

Presencia de plásmidos-R en bacterias aisladas de *Tubifex tubifex* (Müller 1974), tratados con el alga *Oedogonium capillare* (Linnaeus) (Kuetzing 1845).

Negrete-Redondo P¹, Romero-Jarero J², Monroy-Dosta C¹.

1 Universidad Autónoma Metropolitana – Xochimilco, Dpto. El hombre y su ambiente. Calz. Del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, C.P. 04930. México D.F., Coyoacán.

2 Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología., C.P.04510, Coyoacán, México, D.F.

*Email responsible: monroydosta@hotmail.com

RESUMEN

El gusano *Tubifex* es importante componente en la dieta para organismos acuáticos, sin embargo, posee carga bacteriana de alto riesgo ictiopatólogico, comprometiendo las condiciones sanitarias del cultivo. La purificación del *Tubifex* con baños de agua, o diferentes antibióticos, ofrecen solución, pero no eliminan todas las especies patógenas importantes en acuicultura. La propuesta de utilizar compuestos con capacidad antibiótica de origen natural como el alga *Oedogonium capillare*, ofrece solución importante ya que elimina gran porcentaje de ictiopatógenos, pero se desconoce si posee la capacidad de generar plásmidos-R. El objetivo de este estudio fue probar si el alga *O. capillare* posee capacidad de generar plásmidos-R. Para lo cual se liberaron 100 g de *Tubifex* en acuarios de 40 litros de capacidad divididos en tres tratamientos con tres replicas: uno en el que se adicionó *O. capillare* libre, otro en donde el alga estaba contenida en una red y el ultimo tratamiento donde se adicionó antibióticos de uso en acuicultura: ampicilina, cloranfenicol y penicilina. Cada siete días y durante cinco semanas se efectuó el análisis cuantitativo y cualitativo de la carga bacteriana de cada grupo. Después de identificarlas con API 20E, las cepas se sometieron a: extracción alcalina de plásmidos-R; electroforesis en gel de agarosa; y a la técnica de difusión en discos impregnados con los antibióticos mencionados. Se efectuó análisis de varianza para la determinación de diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados mostraron una disminución en el número de plásmidos-R en comparación con la carga inicial y los tratados con los antibióticos comerciales.

Palabras clave: Bacterias patógenas, *Oedogonium capillare*, plásmidos-R, *Tubifex*.

ABSTRACT

Tubifex worm is an important aquatic organism's diet component, nevertheless, it has a bacterial load of high ictiopathological risk, compromising the sanitary conditions of culture systems. Purification of *Tubifex* with water baths or different antibiotics, offer a solution but don't eliminate all the pathogenic species important in aquaculture. The proposal to use compounds of natural origin with antibiotic capacity such as algae *Oedogonium capillare*, offers an important solution because it eliminates a significant percentage of ictiopathogens, but it is unknown if it has the capacity to generate R-plasmids. The aim of this study was to prove if algae *O. capillare* has the capacity to generate R-plasmids. For this it was liberated 100 g of *Tubifex* in 40 liter aquariums divided in three treatments with three replicas: a) free *O. capillare*; b) algae contained in a net, and c) common antibiotics used in aquaculture (ampicillin, chloramphenicol, and penicillin). Every seven days, for five weeks, it was made a quantitative and qualitative analysis of bacterial load in each group. After identifying with API 20E, the strains were subjected to: alkaline extraction of R-plasmids, electrophoresis in agarose gel, and diffusion technique in impregnate discs with the mentioned antibiotics. It was made a variance analysis to determine the significant differences between treatments. The results showed a decrease in the number of R-plasmids regarding to initial load and the ones treated with commercial antibiotics.

Key words: pathogenic bacteria, *Oedogonium capillare*, R-plasmids, *Tubifex*.

INTRODUCCIÓN

La producción de peces es una actividad productiva con amplio crecimiento económico, sin embargo, también constituye en una fuente de contaminantes bacterianos y genes de resistencia a antibióticos que se liberan al medio ambiente (Baquero et al. 2008; Anderson y Hughes 2012; Ozaktas et al. 2012). Para cubrir las necesidades nutrimentales de los peces en cultivo, los productores utilizan dietas comerciales y las no convencionales como el alimento vivo, las cuales además deben cubrir todas las normas de calidad en cuanto a nutrimentos y de calidad microbiológica (Negrete et al. 2001). Pese a ello, es frecuente que los productores obtengan alimento vivo colectado de áreas insalubres como son aguas de drenaje e industria, por lo que se corre el riesgo de introducir bacterias patógenas que pudieran enfermar a los peces, ocasionando un alto porcentaje de mortandad y, como consecuencia, graves pérdidas económicas. En la actualidad los organismos más utilizados como alimento vivo para peces son: *Artemia* sp., *Tubifex* sp., *Daphnia* sp. y Tenebrio (Luna y Soriano, 2001).

De manera específica el gusano *Tubifex*, es muy utilizado debido a su alto contenido proteico y de ácidos grasos, pero es portador de gran cantidad de bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*. Nenoff y Uhlemann (2006), aislaron *Micobacterium marinum* a partir de *Tubifex* esta es una bacteria que puede causar enfermedad en los peces. Monroy et al. (2013), reportan la presencia de *Salmonella* en *Tubifex*. Debido a lo anterior, los productores utilizan diversos químicos y para el saneamiento de este alimento, pero su eficacia se ha visto alterada por su uso excesivo o incorrecto, que ha conducido a la aparición y diseminación de bacterias resistentes, ya que los microorganismos desarrollan mecanismos para protegerse de cualquier sustancia que pueda dañarlas (Sánchez 2006). Además, tienen la habilidad de adquirir material genético que le confiere capacidad para sobrevivir frente a los compuestos antimicrobianos, estos son los plásmidos-R y transposones que contribuyen a su diseminación tanto entre bacterias emparentadas y/o

patógenas como hacia bacterias no patógenas, mediante transducción, transformación o conjugación, otorgándoles la resistencia (Acuña et al. 2011; Acevedo et al. 2015).

Por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar si *O. capillare* induce la generación de plásmidos-R en su uso como bactericida en el proceso de purificación la carga bacteriana de *Tubifex tubifex*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los especímenes de *O. capillare* fueron recolectados de estanques en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (CIBAC). Con una red se seleccionaron los ejemplares más vigorosos, las hojas y desechos orgánicos fueron removidos de la superficie del agua antes de efectuar el muestreo. Las algas fueron identificadas en el laboratorio de Fisiología de la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco, basándose en las descripciones de Tiffany y Britton (1952), Hirn (1960) y Gauthier-Lievre (1963).

Se montaron los grupos experimentales y de control de la siguiente forma: en nueve acuarios con capacidad de 40 L, se agregaron con 2 L de agua libre de cloro residual y se colocaron 100 gr de *Tubifex*. Posteriormente se introdujo el alga *O. capillare* en forma directa para un tratamiento y en otro sujeta con una red, el tercer tratamiento se llevó a cabo con la adición de dos gramos de cloranfenicol, ampicilina, y penicilina. Finalmente se preparó un último acuario conteniendo únicamente agua con el *Tubifex*, el cual fue considerado como control. Se determinó cuantitativa y cualitativamente la carga bacteriana inicial de la muestra de *Tubifex* (Negrete et al. 2012).

Cada ocho días durante cinco semanas se procedió a analizar las muestras primero cualitativamente para lo cual diez gramos de *T. tubifex*, de cada uno de los acuarios se extrajeron con una red estéril, se pesaron y homogeneizaron con un homogeneizador marca Virtix, durante tres minutos, a 3000 rev/min, con 90 mL de agua destilada estéril, con una pipeta automática se extrajeron 100 µL y se

sembraron por duplicado en placas de agar de medios específicos de: *Salmonella-Shigella* (SS), eosina-azul de metileno (EMB): tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y cerebro corazón (BHA). Del tubo con el contenido del homogeneizado original se transfirió 1 ml de muestra a tubos con caldo lactosado, tetrionato al cual se le agregó 1000 µl de yodo yoduro y a tubo con agua peptonada, y se dejaron incubando por 24 horas a 36 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, del crecimiento bacteriano encontrado en las cajas, se realizaron resiembras sucesivas en agar nutritivo hasta purificar las cepas; lo que se confirmó por el crecimiento homogéneo de las colonias en el agar, estas cepas, se dejaron incubando nuevamente por 24 horas a 36 °C, y posteriormente se les efectuó tinción de Gram.

A continuación, se identificaron las colonias presuntamente, siguiendo los criterios del manual Merck (1994); y para confirmar, se utilizó el kit comercial API-20 E (Analytical Profile Index, 1997). Posteriormente se efectuó el análisis cuantitativo a partir del homogeneizado anteriormente mencionado y con una pipeta automática se extrajeron 1000 µL y se efectuaron diluciones a la centésima desde 10^{-1} y hasta 10^{-7} , de cada frasco de dilución, se extrajeron, igualmente, con una pipeta automática, 100 µL y se sembraron en placas con agar de medios específicos de eosina azul de metileno (EMB), *Salmonella-Shigella* (S-S), tiosulfato- citrato de sales de bismuto (TCBS), y cerebro corazón (ABH), El inóculo se esparció en cada una de las placas de los medios de cultivo, con una varilla de vidrio acodada, todas las cajas se incubaron por 24 h a 36 °C. Después de este tiempo, se efectuó el conteo de unidades formadoras de colonias (ufc/mL), con un equipo cuenta colonias tipo Quebec.

El procedimiento de identificación de las especies aisladas, así como la extracción de plásmidos- R y susceptibilidad a antibióticos, se llevó a cabo con simultáneamente con cepas de colección: *Aeromonas hydrophila* (ATCC356), *Vibrio alginolyticus* (ATCC177), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC178), *Escherichia coli* (ATCC11775), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC13833).

La susceptibilidad a diferentes antibióticos de las cepas identificadas; se determinó mediante el uso del método de difusión en placa (Bauer *et al.*, 1966), para lo cual las cepas puras e identificadas se sembraron en placas de agar de Luria Bertani (LB), y se incubaron a 36⁰ C, durante 24 h, posteriormente las colonias obtenidas se trasladaron a un tubo con 5000 µL de caldo de LB, hasta obtener turbidez de 0.5 de Mc Farland (Hindler 1992), enseguida con un hisopo estéril se sembraron las cepas en placas de agar de Hüller-Milton, después de 15 min, se colocaron pequeños discos de papel filtro cortados con un perforadora de papel (Sanofi, México) que incluye los siguientes antibióticos en las concentraciones indicadas:, Cloranfenicol(CL) 30µg, Ampicilina (AM) 10 µg, y Penicilina(PENI) 30 µg Adicionalmente se colocaron también cajas de Petri con agar (HM), discos de papel filtro, con las mismas características, impregnados con el extracto del alga *Oedogonium capillare*, preparados como se menciona anteriormente. Se dejaron incubar a 30 °C durante 24 hrs, después de las cuales con un vernier se midieron los halos de inhibición. Las cepas se clasificaron en Resistente (R), Intermedio (I), o Susceptibles (S), dependiendo del diámetro de los halos, incluyendo el diámetro de los discos (6 mm), (Barry et al. 1985; Giono 1983; Stanley 1983).

La extracción de plásmidos-R se efectuó utilizando la técnica de lisis alcalina (Birnbain y Dolly 1979). De nuevo las cepas se sembraron en placas de agar de Luria Bertani (LB), y se incubaron a 36⁰ C, durante 24 h, posteriormente las colonias que se obtuvieron se sembraron en tubos con 5 mL de caldo de LB, se incubaron a baño María con agitación a 36 °C durante 24 h, 2000 µL de éste cultivo fue transferidos a otro tubo estéril Eppendorff, se centrifugó a 14000 rev/min durante 30 seg, el sobrenadante se removió, la pastilla que permanece en el fondo del tubo Eppendorff se resuspendió con 100 µl de solución de lisosima, esto se resuspendió agitándose con un vortex durante 1 min, posteriormente se incubó en hielo durante 30 min, se agregó 200 µL de Duodecil Sulfato de Sodio, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min en hielo, después de lo cual se añadió 150 µL

de Acetato de Sodio 3 M, nuevamente se mezcló suavemente por inversión del tubo y se incubó por 60 min, nuevamente se centrifugó durante 5 min a 14,000 rev/min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorff estéril, añadiendo 1000 µL de Etanol frío, se incubó 30 min para posteriormente centrifugarse 30 min a 14000 rev/min, el sobrenadante se removió, la pastilla se disolvió con 100 µL de Acetato de Sodio 0.1M y Tris 0.05M pH 8, respesitando en 300 µL de Etanol frío (Birnboim y Doly 1979). El sobrenadante se eliminó y se agregó 10 µl de solución amortiguadora de muestra 5X (sacarosa al 25%, Acetato de Sodio 5mM, azul de Bromofenol al 0.05% y SDS al .1%).

Las extracciones se trataron con RNAsa pancreática de bovino tipo I-AS, a concentración de 0.01 µg/mL, se incubaron a baño María a 60°C durante 10 min.

Se aplicaron 10 µl de las muestras obtenidas en los pozos de los geles de agarosa al 0.6% para el análisis de electroforesis. Los geles se prepararon con buffer borato TB de corrida al 0.5X y 0.6X de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo a 70V de voltaje, 250 W de poder. Los hueles fueron teñidos durante 45 min y revelados con una solución de bromuro de etidio disuelto en agua destilada a concentración de 0.5 µg/mL. Una vez revelados los geles se lavaron con agua durante 30 seg con el fin de eliminar excesos de bromuro de etidio, fueron colocados en un transiluminador de rayos UV de longitud de onda corta. Las fotografías de los geles fueron tomadas con transiluminador con cámara fotográfica Polaroid instantánea con cartuchos de película polaroid 667.

Las extracciones procedentes de las cepas aisladas se corrieron en gel simultáneamente con el marcador de peso molecular conocido: GENE RULER TM 1kb DNA LADDER, finalmente se midió la movilidad relativa de los plásmidos y del marcador de referencia, aplicando una regla de tres inversas para obtener los pesos moleculares en número de bases de pares, en función del número de pares de bases conocido del marcador (10000 pb).

Se efectuó el análisis estadístico, para lo cual se aplicó el análisis de varianza unilateral.

RESULTADOS

La carga bacteriana aislada el gusano Tubifex (control) se conformó por un total de 15 diferente especies bacterianas: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* I (ATCC11775), *Escherichia coli* II (ATCC23716), *Escherichia coli* III (ATCC194), *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella spp*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia plymuthica*, *Shigella flexnerii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluviales*, y *Aeromonas hydrophila*. En las dos últimas semanas del experimento y se aisló e identificó *S. plymuthica*.

Para los tratamientos con antibióticos de uso comercial, penicilina, ampicilina y cloranfenicol, se registraron, desde la primera semana y hasta la quinta semana de tratamiento, halos de inhibición, sin embargo, para los casos de uso de *O. capillare* tanto libre(L) como en red (R), no se registró la formación de halos de inhibición (Tabla 1). Después de aplicar el análisis de varianza para el número de cepas que presentaron halos inhibición después del tratamiento se obtiene una diferencia significativa entre y dentro de los grupos tratados con los diferentes antibióticos con un valor de P=0.01.

Al inicio del tratamiento el número total inicial de plásmidos-R (Tabla 2) portados por las 15 especies de bacterias identificadas, fue de 93 plásmidos con diferentes pesos moleculares desde 2916 hasta 12500 pares de bases (pb), solamente *Aeromonas hydrophila* portaba la mayor cantidad 14 de ellos esto es el 15% del total. Las 11 especies de enterobacterias: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* I, II, y III, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella spp*, *Protus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, y *Shigella flexnerii*, portaron 74 plásmidos-R, representando el 79.5% estos con pesos moleculares desde 6000 pb hasta 12500 pb con promedio 6878pb. Las 4 especies del grupo de la familia Vibrionaceae aisladas el 3.2%: *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio fluviales* portaron conjuntamente 9 plásmidos con pesos moleculares de 2915, 7500 y 9500 pb.

Tabla 1: Valores promedio del número de cepas que presentaron halo de resistencia a los antibióticos.

	Penicilina	Ampicilina	Cloranfenicol	<i>O. capillare</i> Libre	<i>O. capillare</i> Red
Inicial	12	0	14	4	6
Semana 1	8	0	8	2	2
Semana 2	29	6	26	0	0
Semana 3	42	2	35	0	0
Semana 4	32	8	20	0	0
Semana 5	18	0	15	0	0

Tabla 2: Número de plásmidos-R portados en diferentes bacterias aisladas de *Tubifex* tratado con diferentes antibióticos.

Especies identificadas	Inicio	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	14	0	0	3	6	0
<i>Escherichia coli I</i>	7	0	4	8	4	4
<i>Escherichia coli II</i>	7	1	2	7	4	2
<i>Escherichia coli III</i>	6	1	2	9	0	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	1	11	3	0	4
<i>Klebsiella pneumonidade</i>	9	1	7	9	10	0
<i>Klebsiella spp</i>	10	4	4	2	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	0	1	8	0	0	0
<i>Salmonella thyphimurium</i>	7	2	7	0	4	4
<i>Salmonella enteritidis</i>	5	0	5	0	0	0
<i>Serratia plymuthica</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella flexnerii</i>	8	1	6	7	7	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	3	0	0	0	0	0
<i>Vibrio algynolyticus</i>	6	0	0	0	0	0
<i>Vibrio fluvialis</i>	0	1	2	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	0	0	0	0
Número de especies	12	8	10	7	6	5
Plásmidos extraídos	93	13	58	48	35	16

El número de plasmidos-R presentes en las especies bacterianas aisladas durante las cinco semanas de tratamiento según el análisis de varianza es significativamente diferente ($P= 0.01$).

En la Tabla 3 se registra el cambio en el número de pesos moleculares (pb) de cada una de las 15 especies a lo largo del experimento. Se inició con 21 pesos moleculares diferentes, disminuyen en número en la primera y segunda semana, 14 y 18

respectivamente y en la tercera semana a 39, para disminuir a 22 diferentes pesos moleculares en la penúltima semana, para en la quinta y última semana de tratamiento hasta 12 pesos moleculares diferentes. Sin embargo, aunque el número de diferentes pesos moleculares y número de especies diferentes disminuye significativamente, el número de pb aumenta, al inicio se registró 67090 pb en 31 plásmidos y 15 especies diferentes y para la última

Tabla 3: Peso molecular (pb) de los plásmidos-R portados por las cepas aisladas del gusano *Tubifex* durante las cinco semanas del tratamiento.

	Control	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
<i>Aeromona hydrophyla</i>	5163	22500	5000			
	7853	21000	7500			
	7083		22500			
	7853		27000			
<i>Enterobacter cloacae</i>	8750	10000		37000		
<i>Escherichia coli I</i>	8750	22500	23500	10000		20000
				19000		26000
						45000
<i>Escherichia coli II</i>	7083	22500	2500	15000		27500
			19500	20000		45000
			35500			
<i>Escherichia coli III</i>	6250	22500	22500	17500	10000	20000
			29000	19000	15000	45000
				28000	16500	
					20000	
					25000	
<i>Klebsiella pneumonidade</i>	10416	20000	17500	1750	10000	20000
	11000		19000	22500	15000	26000
	11750		23000	27000	17500	25000
	12500		29000	37500	20000	26000
<i>Kleibsella spp.</i>		10416	20000	17500	10000	
		11000		19000	15000	25000
		12500		29000	20000	26500
<i>Proteus vulgaris</i>		9100	22500	17500		
		12000		19000		
				23000		
				29000		
<i>Salmonella thyphimurium</i>	7500	22500	19000	17500	12500	
			29500	22500	17500	
<i>Salmonella enteritidis</i>	6000	20000	19500	17500		
				37500		
<i>Shiguella flexnerii</i>	9000	21000	17500	7500	10000	
				10000	12500	
				15000	20000	
				27500		
<i>Vibrio vulnificus</i>	7500					
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	9500			15000		
<i>Vibrio alginolyticus</i>	7500			20000		
<i>Vibrio fluvialis</i>	2916		22500		12500	
			25000		17500	
			29000		17500	

semana se registra 24923 pb en 18 plásmidos en 5 especies. El análisis de varianza indicó diferencias significativas con un valor de $P=0.05$.

Del análisis de Panel entre la diferencia de pesos moleculares que se obtuvieron al inicio y final del tratamiento a *Tubifex* las cinco semanas con diferentes antibióticos, se obtuvo que los pesos moleculares de los plásmidos-R obtenidos, difieren significativamente al obtener un valor de $P= 0.001$.

DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación demostraron que al tratar el alimento vivo con antibióticos como penicilina, cloranfenicol y ampicilina, se obtuvo reducción importante en el número de especies en la carga bacteriana así como en la cantidad de ufc/mL de cada una, sin embargo, habría que considerar por un lado, el alto costo que implica el suministro de estos químicos (Buschmann 2001), y por otro y no menos importante que su uso implicaría contaminación ambiental debido a la forma de administración directa al agua de los contenedores de los lotes en tratamiento, que finalmente será desechada a los flujos de agua de desecho como lo señalan Espinosa y Bermudéz en el 2011, y por último la resistencia bacteriana que genera el uso antibióticos, mismas que serán incorporadas al ambiente al momento que se deseché el agua de los contenedores del agua de los tratamientos (Cabello 2011).

Las dos formas de administrar el tratamiento a base del alga *O. capillare*, resultaron efectivos, al reducir no solamente la carga bacteriana, sino que también la cantidad de plásmidos-R presentes en las cepas aisladas del gusano hasta en un 58%. Al utilizar el alga de forma libre permitiendo el contacto con el gusano, resultara aún más efectiva al lograr la máxima reducción de plásmidos-R en menor lapso, probablemente debido a que el gusano se alimenta de ella. El cloranfenicol, aunque dio buen resultado en el tratamiento, no elimina del todo la presencia de plásmidos-R

Estudios recientes indican que más del 90% de

las bacterias de origen marino son resistentes a más de un antibiótico (Acevedo et al. 2015), en el presente estudio, aunque las cepas bacterianas aisladas fueron de origen dulceacuícola el 67% de las especies aisladas portaban más de cinco plásmidos-R en su mayoría enterobacterias, lo que indica que las mismas fueron expuestas a antibióticos en diferentes ocasiones. Las especies de la familia Vibrionaceae eran portadoras de máximo dos plásmidos con excepción de *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio fluvialis* de las que se extrajeron seis y ocho plásmidos diferentes. Teniendo, por lo tanto, de acuerdo con Acevedo (2015), un caso de multi resistencia. Lo que indica que los gusanos *Tubifex* habían estado en contacto previo en el ambiente con diferentes antibióticos, implicando una importante contaminación ambiental.

Es notorio el hecho del aumento de los pesos moleculares frente a la disminución del número de plásmidos-R, posiblemente por el tiempo (cinco semanas) durante las que permanecieron las cepas que sobrevivieron, en contacto permanente con los antibióticos comerciales que si generan plásmidos ya que como lo señalan diversos estudios (Angulo 2000; Negrete et al. 2004; FAO 2008), la administración continua de antibióticos se ve reflejado en el incremento del número de plásmidos y de sus pesos moleculares, como estrategias que desarrollan los microorganismos a las sustancias antibióticas que pueden dañarlos (Baires 2012).

Los diferentes tratamientos aplicados a *Oedogonium capillare* difieren significativamente entre los otros tratamientos con respecto a su capacidad de generar plásmidos-R, por lo que se puede afirmar que *Oedogonium capillare* es una estrategia efectiva como purificador natural del gusano *Tubifex* dado que disminuye la carga bacteriana y no propicia la formación de plásmidos-R-, por lo que este método puede aplicarse de manera segura en los centros de producción o colecta del gusano *Tubifex* y de producción de peces.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo BR. 2015. Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Revista Producción Limpia*. 10. 160-172.
- Acuña M, Benadof D, Rodríguez GP, Herrera IP, 2011. Antibióticos y expresión de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en agentes bacterémicos. *Revista Chilena de Pediatría* 82(3): 198-203
- Analytical Profile Index. 1997. Enterobacteriaceae and other Gram-negative Bacteria. 9th. Edition Bioumerioux, Francia.
- Andersson DI, Hughes D. 2012. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations, *Drug Resistance Updates* 15(3): 162-172.
- Angulo F. 2000. Antimicrobial Agents in Aquaculture: Potential Impact on Public Health. *Newslett* 175: 125-132.
- Baires BK, Courvalin P, Dantas G. 2012. Tackling antibiotic resistance. *Nature Microbiol Rev* 9:894–896.
- Baquero F., Martínez JL, Cantón R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 260–265.
- Barry AI, Thornsberrry C. 1985. Susceptibility test diffusion procedures. In: Lennette (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society Microbiology 1(2): 234-254.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *J Clin Pathol*. 45(4):493-6.
- Birnboim HC, Dolly JA. 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res* 7: 1513-1517.
- Buschmann AH, Troell KN. 2001. Integrated algal farming: a review. *Cahiers de Biologie Marine* 42: 83-90.
- Cabello FC. 2011. Heavy Use of Prophylactic Antibiotics in Aquaculture: A Growing
- Espinosa PA, Bermúdez AMC. 2012. La acuicultura y su impacto al medio ambiente. *Estudios Sociales* 2: 221-232.
- FAO. 2008. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Documento Técnico de Pesca No. 498. Ed. Matthias Halwart. Oficial de Recursos Pesqueros. 245p.
- Gauthier LL. 1963. Oedogoniaceas Africanas. *Nova Hedwigia* 6-7: 151-481; 545-558.
- Giono CS. 1983. Prueba de Bauer-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. *Infectología III* 7:325.
- Hindler JV. 1972. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products. I. Epidemiologic and clinical features. *Am. J. Med.* 60: 471-85.
- Hirn KT. 1960. Monographic Der Oedogoniceen. New York: J.Gramer. Wihildon and westley. *J. Algal Biomass Utln.* 6. 9(2): 4.
- Luna FJ, Soriano SM. 2001. Efecto de diferentes tipos de alimento en el crecimiento de pez Ángel (*Pterophyllum scalare*). *Microbiology* 8: 1137-1144.
- Monroy DMC, Negrete RP, Romero JJ, Torres LP. 2013. Evaluación de *Escherichia coli* y *Salmonella* Arizona como patógenos oportunistas en el cultivo de pez ángel (*Pterophyllum scalare*, Lichtenstein 1823). *Revista Digital E- Bios*. 1(1): 14-22
- Negrete RP, Romero JJ, Cruz GG. 2001. Oedogonium capillare (Linnaeus) (Kuetzing, 1845) como estrategia para purificar alimento vivo *Tubifex tubifex* (Müller, 1974) para peces». *Veterinaria México* 41 (3): 201-210.
- Negrete RP, Romero JJ, Arredondo FJL. 2004. Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, aislados de *Carassius auratus auratus*: *Revista Veterinaria México* 35 (1): 1- 10.
- Nenoff P, Uhlemann R. 2006. Mycobacteriosis in mangrove killifish (*Rivulus magdalenae*) caused by living fish food (*Tubifex tubifex*) infected with *Mycobacterium marinum*. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 113: 230-232.
- Ozaktas TT, Bilgin G, Ayse G. 2012. High level multiple antibiotic resistance among fish surface associated bacterial populations in non-aquaculture freshwater environment, *Water Research* 46(19): 6382-6390.
- Sánchez B, María EM, B & Muñoz, Rafael & Esp, M & Gutiérrez, Norma. 2012. Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Bacterial Resistance to Antibiotics: Mechanisms of Transfer. Pei Domus*. 8(17):
- Stanley RS. 1983. Lynch's Medical Laboratory Technology. Washington USA. Ed. WB. Saunders. 434-440.
- Tiffany LH, Britton ME. 1951. The algae of Illinois. The University of Chicago, Press, Chicago. pp. 406. Whitford, LA; Schumacher, GJ (1973). A manual of fresh water algae. Sparks Press Raleigh WC. 324 p.