siembra microbiológica se realizó mediante la técnica de aislamiento por agotamiento (Figura 7) para verificar que la UFC seleccionada proviene de una célula viable, y así obtener cultivos axénicos (Sanz-Cervera, 2011). Las dos cajas de Petri sembradas se incubaron invertidas a 36 °C durante 24 horas.

Figura 7.

Técnica de aislamiento por agotamiento.



Nota. La numeración indica la secuencia de siembra de las estrías, las cuales conforme se avanza en la técnica, se aumenta la dispersión entre cada una de éstas para obtener una muestra axénica. Elaboración propia.

Transcurrido el tiempo de incubación, se utilizaron las UFC de los cultivos axénicos para el posterior procedimiento de identificación molecular MALDI-TOF, debido a que éstas debían ser frescas, con un periodo de vida de 24-48 horas. Simultáneamente, se tomaron parte de las mismas UFC aisladas para la conformación del cepario.

Mediante la técnica de cultivo continuo (Gutiérrez *et al.*, 2015), se tomó una UFC de cada cultivo axénico con un asa de siembra de punta redonda y se inocularon en tubos Eppendorf de 1.5 mL, que contenían 1000 µL de caldo nutritivo (Anexo I). Se agitaron los dos tubos Eppendorf en vórtex y se incubaron durante 48 horas a 36 °C. Finalmente, el cepario se mantuvo en refrigeración a 4 °C, en espera de la aplicación de antibiogramas.

4.6 Identificación mediante MALDI-TOF

A partir del cultivo axénico, se prepararon las muestras como se especifica en el Manual Maldi Biotyper 3.1 ver. 2 (Bruker, 2023) siguiendo los puntos 1-8 sobre la extracción con etanol. En

cuatro tubos Eppendorf de 2 mL se añadieron 300 μ L de agua grado molecular y con ayuda de un asa de siembra microbiológica de punta redonda se transfirieron por duplicado parte de las UFC aisladas en los cultivos axénicos. Luego, se agitaron en vórtex hasta la disgregación completa de las colonias y se añadieron 900 μ L de etanol grado analítico. Finalmente, se cerraron y sellaron los tubos Eppendorf con cinta Parafilm para evitar derrames.

Inmediatamente se mandaron a procesar al Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas, de la UAM Iztapalapa, CDMX en un equipo MALDI Biotyper (Bruker, servidor 4.1.80 (PYTH) 102 2017-08-226_04-55-52). La identificación a nivel de especie se realizó con base en el valor de coincidencia.

4.7 Prueba de resistencia/susceptibilidad a antibióticos

4.7.1 Activación de la cepa bacteriana

Del cepario, se tomaron los dos tubos guardados y se colocaron a temperatura ambiente durante 15-20 minutos para consecuentemente homogenizar las cepas en un vórtex. Después, en campo estéril, se tomó una considerable porción de cada cepa con ayuda del asa de siembra de punta redonda, y se sembró en tubos Eppendorf que contenían 1000 μ L de caldo infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés) (Anexo I). Finalmente, los tubos se agitaron en vórtex y se sometieron a incubación aerobia durante 24 horas a 35 °C. Todo por duplicado.

4.7.2 Ajuste del patrón de turbidez McFarland 0.5

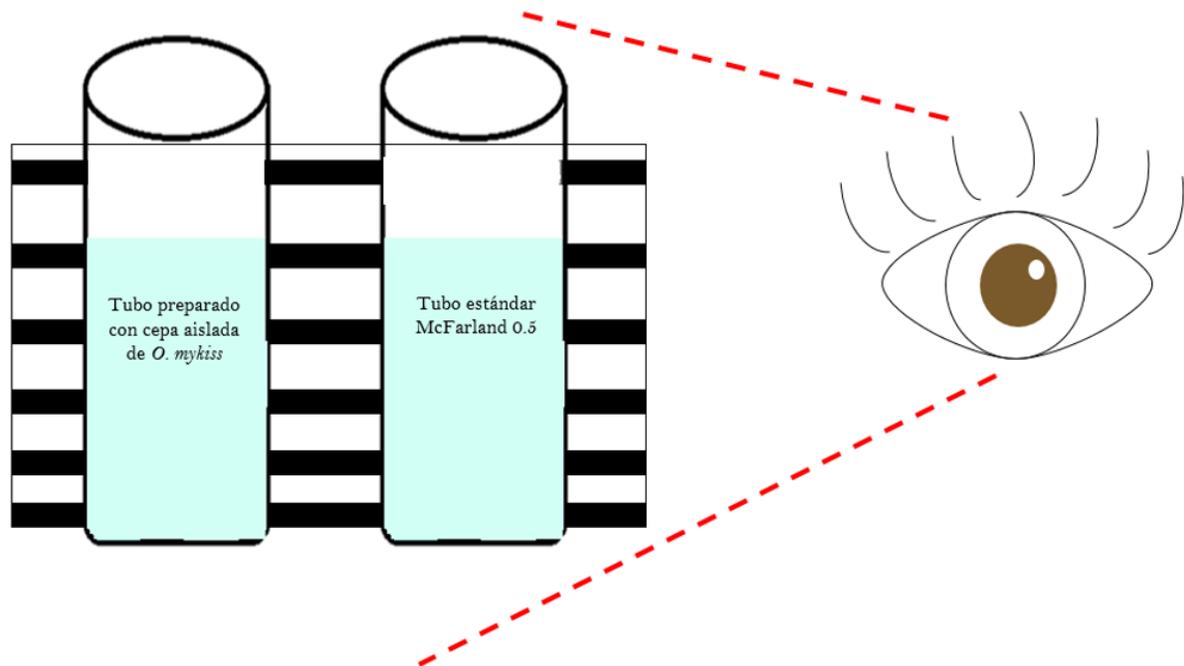
Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el siguiente procedimiento: 1) se centrifugaron los cuatro tubos a 14,000 revoluciones por minuto durante 15 minutos para formar un pellet, 2) en campo estéril se destaparon los tubos para quitar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta, 3) se re suspendieron los pellets en 1000 μ L de solución salina isotónica al 0.4% y se agitaron en vórtex.

A continuación, en cuatro tubos de ensaye previamente esterilizados, se añadieron 2000 μ L de solución salina isotónica al 0.4% + 200 μ L de las bacterias re suspendidas, y se sometieron a agitación en el vórtex.

Finalmente, se comparó la turbidez de los cuatro tubos resultantes con el estándar 0.5 de McFarland (Becton and Dickinson, 2005), a contraluz en un fondo blanco con líneas negras, de acuerdo con lo indicado en su ficha técnica (Figura 8).

Figura 8.

Patrón de turbidez McFarland 0.5



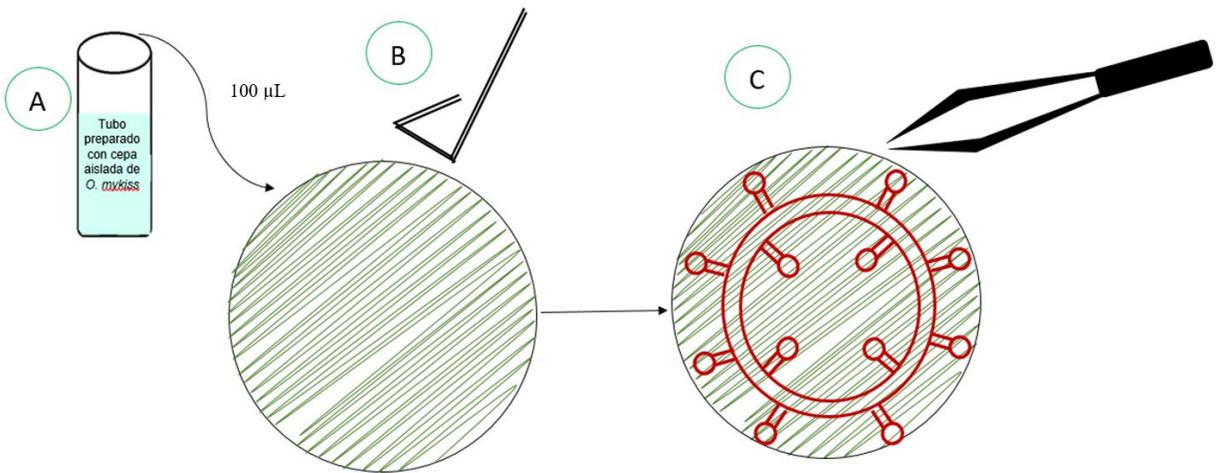
Nota. Para verificar que los tubos preparados coincidan con la densidad bacteriana del estándar 0.5 de McFarland, se posicionan los tubos al mismo tiempo contra un fondo blanco con líneas negras y se compara a simple vista la turbidez. Elaboración propia.

4.7.3 Aplicación de antibiogramas

Se tomaron 100 μL de la concentración bacteriana al 0.5 de McFarland previamente preparada, y con ayuda de un asa de vidrio Drigalski, se sembró mediante la técnica de extensión en placa (García Martos, Fernández del Barrio y Paredes Salido, 1996) en agar Müeller Hinton (Anexo I). Posteriormente, con pinzas esterilizadas se adhirió sobre el agar el sensidisco para Gram negativo de la marca Bio Rad ©, y se posicionaron de forma invertida para incubación a 32 °C durante 18 horas (Figura 9) (metodología modificada del instructivo de uso de Bio Rad).

Figura 9.

Secuencia de aplicación de antibiogramas.



Nota. El paso A indica la toma de concentración bacteriana al 0.5 McFarland. El paso B es la siembra por extensión en placa en agar Müeller Hinton y el paso C se refiere a la colocación del sensidisco para Gram negativo de la marca Bio Rad ©.

Finalmente, los resultados se interpretaron con base en lo indicado en el manual CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Ed. 33 (2023), The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2023) y en el instructivo de uso de Bio Rad (s.f.); tomando como referencia el género *Pseudomonas*.

5. Resultados

5.1 Parámetros fisicoquímicos del agua

Las cifras obtenidas en el análisis fisicoquímico del agua (Tabla 1) son similares uno de otro. La desviación estándar de cada parámetro evaluado indica poca dispersión de dichos datos con respecto al promedio calculado.

Tabla 1.

Parámetros fisicoquímicos registrados in situ durante los tres muestreos realizados en el centro piscícola en estudio.

Fecha de muestreo	Temperatura (°C)	pH	Oxígeno disuelto (mg/L)
01 marzo 2023	17	6.07	6.0
15 marzo 2023	17.2	6.21	6.28
29 marzo 2023	17.4	5.83	6.57
Promedio (\bar{x})	17.2	6.04	6.28
Desviación estándar	0.2	0.19	0.29

5.2 Calidad microbiológica del agua y conteo de UFC

En los medios de cultivo selectivos, agar citrato de Simmons y agar eosina y azul de metileno, de los tres muestreos realizados no se presentó crecimiento bacteriano. Sin embargo, en el agar cuenta estándar, empleado para el conteo de mesófilos aerobios, sí se obtuvieron resultados durante los dos primeros muestreos realizados el día 01 y 15 de dicho mes (Tabla 2).

En el caso del tercer muestreo, el centro piscícola informó que derivado de las condiciones climáticas que se presentaron en la localidad un día antes, los encargados realizaron un cambio completo al agua de los estanques para poder retirar la hojarasca que había quedado atorada tras los fuertes vientos. Esto pudo contribuir a que el crecimiento bacteriano fuera nulo en los tres medios de cultivo empleados.

Tabla 2.

Número total de UFC crecidas en los medios agar cuenta estándar, agar citrato de Simmons y agar eosina y azul de metileno empleados para determinar la calidad microbiológica del agua de los estanques del centro piscícola en estudio.

Fecha de colecta	Número total de UFC/100 μ L de muestra		
	Agar cuenta estándar	Agar citrato de Simmons	Agar eosina y azul de metileno
01 marzo 2023	29x10 ⁵	0	0
15 marzo 2023	25x10 ⁵	0	0
29 marzo 2023	0	0	0
Promedio	27x10 ⁵	-	-

5.3 Análisis microbiológico de *Oncorhynchus mykiss*

La siembra microbiológica en agar *Aeromonas* (Ryan) realizada a partir del ejemplar de *O. mykiss* dio resultados positivos, al tener crecimiento bacteriano tanto en las inoculaciones a partir de escamas como aquellas a partir de excremento.

Tabla 3.

Unidades Formadoras de Colonias (UFC) crecidas en agar *Aeromonas* (Ryan), a partir de muestra de escamas y de excremento del ejemplar juvenil de *O. mykiss*

Caja de Petri	UFC en medio <i>Aeromonas</i> (Ryan)	
	Escamas	Excremento
1	1	58
2	2	66
3	2	No aplica
Promedio		62

Para distinguir las colonias, se les asignó una clave para facilitar su identificación en las pruebas posteriores. A las colonias aisladas a partir de escamas de *O. mykiss* se les asignó el prefijo OM, seguido de un guion y la letra A, B o C, dependiendo del número de la caja Petri en la que crecieron. En el caso de las colonias con características diferentes pero aisladas de la misma caja de Petri, se les asignó un número, empezando por el 1 (revisar claves asignadas en Tabla 4).

Tabla 4.

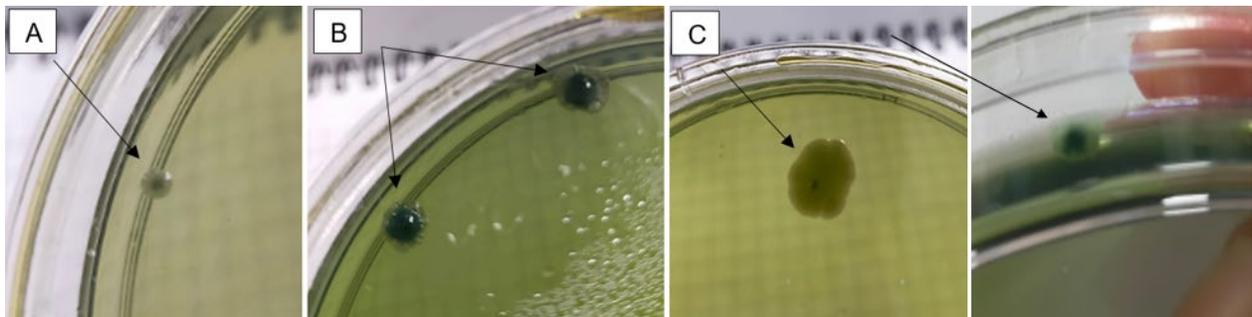
Descripción de las características de las UFC según Ramírez (2020) crecidas en agar Aeromonas (Ryan), inoculado a partir de escamas de la zona troncal del ejemplar de O. mykiss

Siembra a partir de frotis de escamas de <i>O. mykiss</i>				
Número de Caja de Petri	1	2	3	
Clave asignada	OM-A	OM-B	OM-C1	OM-C2
Tamaño	2 mm (mediana)	>3 mm (grande)	>3 mm (grande)	<1 mm (puntiiforme)
Forma	Circular	Irregular	Irregular	Circular
Borde	Entero	Ondulado	Ondulado	Entero
Transparencia	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
Brillo	Sin brillo	Sin brillo	Brillante	Sin brillo
Color	Transparente con centro azul verdoso opaco	Transparente con centro azul/verde opaco	Verde con un pequeño centro negro	Verde claro con centro azul opaco
Textura	Rugosa	Rugosa	Lisa	Rugosa
Elevación	Convexa	Convexa	Plana	Convexa
Consistencia	Mucoide	Mucoide	Mucoide	Mucoide

A pesar de que en los medios inoculados a partir de escamas crecieron pocas colonias bacterianas (Tabla 3), tenían buen tamaño y se diferenciaban claramente la una de la otra. De modo que la descripción de las características coloniales (Tabla 4) y las imágenes obtenidas fueron precisas (Figura 9). Es importante destacar que todas las colonias, a excepción de la OM-C1 (Figura 9, inciso C), presentaban exactamente la misma característica de un centro prominente de color azul opaco. Y, de acuerdo con lo especificado en la ficha técnica del medio *Aeromonas* (Ryan) (Oxoid Limited, 2007), el crecimiento de colonias color azul/gris indica que se trata de *Pseudomonas* sp.

Figura 9.

Colonias bacterianas crecidas en agar Aeromonas (Ryan), a partir de frotis de escamas de ejemplar de O. mykiss.

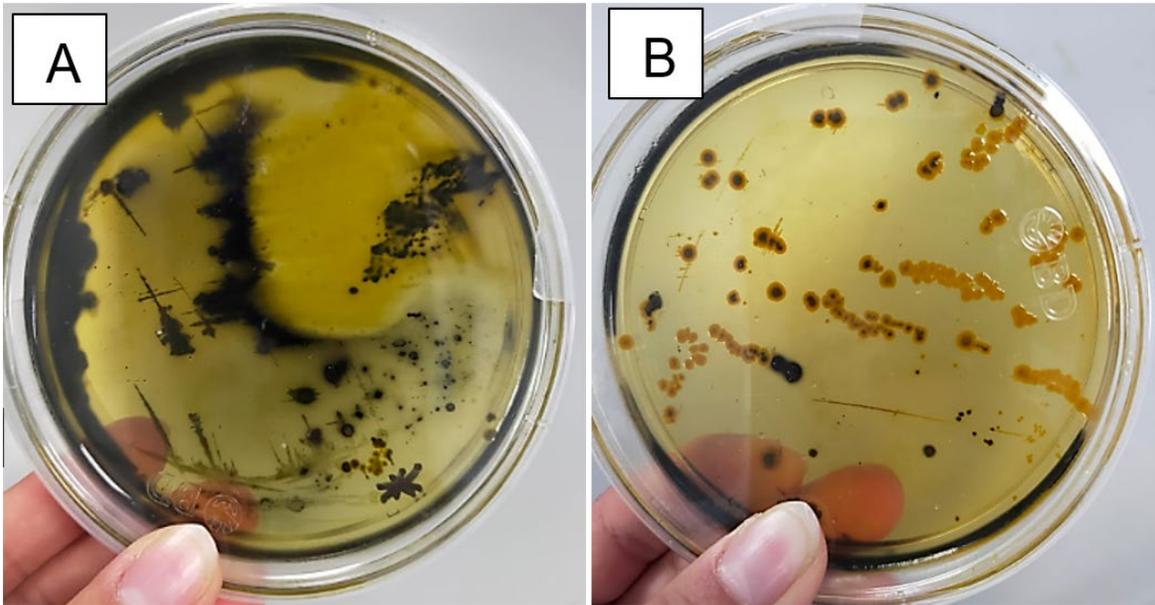


Nota. Resultados en la caja de Petri 1 (A), en la número 2 (B) y en la número 3 (C).

Las colonias bacterianas crecidas a partir de la muestra de excremento presentaron tamaño pequeño, aunque el número de colonias fue abundante (Tabla 3). De manera general, las colonias se asemejaban en tamaño y en presentar una tonalidad naranja/amarilla. Aunque, algunas partes del medio de cultivo se tornaron de color negro y unas cuantas UFC presentaban un centro negro plano. (Figura 10).

Figura 10.

Colonias bacterianas crecidas en agar Aeromonas, a partir de una muestra de excremento del ejemplar juvenil de O. mykiss.



Nota. Resultados en caja de Petri 1 (A) y caja de Petri 2 (B).

Para facilitar la identificación se les asignó una clave a las colonias bacterianas aisladas del excremento con base en los mismos criterios empleados previamente. Para referirse a que la UFC provenía de excremento de *O. mykiss* se les asignó el prefijo EX, seguido de un guion y la letra A o B, dependiendo del número de caja de Petri. Y, finalmente un número, empezando por el 1, en el caso de que en un mismo medio de cultivo se encontrará más de una UFC con características diferentes (revisar etiquetas asignadas en Tabla 5).

Tabla 5.

Descripción de las características coloniales según Ramírez (2020) crecidas en agar Aeromonas (Ryan), inoculado a partir de excremento del ejemplar de *O. mykiss*

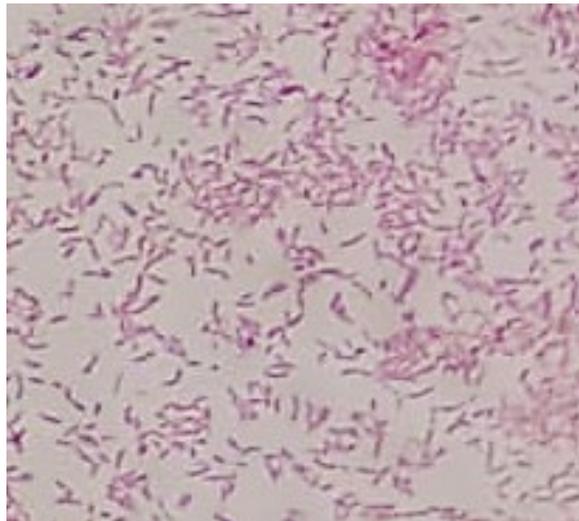
Siembra a partir de excremento de <i>Oncorhynchus mykiss</i>				
Número de Caja de Petri	1	1	2	2
Clave asignada	EX-A1	EX-A2	EX-B1	EX-B2
Tamaño	>3 mm (grande)	>3 mm (grande)	2 mm (mediana)	2 mm (mediana)
Forma	Irregular	Circular	Circular	Circular
Borde	Ondulado	Entero	Entero	Entero
Transparencia	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
Brillo	Sin brillo	Sin brillo	Brillante	Sin brillo
Color	Naranja	Naranja con centro negro	Naranja con centro negro	Naranja
Textura	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Elevación	Plana	Plana	Plana	Plana
Consistencia	Suave	Suave	Mucoide	Mucoide

5.3.1 Tinción de Gram y prueba de la catalasa

De acuerdo a lo observado en microscopio óptico (Figura 11), tanto las UFC aisladas a partir de escamas como aquellas aisladas a partir de excremento de *O. mykiss*, fueron categorizadas como bacilos Gram negativos, por su característico color rosa adquirido después de la tinción.

Figura 11.

Bacilos Gram negativo observados al microscopio a 100X.



Nota. Fotografía propia.

Tabla 6.

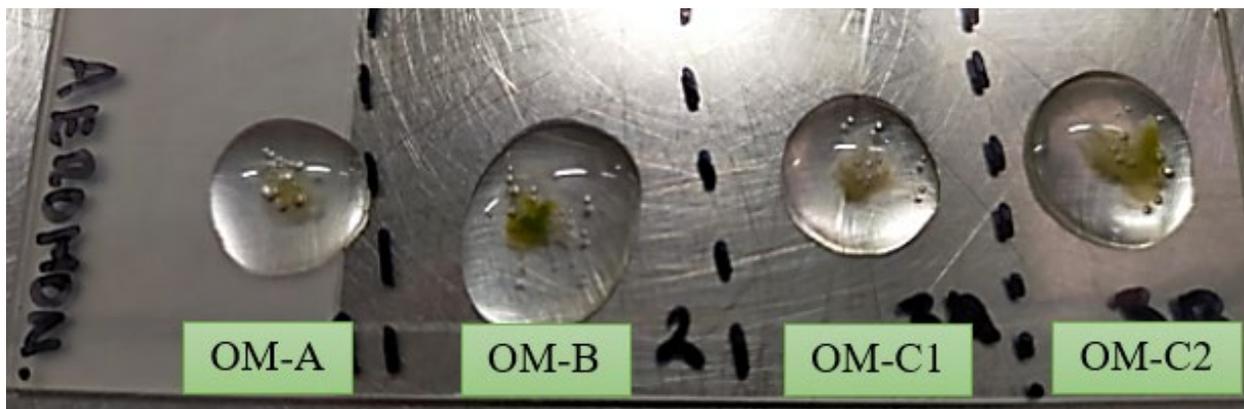
Resultados de la tinción de Gram y de la prueba catalasa aplicada a las UFC aisladas en medio Aeromonas (Ryan) a partir de escamas y de excremento de un ejemplar de O. mykiss

Clave	Tinción de Gram		Prueba de la catalasa
	Gram negativa o Gram positiva	Morfología	Resultado
OM-A	-	Bacilos	-
OM-B	-	Bacilos	-
OM-C1	-	Bacilos	-
OM-C2	-	Cocobacilos	-
EX-A1	-	Bacilos	-
EX-A2	-	Bacilos	-
EX-B1	-	Diplobacilos	-
EX-B2	-	Bacilos	-

En la prueba de la catalasa, todas las UFC aisladas dieron resultado negativo (Tabla 6), al no desprender burbujas que indicaran la liberación de oxígeno. En la Figura 12 y Figura 13 se visualiza la formación de unas burbujas en algunas muestras. Sin embargo, al ser escasas, se consideró como consecuencia del pipeteo y sus residuos de aire, por lo que no se considera catalasa retardada ni resultado positivo.

Figura 12.

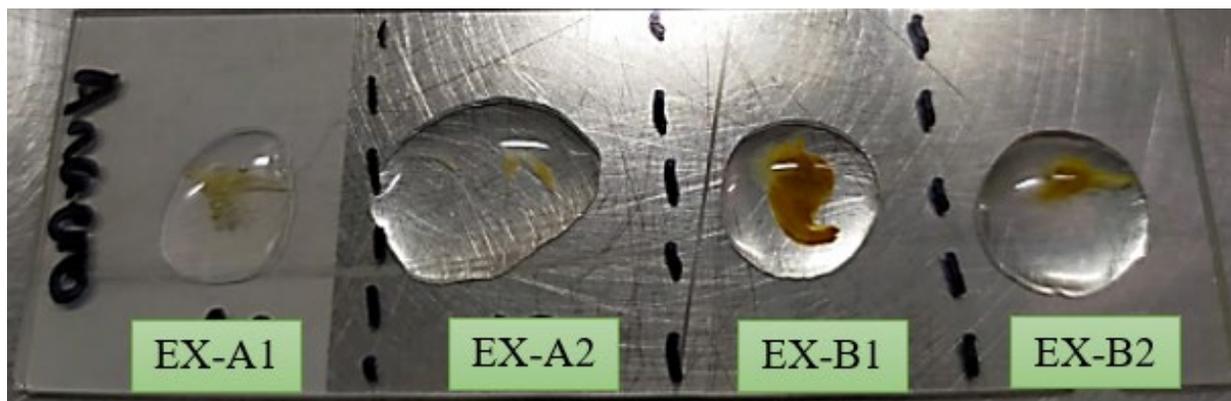
*Resultado de la prueba de la catalasa aplicada a las bacterias aisladas a partir de escamas de *O. mykiss*.*



Nota. Fotografía propia.

Figura 13.

*Resultado de la prueba de la catalasa aplicada a las bacterias aisladas a partir de excremento de *O. mykiss*.*



Nota. Fotografía propia.

5.4 Identificación mediante MALDI-TOF

Las características coloniales y la tinción de Gram coinciden con la descripción del género *Pseudomonas*. Sin embargo, el resultado negativo a la prueba de la catalasa no coincide con lo indicado para este género. Por lo que, el análisis molecular mediante espectrometría de masas MALDI-TOF sirvió no solamente para corroborar si se aislaron cepas de *Pseudomonas*, sino que también proporcionó una identificación taxonómica hasta nivel de especie.

Los resultados indican que las dos muestras aisladas a partir de escamas de *O. mykiss* son la misma especie; *Pseudomonas stutzeri* (Tabla 7).

Tabla 7.

Resultados de identificación de bacterias aisladas de O. mykiss mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Clave	Patrón concordante	Valor de puntuación	Código NCBI
OM-A	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.27	316
OM-A	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.31	316
OM-B	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.14	316
OM-B	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.03	316

Nota. El valor de puntuación se basa en el nivel de confianza de la identificación, siendo los valores 2.00-3.00 como “alta confianza”, 1.70-1.99 “baja confianza” y 0.00-1.69 “sin identificación posible”

5.5 Prueba de resistencia/susceptibilidad a antibióticos

Los resultados de la prueba de resistencia/susceptibilidad a antibióticos (Tabla 8) indican que la OM-A presenta alta resistencia a dos antibióticos: cefotaxima y carbenicilina. Mientras que OM-B presenta una alta resistencia a cefotaxima y una resistencia intermedia a la carbenicilina.

De los demás antibióticos que sí son empleados en los manuales para el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas*, OM-A y OM-B fueron susceptibles a ceftriaxona, netilmicina y amikacina.

Tabla 8.

Resultados de la prueba de resistencia/susceptibilidad a antibióticos mediante la aplicación de multidiscos

Bio Rad © para las cepas aisladas e identificadas como *Pseudomonas stutzeri*.

Antibiótico	Dosis (µg) en el disco	Punto de quiebre de la zona de difusión (mm)		Diámetro del halo de inhibición (mm)				Resultado
		Sensible	Resistente	OM-A	OM-A	OM-B	OM-B	
Nitrofurantoína (NF)	300	IE**	IE**	10	8	12	8	No aplica
Cefalotina (CF)	30	IE**	IE**	6	6	6	6	No aplica
Ampicilina (AM)	10	IE**	IE**	6	8	8	8	No aplica
Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT)	25	IE**	IE**	6	6	6	6	No aplica
Cefotaxima (CTX)	30	≥18*	≤14*	CBA	10	8	8	Resistente
Cloranfenicol (CL)	30	IE**	IE**	12	12	14	10	No aplica
Carbenicilina (CB)	100	≥17***	≤13***	12	8	16	14	Resistente
Ceftriaxona (CRO)	30	≥18*	≤14*	12	CBA	CBA	CBA	Susceptible
Netilmicina (NET)	30	≥15*	≤12*	CBA	CBA	CBA	CBA	Susceptible
Pefloxacina (PEF)	5	Sin datos	Sin datos	CBA	CBA	18	16	No aplica
Amikacina (AK)	30	≥17*	≤14*	CBA	CBA	CBA	CBA	Susceptible
Gentamicina (GE)	10	IE**	IE**	CBA	CBA	CBA	CBA	No aplica

Nota. Los parámetros para considerarlas como susceptible o resistente al antibiótico se tomaron de los manuales: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Ed. 33 (*), The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (**), y en el instructivo de uso de Bio Rad (***). La simbología “IE” se refiere a que el antibiótico no es adecuado para el tratamiento sistemático de las infecciones causadas por *Pseudomonas*. La abreviación “CBA” se refiere a que no hubo crecimiento bacteriano en el medio Müller -Hinton.

6. Discusión

En el presente trabajo se logró aislar a partir de un ejemplar de *Oncorhynchus mykiss* bacterias patógeno oportunistas pertenecientes a la especie *Pseudomonas stutzeri*, las cuales presentaron resistencia a antibióticos. Conjuntamente se registraron datos de las variables fisicoquímicas (temperatura, pH y oxígeno disuelto en agua), y agentes biológicos (presencia de mesófilos aerobios) que determinan la calidad del agua.

De acuerdo con Olivo-Gutiérrez *et al.* (2018), los parámetros fisicoquímicos más importantes a monitorear en un sistema acuícola son temperatura, oxígeno disuelto (OD), potencial de hidrógeno (pH) y salinidad, ya que éstos afectan directamente la salud del animal y su tasa de crecimiento.

Respecto con la temperatura, el valor medio en los muestreos fue de 17.2 °C, por lo que se consideran valores constantes en la presente investigación (Tabla I). Por consiguiente, a través del cotejo de los datos obtenidos con la literatura se revisó si esos valores eran óptimos para *O. mykiss*.

De acuerdo con lo indicado por el Instituto Nacional de Pesca (2018), el rango óptimo para esta especie va desde los 9 °C a 17 °C. Sin embargo, autores como Acosta, Devezé y Méndez (2018) mencionan que el rango óptimo es mucho más amplio, reportando un intervalo desde los 7 °C hasta los 22 °C. En cualquiera de los casos, los datos registrados durante los muestreos se posicionan dentro de los rangos propuestos en la literatura.

En cuanto a los valores obtenidos de pH, el promedio fue de 6.04 (Tabla I), lo que indica un medio ácido para los peces en cultivo. En la literatura se indica que cada especie posee intervalos específicos y óptimos para su desarrollo (Briones-Pérez *et al.*, 2017). No obstante, para esta variable se encontraron rangos diferentes reportados de acuerdo con varias autoridades en materia acuícola.

De acuerdo a lo indicado por el Instituto Nacional de Pesca (2018) cuyo público objetivo son acuicultores en México, se indica un intervalo óptimo de pH de entre 4.5 a 10. Mientras que, para la FAO (2023), cuyo público objetivo son los acuicultores de diferentes países, el intervalo óptimo es mucho más reducido y se debe posicionar entre 6.5 y 8.5.

Claramente existe una gran diferencia entre ambos rangos propuestos por las autoridades en materia acuícola. Sin embargo, Campos-Solano y Lewis-Brenes (2006) indican que un pH menor a 6 debe evitarse ya que produce irritación en las branquias y pérdida de la capacidad de absorción de oxígeno. Asimismo, de acuerdo a Kubitza (2017), los estanques que presentan un pH extremo, ya sea alcalino o ácido, producen depresión de la actividad alimentaria, reduce el crecimiento, y deprime el sistema inmune de los ejemplares cultivados.

En el caso del oxígeno disuelto (OD) en agua, los valores fueron constantes durante los muestreos; manteniéndose un intervalo de 6.0 a 6.57 mg/L (Tabla I). De acuerdo con el Instituto Nacional de Pesca (2018) el OD mínimo debe ser de 5 mg/L. Sin embargo, otros autores como Sierra-Gómez y Molina (2019) indican que específicamente *O. mykiss* es una especie que posee muchas ventajas como resistencia a la manipulación, tolerancia a diversos ambientes y rápido crecimiento, pero tiene un aspecto difícil de controlar; presenta un alto requerimiento de oxígeno, con un rango

óptimo de 8-10 mg/L. Lo que concuerda con lo propuesto por Mohan *et al.* (2021), quien menciona que, si los niveles de OD no son los adecuados, los peces son más propensos a enfermedades e infecciones, son menos eficientes para asimilar el alimento, y experimentan un crecimiento estancado.

En cuanto al análisis microbiológico, se obtuvo crecimiento de un solo grupo de interés, el de las bacterias mesófilas aerobias, cuyas características les permiten habitar en condiciones similares (pH, temperatura, nutrientes, etc.) a los de otros agentes patógenos, pero son más económicas y fáciles de detectar (Valenzuela-Armenta *et al.*, 2018), lo que las convierte en excelentes indicadores.

En México, es particularmente difícil estimar o calificar como “buena” o “mala” la calidad microbiológica del agua empleada en el mantenimiento de los estanques de los peces, debido a la falta de Normas Oficiales Mexicanas que sean específicas en cuanto a los límites permisibles; observación que también ha sido mencionada en el trabajo de Valenzuela-Armenta *et al.* (2018).

De parte de autoridades competentes en el sector, solamente se ha publicado un borrador del manual de buenas prácticas acuícolas durante la producción primaria de peces emitido por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (2019), donde se establece que, el límite permisible en 100 mL de agua, debe ser “ausente” o “no detectables” para organismos coliformes totales, *E.coli*, coliformes fecales u organismos termotolerantes; de acuerdo con la NOM-127-SSA1-1994 que establece los límites permisibles de calidad y tratamientos para el agua de uso y consumo humano. Lo que indica que solamente se está tomando en cuenta la calidad que debe tener el agua para poder ser empleada en el centro piscícola, sin embargo, no existen datos oficiales que indiquen la calidad microbiológica ideal del agua de los estanques cuando ya ha entrado en contacto con los peces y que se utiliza durante el proceso de su cultivo.

Derivado de dicha situación, autores como Serrano-Heredia *et al.* (2023) y Valenzuela-Armenta *et al.* (2018), han enfocado sus trabajos en comparar el conteo de UFC/mL de mesófilas aerobias entre muestras tomadas al inicio y al final del sistema de agua. En donde se menciona que el agua de salida del sistema, contiene más bacterias mesófilas debido a que ya estuvo en contacto directo con los peces y sus desechos.

Por ende, para tener un mejor panorama de la carga de bacterias mesófilas aerobias del centro piscícola en estudio, se compararon los datos registrados en la presente investigación con los registrados por Valenzuela-Armenta *et al.* (2018) referentes al agua de salida del sistema. Y, se encontró que los valores registrados en el presente estudio, son considerablemente mayores en comparación con lo registrado por dicho autor. La cifra más alta que registró Valenzuela-Armenta *et al.* (2018) fue de 1901 UFC/100µL, mientras que la más alta registrada en el presente estudio es de 29×10^5 UFC/100µL.

Por otro lado, en cuanto al análisis microbiológico del ejemplar de *O. mykiss*, se observó que las características coloniales de las UFC registradas a partir de excremento (Tabla 5), no coinciden con lo descrito para las especies enlistadas en el control de calidad del medio *Aeromonas* (Ryan) (Oxoid Limited, 2007). Derivado de esto, es importante resaltar que, aunque es un medio selectivo

para *Aeromonas*, la ficha técnica indica que también pueden crecer *Pseudomonas* spp., *Plesiomonas* spp. y otras *Enterobacteriaceae* comunes.

En algunas partes del medio de cultivo se observó ennegrecimiento, así como un cambio en la coloración general, de verde a verde-amarillo. Ese sutil cambio de coloración se aprecia mejor si se compara el medio *Aeromonas* que no sufrió cambios con la inoculación de escamas de *O. mykiss* (Figura 9) con el medio *Aeromonas* donde se inoculó excremento (Figura 10). Dicho efecto se considera importante en cuanto a que las sustancias que son utilizadas en la preparación del medio de cultivo, así como las propiedades fisicoquímicas de los azúcares, las proteínas, y los indicadores, revelan el comportamiento de las bacterias aisladas (Caycedo-Lozano, Corrales-Ramírez y Trujillo-Suárez, 2021).

La aparición de una tonalidad negra ha sido contemplada en otros medios de cultivo, a razón de los diferentes componentes del medio. Tal es el caso del agar sulfito bismuto (Condalab, 2019), el agar Hierro Kligler (Laboratorios Britania, 2021), y del agar xilosa-lisina-desoxicolato (Valtek Diagnostics, 2021), en donde la presencia de un precipitado negro indica la producción de ácido sulfhídrico (H₂S).

Las bacterias que producen H₂S obtienen su energía reduciendo diferentes compuestos que poseen azufre en su molécula, incluyendo compuestos orgánicos e inorgánicos con azufre oxidado (Instituto Valenciano de Microbiología, 2018). En el caso del agar *Aeromonas* (Ryan), el tiosulfato de sodio proporciona el azufre y el citrato férrico de amonio es el indicador de la producción de H₂S, que se ve a simple vista con la aparición de un precipitado negro. Adicionalmente, el medio posee otros dos indicadores, azul de bromotimol y azul de timol, que cambian su color a amarillo cuando se detecta la presencia del ácido sulfhídrico; lo que permite explicar el cambio general en tonalidad del medio de cultivo (Condalab, 2022).

Una identificación más específica de las colonias crecidas en el medio resulta difícil sin un análisis molecular, pues en las fuentes de información se indica que las bacterias productoras de H₂S comprenden un grupo bastante amplio y heterogéneo. Sin embargo, aquellas denominadas como bacterias reductoras de sulfato son las que poseen características más similares en cuanto a lo obtenido en laboratorio (Instituto Valenciano de Microbiología, 2018).

Las bacterias reductoras de sulfato son un grupo anaeróbico diverso que está ampliamente distribuido en la naturaleza, por su gran adaptabilidad a diferentes temperaturas, encontrándose en entornos acuáticos y en terrestres. Abarca alrededor de 40 géneros, principalmente de la subclase y phylum *Proteobacteria* y tres Gram positivos esporulantes del grupo *Bacillus-Clostridium* del phylum *Bacillota* y varios géneros bacterianos termófilos Gram negativos (Kushkevych *et al.*, 2021).

Respecto a los resultados obtenidos del aislamiento de bacterias a partir de las escamas de *O. mykiss*, se destaca el aislamiento de microorganismos pertenecientes a la especie *Pseudomonas stutzeri*. Con esto se destaca la importancia del continuo monitoreo de patógenos en los centros piscícolas, ya que esta cepa bacteriana no había sido reportada anteriormente por autoridades mexicanas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022).

La especie *P. stutzeri* ha sido poco estudiada respecto a su grado y alcance de patogenicidad pues, aunque cuentan con amplia distribución ambiental -principalmente habita en suelo y agua- están involucradas en procesos de nitrificación, desnitrificación y degradación de contaminantes ambientales (Diep *et al.*, 2009).

Su papel como patógeno oportunista en humanos toma relevancia a partir de su aislamiento en una muestra de fluido espinal humano. Subsiguientemente fue reportada como causante de osteomielitis, artritis, endocarditis, meningitis, neumonía, infecciones de piel, de ojos, y de vías urinarias (Park *et al.*, 2013).

Sin embargo, se ha reportado que *P. stutzeri* tiene un grado relativamente bajo de virulencia, y que los pacientes infectados por esta bacteria tenían uno o más de los siguientes factores de riesgo predisponentes: enfermedad subyacente, cirugía previa, traumatismo o infección cutánea previos y/o inmunodepresión (Lalucat *et al.*, 2006).

De su aislamiento en organismos acuáticos, se ha reportado en peces como la tilapia, pez azul, carpa, pez dorado y bagre, en estudios orientados a la caracterización de la microbiota bacteriana (González-Díaz *et al.*, 2020) y estudios enfocados a patogenicidad en peces de ornato (Emam, Haridy y Hossam, 2022).

Dichos estudios sobre *P. stutzeri* han proporcionado información relevante para el sector acuícola de comercio; ya que *P. stutzeri* en caso de ser aislada a partir de la matriz ambiental agua, se puede encontrar tanto en temporadas secas como en las húmedas (González-Díaz *et al.*, 2020). En el caso de tilapias y bagres, ya se han reportado brotes de esta bacteria en Egipto; en cuyo caso le permitió ser clasificada como patógeno oportunista que, cuando infecta a los peces, provoca síntomas como alteraciones en las escamas, hemorragias y congestión hepática (Emam, Haridy y Ahmed, 2022).

En cuanto a los resultados de la resistencia antimicrobiana, las cepas de *P. stutzeri* presentaron resistencia a dos antibióticos: cefotaxima y carbenicilina. En la literatura se ha documentado un incremento en la resistencia a estos agentes antimicrobianos, asociado a su uso en la acuicultura, lo que puede causar riesgos a la salud humana (Gormaz *et al.*, 2014).

Ambos antibióticos pertenecen a la familia de los betalactámicos. La familia se caracteriza por la presencia de un anillo betalactámico - anillo tiazolidínico en el caso de la carbenicilina y anillo dihidroiacínico en el caso de la cefotaxima- (Suárez y Gudiol, 2009). Básicamente su mecanismo de acción es similar, ya que ambos inhiben selectivamente diferentes pasos de la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana, la cual le confiere forma y rigidez a casi todas las bacterias de importancia médica (Lozano-Valdés *et al.*, 1998).

Específicamente la cefotaxima es una cefalosporina de tercera generación con un espectro amplio de actividad. En tanto que la carbenicilina es parte de las penicilinas que son activas frente a enterobacterias como *Pseudomonas*. Pero, la eficacia de ambos antibióticos se ha visto disminuida con el surgimiento de bacterias multirresistentes (Suárez y Gudiol, 2009).

Autores como Park *et al.* (2013) discuten que *P. stutzeri* a pesar de pertenecer al ampliamente estudiado género *Pseudomonas*, no es frecuente de aislar de ambientes clínicos, lo que reduce su exposición y evolución frente a los antibióticos.

No obstante, a través de los años se han realizado algunas pruebas de susceptibilidad para esta especie bacteriana. Desde un principio, entre los antibióticos testados, se había encontrado que era “susceptible” a las penicilinas con efecto anti *pseudomonas* y a las cefalosporinas de tercera generación (Noble y Overman, 1994). Hasta ahora dichos estudios habían mantenido resultados constantes, donde *P. stutzeri* se presentaba como “susceptible” a la carbenicilina y a la cefotaxima (Lalucat *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2013).

El hecho de que ahora sean “resistentes” para dichos antibióticos no resulta extraño o nuevo para esta especie bacteriana. Pues, específicamente se le ha relacionado con al menos dos mecanismos de resistencia a los antibióticos: 1) alteraciones en las proteínas de la membrana externa y los perfiles de lipopolisacáridos y 2) la presencia de betalactamasas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro (Lalucat *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2013).

Finalmente, cabe mencionar que frecuentemente en la literatura se discute que, para minimizar el incremento de la resistencia a antibióticos derivado de su uso en la acuicultura, se debe disminuir su uso, deben ser usadas solamente bajo la supervisión de un veterinario, y se recomienda que exista una regulación por parte de las agencias gubernamentales apropiadas. Así como invertir en investigación que permita entender las causas y epidemiología de las enfermedades que afectan a los peces, para reducir la necesidad del uso de estos compuestos (Gormaz *et al.*, 2014).

7. Conclusiones

La calidad del agua de los estanques del centro piscícola de este estudio no es la óptima para el cultivo de trucha arcoíris.

La evaluación de factores fisicoquímicos resaltó la importancia del control de pH y de oxígeno disuelto en agua de los estanques de peces, particularmente en cultivos de *Oncorhynchus mykiss*, pues no mantener los niveles recomendados, vuelve más susceptible el sistema inmunológico de los peces, dando oportunidad a la proliferación de patógenos que enferman a las truchas cultivadas.

No se lograron aislar bacterias en dos de los tres medios empleados; los medios citrato de Simmons (ACS) y eosina azul de metileno (EAM) dieron resultados negativos. Sin embargo, los valores proporcionados por el crecimiento de mesófilos aerobios en el agar cuenta estándar (ACS) fueron significativamente altos en comparación con aquellos registrados en la literatura.

Los altos valores de UFC parecían indicar un manejo deficiente de la salubridad de los estanques de los peces. Sin embargo, no se puede concluir de manera contundente que sea el caso del centro piscícola de este estudio. Ya que la revisión bibliográfica resaltó una de las áreas de oportunidad del sector de producción acuícola: la falta de Normas Oficiales Mexicanas que establezcan los límites permisibles que se deben mantener una vez que el agua entra en contacto con los peces y que se utiliza durante su mantenimiento.

Mediante el uso de medios de cultivo selectivos y confirmación molecular mediante la técnica de MALDI-TOF se registraron por primera vez en el sector acuícola de México cepas de *Pseudomonas stutzeri* aisladas a partir de un ejemplar de *Oncorhynchus mykiss*. Dichas cepas resultaron ser resistentes a dos antibióticos: cefotaxima y carbenicilina.

Los resultados obtenidos recalcan la necesidad de un constante monitoreo de los patógenos en los centros piscícolas, pues la detección y correcta identificación de las bacterias permite acciones rápidas y eficientes para controlar las enfermedades producidas en peces.

8. Perspectivas

El análisis conjunto, tanto de la calidad del agua como de *O. mykiss*, permitió tener un mejor panorama de la aparición de la enfermedad en el cultivo acuícola. De acuerdo a la literatura, los valores registrados de pH y de OD del agua, pudieron influir en la aparición de enfermedad en los peces, al comprometer su sistema inmunológico.

Si bien no se pudo determinar oficialmente la “calidad” del agua por falta de Normas Mexicanas en cuanto al aspecto microbiológico (mesófilas aerobias), se entiende que el manejo del centro piscícola no era el óptimo.

La presencia de *P. stutzeri* denota la importancia de los monitoreos en el centro piscícola, pues al ser una bacteria con potencial zoonótico podría significar un riesgo potencial a la salud humana. Particularmente las personas que trabajan directamente en el mantenimiento de los peces, podrían verse afectadas, al ser quienes están más propensos a una infección por las vías cutáneas o mediante ingesta accidental de mucosidades o heces de las truchas.

Además, las pruebas de resistencia/susceptibilidad a antibióticos resaltaron otra preocupación actual. Ya que incluso en una matriz ambiental no clínica, se encontró resistencia hacia ciertos antibióticos de parte de *P. stutzeri*

9. Bibliografía

- Acosta-Jimeno J., Devezé-Murillo P. y Méndez-Guerrero J. (2018). Variabilidad intraespecífica de la temperatura óptima reportada para el cultivo de peces dulceacuícolas en fase de engorda. *Ciencia pesquera* 26 (1). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/417179/8_CP_26_1_mayo_2018_Acosta-Jimeno_et_al_cultivo_peces.pdf
- Álcantara Jauregui, F. M., Valladares Carranza, B., & Ortega, S. C. (2022). Enfermedades bacterianas y sus agentes etiológicos identificados en peces de México. *MVZ Córdoba*, 27(2), 23. doi:<https://doi.org/10.21897/rmvz.2387>
- Anderson Mike (2014). *Female Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss* [Fotografía]. Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Female_Rainbow_Trout_in_hand.JPG
- Becton and Dickinson (2005). *Patrón de turbidez BBL preparado: Ficha técnica*. Recuperado de: [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)_es.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf)
- Bio Rad (s.f.). Instructivo de uso: Multidiscos Gram negativo Cat. 71080180. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/521340506/Multidiscos-Instructivo>
- Blaize J., Suter E. y Corbo C. (2022). *Diluciones en serie y enchapado: enumeración microbiana*. JoVE Science Education Database <https://www.jove.com/es/v/10507/serial-dilutions-and-plating-microbial-enumeration>
- Bou G., Fernández Olmos A., García C., Sáez Nieto J. A. y Valdezate S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Bioanálisis*, vol. 1 (46), pp. 22-34.
- Brenner J. D., Krieg R. N., Staley T. J., Garrity M. G., Boone R. D., Vos F., Goodfellow M., Rainey A. F. y Schleifer K. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2da ed., Vol. 2). Springer-Verlag US. <https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7>
- Briones-Pérez E., Hernández-Acosta E., Leal-Mendoza A. I. y Calvario-Rivera C. I. (2017). La calidad del agua en diferentes unidades de producción acuícola de Tlaxcala, México. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, vol. 4., no. 5, pp. 40-48. <http://www.reibci.org/publicados/2017/oct/2500108.pdf>
- Bruker (2023.) *Guía rápida MALDI Biotyper 3.1*. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/632680937/Manual-Maldi-Biotyper-3-1-ver-2-Copy>
- Campos-Solano Guillermo y Lewis-Brenes José (2006). *Cultivando la trucha arcoíris, otros usos de la tierra para el desarrollo rural*. Anta Asociación. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. Recuperado de: <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/AV-0845.pdf>
- Carrasco F., J, Millas O., P, Santelices S., C y Castro F., J. (2020). Identificación de microorganismos. *Chillan: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, no. 428. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/67169>
- Casasola Bado M. J. (2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Rev. Colegio de Microb. Quím. Clín. De Costa Rica*, vol. 27 (2).

<https://revista.microbiologos.cr/wp-content/uploads/2023/11/Volumen-27-No2-Articulo-3-89-98.pdf>

- Caycedo-Lozano Liliana, Corrales-Ramírez Lucía Constanza, y Trujillo-Suárez Diana Marcela. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49-94. Epub January 17, 2021. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 33rd ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-170-3 [Print]; ISBN 978-1-68440-171-0 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2023
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (2022). *Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2021*. Recuperado de: <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- Condalab. (2019). *Agar Bismuto Sulfito (Wilson Blair) USP: Ficha técnica*. Recuperado de: https://www.condalab.com/medios-de-cultivo-deshidratados/1512-14815-agar-bismuto-sulfito-wilson-blair-usp.html#/2-formato-500_g
- Condalab. (2022). *Base de Agar para Aeromonas (Ryan): Ficha técnica*. <https://www.condalab.com/medios-de-cultivo-deshidratados/1121-15138-base-de-agar-para-aeromonas-ryan.html>
- Diep C. N., My Cam P., Vung N. H., Lai T. T., Xuan My N. T. (2009). Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment. *Bioresource Technology* 100, pp. 3791. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.021
- Emam A. M., Haridy M. y Ahmed N. H. (2022). Pathogenicity of newly emerged bacterial pathogens. *Pseudomonas stutzeri* and *P. oleovorans*, in the Red Sea seabrem *Dilodus noct.* *Egyptian Journal of Aquatic Research* 48, pp. 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2022.02.001>
- FAO (2024). *Oncorhynchus mykiss*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Cowx, I. G. División de Pesca y Acuicultura [en línea]. Roma. Recuperado de: https://www.fao.org/fishery/es/culturedspecies/oncorhynchus_mykiss_es/es
- FAO. (2022). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul*. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- FAO. (2023). *Oncorhynchus mykiss*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Cowx, I. G. División de Pesca y Acuicultura [en línea]. Roma. Recuperado de: https://www.fao.org/fishery/es/culturedspecies/oncorhynchus_mykiss_es/es
- Flores B., González N., Bravo A., Mora-Sánchez B., Torres D., Jirón W., Sheleby-Elías J., y Balcázar J. L. (2021). Identificación de bacterias patógenas en peces capturados en el Pacífico frente a Nicaragua. *Ciencias marinas*, 47(3), 175-184. Epub 09 de diciembre de 2022. <https://doi.org/10.7773/cm.v47i3.3212>
- García Martos, P., Fernández del Barrio, M. T., Paredes Salido, F. (1996). *Microbiología clínica aplicada*. España: Díaz de Santos.
- García Medel, D. (2022). Seguridad alimentaria: retos y desafíos de la acuicultura en México. *Journal of Behavior and Feeding*, 2(2), 10-19. Obtenido de: <http://www.jbf.cusur.udg.mx/index.php/JBF/article/view/31/19>

- García Patricia, Allende Fidel, Legarraga Paulette, Huilcaman Marcos, y Solari Sandra. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista chilena de infectología*, 29(3), 263-272. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000300003>
- García-Tinajero, R. y Córdoba-Ponce R. (1988). *Manual ilustrado para laboratorio de bacteriología y micología veterinaria*. Red Interamericana de laboratorios de salud animal. Recuperado de: https://www.google.com.mx/books/edition/Manual_Ilustrado_Para_Laboratorio_de_Bac/RbEqAAAAYAAJ?hl=es&gbpv=1
- Gil Marielsa (12 de junio de 2023). *Agar cuenta estándar*. Lifeder. <https://www.lifeder.com/agar-cuenta-estandar/>
- Giono-Cerezo, Silvia, Santos-Preciado, José I., Rayo Morfín-Otero, María del, Torres-López, Francisco J., y Alcántar-Curiel, María Dolores. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*, 156(2), 172-180. Epub 26 de mayo de 2021. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
- Gobernado Miguel y López Hontangas JL. (2003). Identificación bacteriana. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, vol. 21 (S2), pp. 54-60. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-13059086>
- Gómez Márquez J. L., Peña Mendoza B., Guzmán Santiago J. L. y Trejo Albarrán R. (2023). Modelos de cultivo en acuicultura y su importancia alimenticia. En Atena (Ed.), *Ciencia agrarias: Debates emblemáticos y situación actual* (pp. 180-200). Editorial Atena.
- González-Díaz R. L., Mercado-Silva N., Reynaga-Delgado E. y Martínez-Rivera L. M. (2020). Bacterial microbiota from wild freshwater fish utilized for subsistence in western Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 36 (1), pp. 215-222. DOI: 10.20937/RICA.2020.36.53432
- Gormaz, J. G., Fry, J. P., Erazo, M., & Love, D. C. (2014). Public Health Perspectives on Aquaculture. *Current environmental health reports*, 1(3), 227–238. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0018-8>
- Gutiérrez-Jiménez, Javier, Luna-Cazás, Lorena Mercedes, Mendoza-Orozco, Mónica Ivonne, Díaz-Marina, Gabriela de Jesús, Burguete-Gutiérrez, Julio César, & Feliciano-Guzmán, José Manuel. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 95-102. Recuperado en 11 de noviembre de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000200007&lng=es&tlng=es
- HANNA Instruments (2015). HI 9147N Medidor de Oxígeno disuelto y temperatura. Recuperado de: https://www.hannainst.es/parametros/4606-medidor-oxigeno-disuelto-portatil-od-saturacion-o2-temperatura-con-sonda-galvanica.html#/500-cable_m-4m
- Hervé E. Beatrice (2015). Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, vol. 26 (6), pp. 753-763. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864015001510#sec0020>

- Instituto Nacional de Pesca (2018, 21 de marzo). Acuicultura Trucha arcoíris. Acciones y programas. Consultado el 27 de septiembre del 2024. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-trucha-arcoiris>
- Instituto Valenciano de Microbiología. (15 de abril del 2018). *Bacterias de azufre – productoras de H₂S- (reductoras de sulfato, reductoras de sulfito, reductoras de azufre, y otras moléculas con azufre) – Cultivo cualitativo y cuantitativo; Identificación molecular (PCR y secuenciación); Diagnóstico molecular.* IVAMI. <https://www.ivami.com/es/microbiologia-de-alimentos/5444-bacterias-productoras-de-h2s-reductoras-de-sulfato-reductoras-de-sulfito-reductoras-de-azufre-y-otras-moleculas-con-azufre-cultivo-cualitativo-y-cuantitativo-e-identificacion-molecular>
- Irshath, A. A., Rajan, A. P., Vimal, S., Prabhakaran, V. S., y Ganesan, R. (2023). Bacterial Pathogenesis in Various Fish Diseases: Recent Advances and Specific Challenges in Vaccine Development. *Vaccines*, 11(2), 470. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020470>
- Kubitz F. (2017, 23 de enero). Es importante mantener niveles de acidez deseables en estanques acuícolas. *Global Seafood Alliance*. Consultado el 05 de diciembre del 2023. <https://www.globalseafood.org/advocate/el-parametro-de-calidad-del-agua-a-menudo-ignorado-ph/>
- Kushkevych, I., Hýžová, B., Vítězová, M., y Rittmann, S. K. R. (2021). Microscopic Methods for Identification of Sulfate-Reducing Bacteria from Various Habitats. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4007. <https://doi.org/10.3390/ijms22084007>
- Laboratorios Britania. (2021). *Kliger Hierro Agar: Ficha técnica*. Recuperado de: https://www.britaniyalab.com/back/public/upload/productos/upl_60706c3393e51.pdf
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., & Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR, 70(2), 510–547. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00047-05>
- López-Jácome L. E., Hernández-Durán M., Colín-Castro C. A., Ortega-Peña S., Cerón-González G. y Franco-Cendejas R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, vol. 3 (1), 10-18 pp.
- Lowry Toby y Smith Stephen (2007). Aquatic zoonoses associated with food, bait, ornamental, and tropical fish. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 231 (6). <https://doi.org/10.2460/javma.231.6.876>
- Lozano Váldez D., Larrondo Muguercia H., Herrera Torres M. L., Rivero Arias E., Zamora Marín R. y Araújo Praderes L. J. (1998). Penicilinas. *Acta Médica* 8 (1), pp. 29-39. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/06/20292/penicilinas.pdf>
- Medina, A. (2020). México invierte 2.5% del PIB en Salud, cuando lo ideal sería 6% (o más): OPS. *Revista Forbes*. Recuperado de: <https://www.forbes.com.mx/revista-impresa-mexico-invierte-2-5-del-pib-en-salud-cuando-lo-ideal-seria-6-o-mas-ops/>
- Mohan Maloth, Konduri Arun, Swapna Mohan, Srinivasulu-Sravani Ramadassu y Kisku Chhoto (2021). Importance of dissolved oxygen in aquaculture pond. *Just Agriculture*, vol. 2 (3). https://www.researchgate.net/publication/374590261_Importance_Of_Dissolved_Oxygen_In_Aquaculture_Ponds#full-text

- Noble, R. C., y Overman, S. B. (1994). Pseudomonas stutzeri infection a review of hospital isolates and a review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 19(1), 51–56. [https://doi:10.1016/0732-8893\(94\)90051-5](https://doi:10.1016/0732-8893(94)90051-5)
- Ochoa E. (2017). El reto de la resistencia a antibióticos en México y el mundo. *Boletín del Centro Colaborador de Calidad y Seguridad en el Paciente*, vol. 11, 24-27 pp. Recuperado de: http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin11/Numero_completo.pdf
- Olivo-Gutiérrez M., Verduzco-Ramírez J., García-Díaz N., Villalobos-Gómez J. y Olivo-Gutiérrez A. (2018). Prototipo para el monitoreo automatizado de parámetros de calidad del agua en una granja de camarón. *Científica*, vol. 22, núm. 2, pp. 87-95. <https://www.redalyc.org/journal/614/61458109001/html/>
- Oren A., y Garrity G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 71. DOI 10.1099/ijsem.0.005056
- Oxoid Limited. (2007). *Aeromonas medium base (ryan)*. Obtenido de ThermoFisher Scientific: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0833&c=UK&lang=EN
- Palomino Camargo Carolina, y González Muñoz Yuniesky. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(3), 535-546. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020&lng=es&tlng=es
- Park S. W., Back J. H., Lee S. W., Song J. H., Shin C. H., Kim G. E. y Kim M. J. (2013). Successful antibiotic treatment of Pseudomonas stutzeri-induced peritonitis without peritoneal dialysis catheter removal in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Research and Clinical Practice* 32, pp. 81-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.krcp.2013.04.004>
- Ramírez Fernández, Pedro Enrique, Veloz Atencio, Ernesto Evaristo, y Miranda Quiroga, Ricardo. (2018). Estudio estratégico para el desarrollo sostenible de la acuicultura de agua dulce en Camagüey. *Revista de Producción Animal*, 30(1), 58-65. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202018000100009&lng=es&tlng=es.
- Ramírez, R. (2020). *MORFOLOGÍA COLONIAL Y GUÍA DE OBSERVACIÓN*. tuaulavirtual. Recuperado 30 de octubre de 2023, de https://tuaulavirtual.educatic.unam.mx/pluginfile.php/2637920/mod_assign/intro/Morfolog%C3%ADa-colonial-y-guia-de-observaci%C3%B3n.pdf
- Relloso M. S., Nieves J., Fares-Taie S., Farquharson V., Mujica M. T., Romano V., Zarate M. S., Smayevsky J. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología*, 47 (2), 103-107 pp. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.02.004>
- Rodríguez Martínez C. y Zhurbenko R. (2018). *Manual de medios de cultivo (4ta edición)*. BioCen: Cuba.
- Romero Lenis M. C. (2020). M.R. Acuinpro. Acuicultura, Investigación, Producción. *Polo del conocimiento (Edición núm. 48)* Vol. 5, No 08, agosto 2020, pp. 1321-1331. DOI: 10.23857/pc.v5i8.1664

- Saldívar, B. (2022). El gasto en salud se estancó en el 2021. *El economista*. Recuperado el 20 de agosto de 2022, de: <https://www.economista.com.mx/economia/Gasto-en-salud-se-estanco-en-el-2021-20220210-0109.html>
- Sánchez Estrada María de la Luz, Caltzontzin Rabell Valeria, Flores Aguilar Priscila Sarai y Soto Zarazúa Genaro Martín. (2023). Tecnologías para optimizar el agua en la acuicultura. *Revista Nthe*, número 41, pp. 19-26.
- Sanz Cervera, Susana (2011). *Prácticas de microbiología (2da edición)*. Universidad de la Rioja.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (17 de octubre del 2022). *Acuerdo mediante el cual se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Acuícola*. Recuperado de: Instituto Nacional de Pesca. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/768911/CNA_5ta_version.pdf
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2021). *Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualización de la Carta Nacional Acuícola*. Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5615929&fecha=15/04/2021#gsc.tab=0
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2022, 17 de octubre). *Actualización de la Carta Nacional Acuícola*. Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5668529&fecha=17/10/2022#gsc.tab=0
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (2014, 23 de enero). NMX-AA-007-SCFI-2000 Análisis de agua - determinación de la temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Diario Oficial de la Federación. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/NMX-AA-007-SCFI-2000.pdf>
- Secretaría de Economía (2016a, 18 de abril). NMX-AA-042-SCFI-2015 Análisis de agua - enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y Escherichia coli - método del número más probable en tubos múltiples. Diario Oficial de la Federación. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166147/nmx-aa-042-scfi-2015.pdf>
- Secretaría de Economía (2016b, 09 de septiembre). NMX-AA-008-SCFI-2016 Análisis de agua - medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Diario Oficial de la Federación. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166767/NMX-AA-008-SCFI-2016.pdf>
- Secretaría de Salud. (1995, 12 de diciembre). NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#_ftn238
- Secretaría de Salud. (2022, 2 de mayo). *NOM-127-SSA1-2021 Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua*. Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5650705&fecha=02/05/2022#gsc.tab=0

- Secretaría de Servicios Parlamentarios. (2023, 19 de enero). *Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables*. Diario Oficial de la Federación. <https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGPAS.pdf>
- Serrano Heredia SM, Sánchez-Martín J, Romero Gil V, Arroyo-López FN, Benítez-Cabello A, Carrasco Jiménez E, Valero Díaz A. (2023). Tracking Microbial Diversity and Hygienic-Sanitary Status during Processing of Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Foods*. 12(20):3718. doi: 10.3390/foods12203718. PMID: 37893611; PMCID: PMC10606590. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10606590/#abstract1>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (21 de mayo de 2019). *Manuales de buenas prácticas acuícolas*. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/manuales-de-buenas-practicas-pecuarias-acuicolas-y-pesqueras>
- Sieger Pereira, M. (07 de Agosto de 2020). *Indicadores microbiológicos de inocuidad en alimentos*. Obtenido de Miuras: <https://www.miuras.com.co/indicadores-microbiologicos/>
- Sierra-Gómez J. y Molina J. (2019). *Análisis biológico y en costo-efectividad del uso de métodos de oxigenación o aireación en el crecimiento de alevinos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)*. Departamento de Ciencias Biológicas. <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/5b789ea3-5094-4472-b403-afd855d16349/content>
- Silva, J, Ramírez, L, Alfieri, A, Rivas, G, y Sánchez, M. (2004). Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Coliformes totales, coliformes fecales y aerobios mesófilos en agua potable envasada y distribuida en San Diego, estado Carabobo, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), 46-49. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100008&lng=en&tlng=es
- Soto-Calderón I.D., Salazar-Meneses M.F., Maldonado A.M., Mendoza A.P., Valle-Useche C.M. y Ussa-Pérez D.A. (Eds). (2023). *Guía para la colecta de muestras biológicas de especies silvestres para análisis genéticos*. Versión 1.0. 24p. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/34530/1/SotoIvan_2023_Colecta-Muestras-Biologicas.pdf
- Suárez, C., y Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Székely, Á. (2018). Alerta en México: bacterias sin control. *Animal político*. Recuperado de: <https://www.animalpolitico.com/2018/11/alerta-en-mexico-bacterias-sin-control/>
- Tavera M., Acosta L., Rodríguez M.F. (2015). Bacterias oportunistas involucradas en infecciones oculares. *Cienc Tecnol Salud Vis Ocul*;13(2):73-84.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2023). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 13.1, 2023. Recuperado de: <http://www.eucast.org>
- Valenzuela-Armenta José Antonio, Díaz-Camacho Sylvia Paz, Cabanillas-Ramos Julio Adalberto, Uribe-Beltrán Magdalena de Jesús, de la Cruz-Otero María del Carmen, Osuna-Ramírez Ignacio y Báez-Flores María Elena. (2018). Microbiological analysis of tilapia and

- water in aquaculture farms from Sinaloa. *Biotechnica*, vol. 20 (1), pp. 20-26. <https://www.redalyc.org/pdf/6729/672971085004.pdf>
- Valtek Diagnostics. (2021). *Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Agar XLD): Ficha técnica*. Recuperado de: <https://www.valtek.cl/wp-content/uploads/2020/02/Agar-XLD-Valtek-Version-3.pdf>
 - Vázquez-Vera L. y Chávez-Carreño P. Eds. (2022). Diagnóstico de la acuicultura en México. ISBN: 978-607-99061-5-3. *Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza, A.C. México*. Recuperado de: https://fmcn.org/uploads/publication/file/pdf/Libro%20Acuicultura_2022.pdf
 - Yadira Inza (s.f.) *Plantilla: Gráfico de proceso lluvia de ideas paso a seguir moderno multicolor*. A través de plataforma © Canva 2025. https://www.canva.com/es_es/
 - Zárate M. S., Romano V., Nievas J. y Smayevsky J. (2014). Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 98-102 pp. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70055-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70055-0)
 - Ziarati, M., Zorriehzahra, M., Hassantabar, F., Mehrabi, Z., Dhawan, M., Sharun, K., . . . Shokoofeh, S. (2022). Zoonotic diseases of fish and their prevention and control. *Veterinary Quarterly*, 95-118.

Anexo I

Agar Citrato de Simmons BD Bioxon ©

Para diferenciar enterobacterias con base en la utilización de citrato.

Fórmula aproximada por litro:

Fosfato Dihidrógeno de amonio	1.0 g
Fosfato Dipotásico	1.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Citrato de Sodio	2.0 g
Sulfato de Magnesio	0.2 g
Agar	15.0 g
Azul de Bromotimol	80 mg

Cantidad requerida para un litro de preparación: 24.2 g

Preparación*:

Se disolvieron 5.5 g de polvo en 220 mL de agua destilada, dejando hidratar de 5 a 10 minutos y se mezcló perfectamente con una varilla de vidrio. Se calentó en parrilla con agitación frecuente hasta su punto de ebullición durante 1 minuto para obtener una disolución completa. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar eosina y azul de metileno BD Bioxon ©

Para identificación y diferenciación de enterobacterias.

Fórmula aproximada por litro:

Peptona de gelatina	10.0 g
Lactosa	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.0 g
Agar	13.5 g
Eosina	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g

Cantidad requerida para un litro de preparación: 36 g

Preparación*:

Se disolvieron 8.5 g de polvo en 220 mL de agua destilada, se mezcló perfectamente con una varilla de vidrio y se calentó en parrilla con agitación frecuente hasta su punto de ebullición durante 1 minuto para obtener una disolución completa. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar para cuenta estándar
MCD LAB ©

Recuento no selectivo para mesófilos aerobios.

Fórmula para un litro:

Peptona de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa	1.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g

Cantidad requerida para un litro de preparación: 23.5 g

Preparación*:

Se disolvieron 5.2 g de polvo en 220 mL de agua destilada, se mezcló perfectamente con una varilla de vidrio y se calentó en parrilla con agitación suave hasta su punto de ebullición durante 1 minuto para obtener una disolución completa. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y se dispensaron en las cajas de Petri estériles.

Agar Aeromonas (Ryan)
Oxoid Limited ©

Fórmula aproximada por litro:

Peptona de proteosa	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Monoclorhidrato de L-lisina	3.5 g
Monoclorhidrato de L-arginina	2.0 g
Inositol	2.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Azul de bromitol	0.4 g
Lactosa	1.5 g
Sorbitol	3.0 g
Xylosa	3.75 g
Sales biliares No. 3	3.0 g
Tiosulfato de sodio	10.67 g
Citrato férrico de amonio	0.8 g

Azul de timol	0.04 g
Agar	12.5 g

Cantidad requerida para 500 mL de preparación: 29.5 g

Preparación*:

Se añadieron 7.08 g de polvo en 120 mL de agua destilada y se calentó en parilla con agitación frecuente, hasta llegar a su punto de ebullición. Se esperó a que se enfriara hasta llegar aproximadamente a 50 °C y se dispuso en cajas de Petri estériles.

Agar Müller Hinton MCD LAB ©

Para investigar la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos y aislar gonococos

Fórmula aproximada por litro:

Infusión de carne	300.0 g
Peptona de caseína H	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar bacteriológico	17.0 g

Cantidad requerida para un litro de preparación: 38 g

Preparación*:

Se suspendieron 3.8 g en 100 mL de agua destilada y se mezclaron bien en parilla con agitación suave hasta su completa disolución. Se dejó hervir durante un minuto y se metieron a autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Finalmente, se dejó enfriar a una temperatura de entre 45-50 °C y se vaciaron en placas de Petri estériles.

Caldo nutritivo Britania Lab ©

Para propósitos generales, para el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales

Fórmula aproximada por litro:

Pluripeptona	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g

Cantidad requerida por litro: 8 g

Preparación*:

Se mezclaron 6.4 g del medio en 800 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se calentó en parrilla con agitación frecuente hasta llegar al punto de ebullición. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta llegar a 45-50 °C y se dispensó en tubos eppendorf.

**Infusión cerebro corazón
MCD LAB ©**

Medio enriquecido para microorganismos con numerosos requerimientos nutritivos

Fórmula aproximada por litro:

Infusión de cerebro de ternera	200.0 g
Infusión de corazón de res	250.0 g
Peptona de gelatina	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato disódico	2.5 g
Dextrosa	2.0 g

Cantidad requerida para un litro de preparación: 37 g

Preparación*:

Se disolvieron 1.85 g del medio en 50 mL de agua destilada. Se calentó con agitación suave en una parrilla hasta alcanzar su punto de ebullición durante un minuto. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, y una vez que se dejó enfriar a 45-50 °C, se dispensó en tubos estériles Eppendorf.

Solución salina isotónica al 0.6%

Solución acuosa de sales, particularmente de cloruro de sodio, que se utiliza como diluyente.

Preparación:

Se disolvieron 0.8 gramos de cloruro de sodio de grado analítico en 100 mL de agua destilada. En un matraz con tapa se agitó vigorosamente la solución. Y, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Solución salina isotónica al 0.4%

Solución acuosa de sales, particularmente de cloruro de sodio, que se utiliza como diluyente.

Preparación:

Se disolvieron 0.4 gramos de cloruro de sodio de grado analítico en 100 mL de agua destilada. En un matraz con tapa se agitó vigorosamente la solución. Y, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.