



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA

Coordinación de Bibliotecas

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE LA COSTA SUR

DIVISIÓN DE DESARROLLO REGIONAL

**DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y RECURSOS
NATURALES**



MICROBIOTA BACTERIANA EN PECES DE CONSUMO DEL RÍO AYUQUILA, JALISCO, MÉXICO

Tesis Presentada por el Sustentante:

C. ROSA LEONOR GONZÁLEZ DÍAZ

Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

**AUTLÁN DE NAVARRO, JALISCO
FEBRERO, 2017**

1. INTRODUCCIÓN

Hoy día, para la población creciente de nuestro planeta, una forma de obtener proteínas de origen animal es a través del consumo de pescado. Constituye también una fuente de minerales como el fósforo, vitaminas esenciales y es importante en la dieta de las personas con escasos recursos (Rincón *et al.*, 2013; Periago *et al.*, 2005).

La pesca es una actividad que los humanos realizan en diferentes cuerpos de agua y ofrece también ingresos para que se puedan adquirir otros alimentos (FAO, 2012). Por ello, es importante que la salud y calidad del producto pesquero sean adecuadas y no tengan afectaciones por enfermedades o contaminantes.

En México la seguridad alimentaria presenta un panorama de grandes contrastes, pues a pesar de contar con cantidades de alimentos suficientes, una parte de la población está en pobreza alimentaria por ingresos económicos. Se estima que esta situación se agravará con el paso de los años (Urquía, 2014). De ahí que la pesca en ríos cobre gran importancia en muchas localidades del país, sobre todo en las zonas rurales.

Entre los 15 ríos más importantes de la vertiente del Pacífico mexicano, se encuentra el Ayuquila. Este río está considerado como el segundo más importante del Estado de Jalisco, debido en parte a su disponibilidad de agua, la alta biodiversidad que mantiene y la gran extensión con la que cuenta. Es el río más importante del estado de Colima. Los peces que crecen en sus aguas contribuyen a la alimentación de los habitantes de la zona. Especies nativas y exóticas son utilizados para consumo humano (Mercado-Silva, 2001).

Los peces en medios naturales son portadores de microorganismos que contribuyen en parte al sistema de defensa natural del hospedero (Lazado *et al.*, 2015), o sea, forman parte de su microbiota natural. Sin embargo, en situaciones cuando el ambiente es sujeto a eventos de contaminación o reducción de calidad ambiental, los peces pueden ser expuestos a agente microbianos que pudieran ser dañinos para los humanos que les consumen (Cahill, 1990). En ocasiones éstos agentes han generado enfermedades que afectan el desarrollo de los peces e infecciones que en humanos se manifiestan a través de náuseas, vómitos, cefalea, diarrea, sequedad de boca, urticaria y broncoespasmo (El-Sayed, 2006) y que pueden llegar a significar graves problemas en la salud pública (Van den Bogaard *et al.*, 2001).

1.1. JUSTIFICACIÓN

Debido a que varias especies de peces son parte de la pesca de subsistencia y comercial del río Ayuquila (Mercado-Silva, 2001; Mercado Silva *et al.*, 2011) y que pueden ser éstas afectadas por diversas bacterias, se hace necesario identificar posibles géneros y especies microbianas que permitan conocer la calidad higiénico-sanitaria de dichos vertebrados. En esta zona no se han reportado investigaciones de campo donde se realice un perfil microbiano de los peces de la región, así como de las aguas donde se desarrollan. Al río son vertidos desechos albañales y domésticos que tienen un elevado contenido microbiano que pueden afectar la salud de los peces que ingiere la población ribereña. Al conocer el grado de contaminación de las especies de consumo, se podrá contribuir al manejo y a la toma de decisiones por parte de las instituciones relacionadas con la problemática ambiental del río Ayuquila. La importancia del presente trabajo radica en que por primera vez, según la literatura consultada, se realiza un estudio microbiológico en peces de vida libre del río Ayuquila en Jalisco, México.

1.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los géneros bacterianos a los cuales podrían estar expuestos los pobladores ribereños a través del consumo de peces provenientes del río Ayuquila?

1.3. HIPÓTESIS

En los tejidos de peces provenientes de sitios con baja calidad microbiológica del agua en el río Ayuquila se encontrará una mayor diversidad de géneros microbianos que en los tejidos de los peces de sitios con mejor calidad del agua.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la diversidad de cepas bacterianas en tejidos de peces que pudieran afectar la salud de los pobladores del Ayuquila a través del consumo de los mismos.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la calidad microbiológica (*Escherichia coli* y coliformes totales) del agua del río Ayuquila.
2. Identificar cepas bacterianas en peces de consumo del río Ayuquila y que podrían generar problemas de salud pública por su efecto potencial en humanos.
3. Analizar la relación entre la presencia de organismos bacterianos patógenos para el ser humano en los peces y la presencia de estos en el agua del río Ayuquila.

2. REVISION DE LA LITERATURA

2.1. Peces y su consumo

Los peces son vertebrados de gran importancia que habitan en casi todos los cuerpos de agua del planeta. En los últimos tiempos se ha incrementado su consumo debido entre otros factores, a la facilidad de su producción y además por sus diversos beneficios para la salud ya que ayudan a prevenir numerosas enfermedades cardiovasculares, así como el cáncer (Broglia y Kapel, 2011, Ama-Abasi y Ogar, 2013).

Las proteínas que posee la carne del pescado contienen los aminoácidos necesarios para el mantenimiento de los tejidos humanos. Al consumirlo, entre las ventajas que ofrece está que al aportar potasio mejora la tensión arterial y se ingieren pocas cantidades de colesterol que es el principal responsable de la formación de placas de ateroma en las arterias (Acuña, 2013). Muchas personas que viven en localidades rurales lo consumen porque representa una de las pocas fuentes de proteínas a las que tienen acceso. Lo antes mencionado justifica parte de la importancia que cobra este grupo de organismos.

2.2. Algunas especies invasoras en México de interés comestible

En México la ictiofauna dulceacuícola está conformada por alrededor de unas 505 especies de las 2763 en general que existen en el país y representa aproximadamente el 9.8% del total de los peces conocidos en el mundo (Espinosa, 2014). Esto denota sin duda alguna la gran riqueza de estos vertebrados (De La Vega-Salazar, 2006). Lo anterior también está dado porque presenta altos niveles de endemismo que al comparar con Estados Unidos y Canadá, siendo países mucho más grandes, de los 792 especímenes encontrados en esos países, 136 son endémicos de México (Conabio, 2000). Sin embargo, numerosas especies exóticas han invadido diversos ecosistemas dulceacuícolas. Estas especies introducidas además de que son utilizadas en las pesquerías comerciales y de subsistencia, representan un peligro para los peces nativos (Cucherousset y Olden, 2011).

Dentro de los peces que más se consumen y aparecen en los ríos de México se encuentra la tilapia (*Oreochromis* sp.) (Fig. 1) que constituye una especie exótica de amplio consumo a nivel mundial (Madero *et al.*, 2006; Sevilla y Gabriel, 2010). Diversas especies de los géneros *Oreochromis* sp. y *Tilapia* sp. se encuentran generalmente en regiones tropicales. Es

actualmente una de las más grandes amenazas a la biodiversidad de los ríos (Toledo y García, 2000) pero al mismo tiempo en el país se presentan como una de las alternativas más ventajosas para la producción de vitaminas sanas y de bajo costo (Noriega *et al.*, 2014).



Figura 1. Tilapia (*Oreochromis* sp.) del río Ayuquila, Jalisco México. Fuente de la autora.

Otra de las especies de interés comestible que se encuentran en el país es *Cyprinus carpio* (Fig. 2), conocida como carpa común. Estudios han demostrado que producen alteraciones en los ecosistemas acuáticos contribuyendo a la pérdida de la biodiversidad (Ramírez-Herrejón *et al.*, 2015). Ha sido una especie introducida en el centro de México incluyendo los lagos de Chapala, Cuitzeo y Xochimilco (Tapia *et al.*, 2003). Por otro lado, *Carassius auratus* que también es una carpa, se alimenta de huevos, larvas y especies nativas, lo que ha contribuido a la desaparición de especies autóctonas de los efluentes (Lozano-Vilano y García, 2014).



Figura 2. Carpa común (*Cyprinus carpio*) del río Ayuquila, Jalisco México. Fuente de la autora.

Lepomis macrochirus (Fig. 3), también conocido como mojarra de agallas azules es otro pez que aparece en las aguas dulces del país. Es una especie nativa en algunas cuencas del norte del país y ha sido ampliamente introducido fuera de su rango de distribución nativa. Es consumido por pobladores de zonas ribereñas en distintas partes del mundo (Barbknecht *et al.*, 2013). Es un pez omnívoro con la capacidad de tolerar altas concentraciones de sal en su hábitat y se ha registrado como una especie invasora en al menos 20 países (Kawamura *et al.*, 2006).



Figura 3. *Lepomis macrochirus*, Bluegill. Fuente: North American Native Fishes.

Las especies antes mencionadas, en su conjunto, debido a su biología y hábitos alimentarios han formado parte importante de los programas de acuicultura, pero han escapado o han sido introducidas en numerosos cuerpos de agua. En muchos sistemas, como el río Ayuquila, las especies exóticas han desarrollado poblaciones exitosas que son de interés para los pescadores a pesar de estar expuestas a una relativamente baja calidad del agua en diversos sitios. En dichos espacios, es posible que exista una alta incidencia de enfermedades en estos peces (Salazar y Flores, 2013).

2.2.1. Pesca en el río Ayuquila

Desde su nacimiento en el centro de Jalisco, el río Ayuquila forma diversos cañones y valles hasta su desembocadura en el Océano Pacífico (Fig. 4). Este afluente se origina a unos 100 Km al norte de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán (Mercado-Silva *et al.*, 2011) y

cuenta, en total, con 324 km de longitud. De los 23 municipios que recorre, 16 pertenecen a Jalisco mientras que el resto a Colima (Santana *et al.*, 1991; Arrellano y Rivera, 2011).

Uno de los principales problemas que se ha reportado para la cuenca del río Ayuquila es la contaminación del afluente debido a los vertimientos de aguas negras (Olguín, 2010). Dicha situación representa un foco rojo por el impacto negativo que tiene en la calidad de vida de la población ribereña de la zona. Estas aguas negras tuvieron su origen inicialmente a partir de las aguas residuales industriales provenientes del ingenio Melchor Ocampo (Santana *et al.*, 1991), situación que ya se ha controlado parcialmente. Por otro lado, los drenes de los municipios El Grullo y Autlán de Navarro vierten sus contenidos líquidos directamente sin tratar al río (JIRA, 2008). Otra posible fuente de deterioro es el aporte de agroquímicos contenidos en las aguas de retorno agrícola (Olguín, 2010). Factores como las aguas urbanas, industriales y residuos agropecuarios (Santana *et al.*, 1990) han contribuido a la pérdida de la biodiversidad en la región y a la disminución de la disponibilidad del agua en cuanto a calidad y cantidad (Martínez *et al.*, 2000; Olguín, 2010).

Debido a las complicaciones por contaminación que enfrenta el río Ayuquila desde hace más de 20 años, se llevan a cabo actividades de monitoreo ambiental en diversas estaciones a lo largo del efluente (Santana *et al.*, 1991; Mercado Silva *et al.*, 2011). Dentro de las que son muestreadas mensualmente por personal del Departamento de Recursos Naturales del Centro Universitario de la Costa Sur, Universidad de Guadalajara en la cuenca del río Ayuquila, se encuentran las estaciones "Corcovado", "Palo Blanco" y "Achacales". La primera está localizada aguas arriba del puente del Corcovado, en las inmediaciones de la población "La Laja". En este sitio hay escaso vertimiento de aguas negras por las poblaciones cercanas. Por su parte, las ciudades del Grullo y Autlán, además de otras poblaciones, contribuyen a la contaminación del río, lo que se ve reflejado en la mala calidad del agua que se aprecia en Palo Blanco y Achacales respectivamente localizados aguas abajo como aparece en la figura 4.

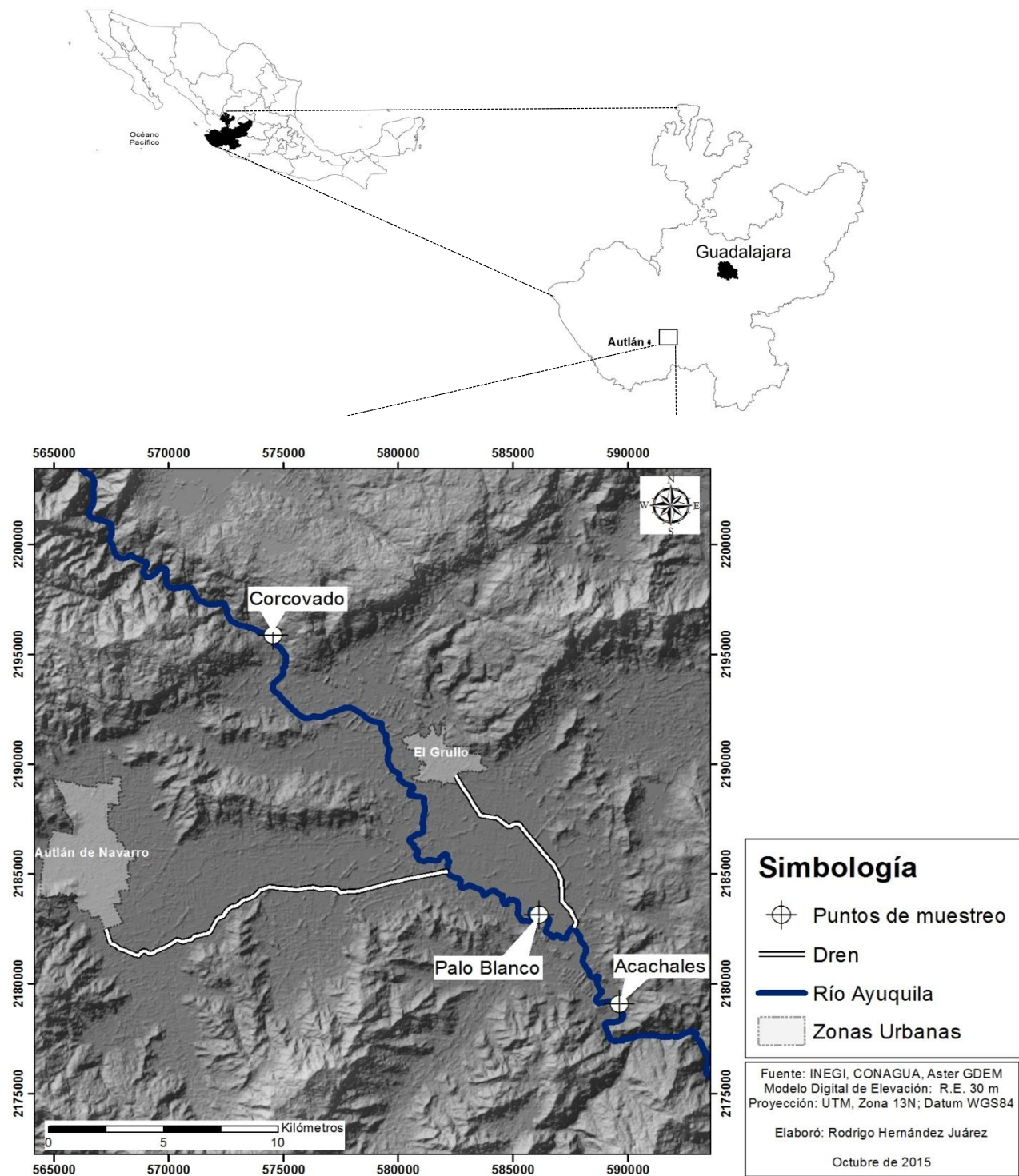


Figura 4. Ubicación en el río Ayuquila de los tres puntos de muestreo que fueron estudiados: Corcovado (Punto de control), Palo Blanco y Achacales. La línea azul oscuro representa el cauce del río mientras que las blancas, los drenes de los municipios Autlán de Navarro y El Grullo que desembocan al río. Fuente: INEGI, CONAGUA, Aster GDEM.

2.3. Enfermedades en peces

Los agentes biológicos causales de enfermedades en peces son principalmente las bacterias, hongos, virus y parásitos (helmintos y protozoarios). La fisiología de los peces está condicionada por factores físicos y químicos del medio ambiente; cuando existe una alteración (por ejemplo, por contaminación urbana o falta de oxígeno) los peces pueden ser más susceptibles a enfermar (Kinkelin *et al.*, 1985). En la mayoría de los casos, las enfermedades ocurren como resultado de una interacción entre el patógeno, el pez y el estrés ambiental (Serrano *et al.*, 2014).

Cuando los peces enferman se da un grupo de anomalías en su comportamiento ya que se presentan signos y alteraciones de su integridad corporal, así como lesiones. Todo esto supone un descenso en los rendimientos de crecimiento y reproducción de los individuos y pueden inclusive provocar la muerte de los sujetos afectados (Pérez Ponce de León *et al.*, 1996). Conocer organismos responsables de las afecciones en su salud es de gran importancia, sobre todo en el caso de especies de peces dulceacuícolas que se consumen con frecuencia (Insaurralde, 2013).

2.3.1. Agentes causales de enfermedades

Las bacterias, los hongos, los virus y los parásitos son capaces de producir enfermedades en peces por tres vías fundamentales: digestiva, respiratoria, y transcutánea. De estas, la vía respiratoria es la principal puerta de entrada para estos agentes patógenos, ya que la superficie branquial es recorrida por una corriente de agua, bajo una ligera presión, que ponen en contacto el sistema circulatorio con todos los elementos en suspensión en el medio acuático (Guzmán y Salinas, 1988). Los microorganismos que se desarrollan como resultado del agua contaminada con desechos, así como otros factores bióticos y abióticos pueden causar lesiones externas en peces (Kinkelin *et al.*, 1985).

Los peces pueden ser generalmente afectados en edades tempranas (larvas y alevines) por parásitos y sobre todo por bacterias (Rubio *et al.*, 2010). Es probable que un mayor número de enfermedades prevalezca con el incremento de los vertimientos de aguas residuales que constituyen uno de los vehículos por el cual llegan los microorganismos a estos animales de vida libre en ambientes acuáticos como los ríos (Villagomez y Benavides, 2012).

2.3.1.1. Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que intervienen en varios ciclos biológicos de importancia pero además, pueden ser de carácter patógeno para otros seres vivos (Ceballos, 2014). Los peces pueden ser afectados por bacterias patógenas cuando éstos se encuentran ante condiciones de estrés. Las bacterias patógenas en peces son capaces de producir lesiones en diversos tejidos. Se encuentran en órganos internos, músculos, piel, branquias o aletas. Estos microorganismos normalmente se desarrollan en un rango de pH variable, generalmente entre 6 y 9, la mayoría son aerobios o anaerobios facultativos y crecen a una temperatura entre 20 y 30 °C (Guzmán y Salinas, 1988). Se han encontrado bacterias Gram negativas y móviles afectando a peces como las tilapias y carpas, entre otros (Leal *et al.*, 2009).

Las bacterias que se encuentran en los peces de aguas tropicales son generalmente mesófilas. Los peces que habitan en aguas dulces presentan una microbiota propia del agua donde se desarrollan. Entre los géneros de bacterias más comúnmente identificados están: *Aeromonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Alcaligenes* sp. y *Streptococcus* sp. (Escobar *et al.*, 2006). En peces dulceacuícolas bajo condiciones de estrés ambiental se encuentran con frecuencia *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. y *Vibrio* sp. principalmente (Alcaide *et al.*, 2002).

La microbiota bacteriana de los peces está determinada entre otros factores por la temperatura, la profundidad del agua en que se desarrollan y el grado de contaminación del cuerpo donde se encuentran (Guzmán y Salinas, 1988). En la literatura se refiere que suelen encontrarse géneros Gram negativos capaces de sobrevivir por debajo de los 5 °C (psicrófilos) como *Pseudomonas* sp., *Shewanella* sp., *Moraxella* sp., *Acinetobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Vibrio* sp. y *Aeromonas* sp.. Entre los géneros Gram positivos que pueden encontrarse se encuentran *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp. y *Corynebacterium* sp. (Negrete y Romero, 2004).

En México, el género *Aeromonas* sp. se ha aislado a partir de diversos peces de cultivo destinados para consumo humano y de ornato. En particular, la especie *Aeromonas hydrophila* se ha obtenido de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Constantino *et al.*, 1997), pez dorado (*Carassius auratus auratus*) (Negrete y Romero, 2004), charal (*Chirostoma humboldtianum*) (Paniagua *et al.*, 2006) y tilapia (*Oreochromis aureus*; *O. niloticus niloticus*)

(Constantino *et al.*, 1997). Géneros como *Citrobacter* sp. y *Enterobacter* sp. se han reportado como patógenos de peces asociados a mortalidades bajo condiciones de cultivo (Hansen *et al.*, 1990). *Flavobacterium* sp. se ha asociado con epizootias de infecciones en las agallas, mientras que *Pseudomonas* sp. se relaciona con enfermedades en huevos, piel, agallas e intestino (Negrete y Romero, 2004). Debido al interés comercial, los estudios de identificación bacteriana en peces en México se han realizado primordialmente en los últimos años en granjas acuícolas (Lara-Flores *et al.*, 2013) donde el crecimiento se encuentra en condiciones controladas (Fitzsimmons, 2000).

Los peces del Ayuquila son de interés alimentario para los pobladores de la región debido a que representan una de sus fuentes de proteínas más cercana y asequible. Por eso la necesidad de identificar las posibles bacterias que se encuentran en estos vertebrados y conocer las enfermedades que podrían producir a las poblaciones de consumidores.

2.3.2. Principales enfermedades bacteriológicas de los peces y sus manifestaciones clínicas

Las enfermedades causadas por patógenos oportunistas se encuentran entre las más peligrosas para los peces (Escobar *et al.*, 2006). Entre los padecimientos causados por bacterias de alto riesgo está la penibacteriosis (enfermedad del riñón, causada por *Renibacterium salmoninarum*). También existen enfermedades bacterianas de menos riesgo como la forunculosis, así como la septicemia causada tanto por bacterias del género *Aeromonas* sp., y *Pseudomonas* sp. respectivamente y la vibriosis por el género *Vibrio* sp. Todas estas son enfermedades comunes en México (Guzmán y Salinas, 1988).

La estreptococosis y la micobacteriosis que suelen afectar también a los peces se producen por especies de los géneros *Streptococcus* sp. y *Mycobacterium* sp. respectivamente. Otra enfermedad de importancia es el síndrome de la septicemia hemorrágica bacteriana (Álvarez-León, 2007). Esta enfermedad, por ejemplo, ha causado pérdidas del 5 al 100% en tilapias que se cultivan en agua dulce y salobre. La aparición de esta enfermedad se encuentra asociada con la mala calidad físico- química del agua en la mayor parte de los casos. Este padecimiento es provocado bajo condiciones de estrés por algunas especies bacterianas como *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Vibrio* sp. (Guzmán y Salinas, 1988).

Entre las manifestaciones de enfermedades bacterianas en peces están las alteraciones del comportamiento que afectan principalmente a las funciones de relación y de nutrición. Las primeras trastornan el equilibrio estático o locomotor, el mimetismo y el dinamismo del animal que oscila entre la hiperexcitabilidad y la postración (Leal *et al.*, 2009).

Las infecciones bacterianas también pueden manifestarse mediante lesiones externas. Estas pueden afectar el estado general y las proporciones corporales (Ej.: estado de conformación, malformaciones, deformaciones) y pueden manifestarse como presencia de cuerpos extraños sobre el cuerpo, la presencia de secreciones (moco), y descamaciones (El-Sayed, 2006). Además de los cambios de pigmentación, la aparición de hemorragias subcutáneas y la coloración branquial son características de algunas enfermedades microbianas. En ocasiones pueden observarse manifestaciones ulceronecroticas de los tegumentos (Guzmán y Salinas, 1988).

Como ya se ha mencionado, los agentes infecciosos que afectan a peces se encuentran estrechamente influenciados por el medio ambiente y pueden variar dependiendo del hábitat de la especie. Bacterias indicadoras de la contaminación son raramente encontradas en el pescado recién capturado, excepto si se ha obtenido de aguas excesivamente contaminadas (Rey *et al.*, 2002). En ocasiones, las afectaciones microbianas de los peces también pueden ocasionar padecimientos en los humanos (Cruz-Leyva *et al.*, 2014).

2.3.2.1. Influencia en la salud pública

Se han reportado diversos casos de enfermedades microbianas que, derivadas de los peces, han afectado a los seres humanos. Por ejemplo, en el año 1980, *Streptococcus viridans* se consideró como el agente etiológico de la meningoencefalitis aguda que afectaba a peces como tilapias de cultivo en Israel, Taiwán y los Estados Unidos (Eldar *et al.*, 1994; Eldar *et al.*, 1995), causando una alta tasa de mortalidad entre los animales. El primer reporte que se realizó por afectaciones de esta bacteria en humanos (en forma de celulitis aguda), ocurrió en Texas (EUA) en 1991. Seguidamente se dio otro caso en Ottawa (Canadá) en 1994 (Centers for Disease Control and Prevention, 1996). Más tarde entre 1995 y 1996, se identificó que la afectación a humanos no solo se daba por *Streptococcus viridans*, sino también por *Streptococcus iniae*. El brote de estos casos en humanos fue ligado a la manipulación que antes del comienzo de la enfermedad los pacientes habían hecho con filetes contaminados de

pescado. Con base a estos estudios y otros cinco casos en Canadá, se concluyó que dichas bacterias no son solo capaces de afectar la salud de peces como las tilapias y cetáceos como los delfines, sino que también pueden ser transmitidas al hombre causando enfermedades infecciosas de gravedad variable (Weinstein *et al.*, 1997).

Muchas bacterias constituyen patógenos potenciales ante una baja de las defensas orgánicas de los peces y pueden ser transmitidas al hombre a través del consumo de peces que se desarrollan en agua dulce contaminada (Cruz-Leyva *et al.*, 2014). Por eso es que se plantea que los peces pueden actuar como intermediario de las enfermedades en humanos.

2.4. Calidad microbiológica del agua

El agua es el líquido vital para todos los seres vivos en el planeta. Su contaminación microbiana y química puede causar numerosas afectaciones a la salud humana (Alba *et al.*, 2013). En México el 86% del agua disponible es utilizada en la agricultura, el 11,1% se emplea en abastecimiento público y el 3,1% en la industria. Derivados de estos usos se obtienen 14 km³/año de aguas residuales, de las cuales el 43,8% proviene de las descargas industriales y el resto de los efluentes municipales y agrícolas. Aunque existe tratamiento de aguas en un gran número de poblaciones a nivel nacional, se estima que el 47.2% de las aguas residuales son vertidas sin tratar a los ríos (CONAGUA, 2015).

El examen de la calidad microbiológica del agua tiene por objetivo identificar ciertos grupos bacterianos que revelen una contaminación reciente por material fecal o materia orgánica (Valenzuela *et al.*, 2009). Determinar la presencia de bacterias patógenas en agua suele ser una tarea complicada porque el análisis implica varios días de trabajo, costos elevados, personal adiestrado, laboratorios especializados, así como gastos de recursos y tiempo (Romeu, 2012). Por ello también, para realizar una evaluación rápida y fiable de este grupo microbiano, se utilizan microorganismos indicadores, cuya concentración puede estar relacionada cualitativamente con la enfermedad que producen (Arcos *et al.*, 2005).

El indicador bacteriano de contaminación fecal más utilizado para determinar la calidad microbiológica del agua es *Escherichia coli* (Tallón *et al.*, 2005). Su presencia señala contaminación de origen fecal reciente. Además, pueden encontrarse asociados otros microorganismos como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes* Otras

especies viven de forma natural en el medio acuático como: *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Moraxella* sp., *Chromobacterium* sp., *Achromobacter* sp. y *Alcaligenes* sp. (Aydin, 2007).

Es importante cuando se van a realizar análisis respecto a la calidad del agua tener en cuenta parámetros físico-químicos como el pH, la temperatura, oxígeno disuelto entre otros ya que pueden aportar información valiosa respecto al tipo de hábitat en el que vive el pez y por tanto referente a los microorganismos que allí pueden encontrarse (Salazar y Flores, 2013).

2.5. Identificación microbiana

Cuando se realiza la asignación de un taxón a una bacteria es que se habla de identificación microbiana. Existen diversos procedimientos para desarrollar la identificación. Para ello, se tienen que determinar las características fenotípicas y/o genotípicas de la cepa y hacer la comparación de éstas con la de los diferentes taxa de la clasificación considerada. Dependiendo del tipo de bacteria serán las características que se determinarán ya que cada género y especie presentan sus particularidades (Ryan y Ray Sherris, 2011).

Para poder realizar la correcta identificación de los taxa bacterianos, es necesario obtener un cultivo puro. Este cultivo, previamente tratado con la tinción de Gram puede ser entonces identificado considerando su forma de agrupación, la forma de las bacterias y su respuesta ante la tinción (Allen, 2006). Más allá de esta identificación inicial, pueden llevarse a cabo procesos más precisos para poder asegurar la identificación bacteriana; estas pruebas se pueden lograr a través de ensayos bioquímicos (MacFaddin, 2003), de Sistemas API (Analytical Profile Index) o utilizando técnicas moleculares.

2.5.1. Pruebas bioquímicas para la identificación presuntiva bacteriana

Las llamadas pruebas bioquímicas convencionales (ensayos bioquímicos) generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no. Existen diferentes sistemas que facilitan la realización de tales ensayos porque proponen el mejor conjunto de pruebas bioquímicas para la identificación de un grupo bacteriano ya que

se simplifica la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico. Además existen en el mercado los reactivos listos para su uso (Allen, 2006).

2.5.2. Sistema de identificación rápida de bacterias (API)

El Índice Analítico de Perfil o como se le conoce comercialmente el sistema API (Analytical Profile Index) es un sistema semiautomático de identificación que se encuentra estandarizado para realizar la identificación mediante el uso de un test bioquímico y una base de datos. Ha sido empleado para la identificación de bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras. Comparativamente con los métodos tradicionales que se desarrollan a nivel de laboratorio, es una herramienta que presenta numerosas ventajas en cuanto a tiempo, material y esfuerzo (Becerra y Horna, 2016).

Existen diversos sistemas API en el mercado. El sistema API 20 E es utilizado para la identificación de las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Representa una galería conformada por 21 pruebas bioquímicas en miniatura con distintos sustratos deshidratados (O'Hara, 2005). Para inocular cada cepa bacteriana en el API es necesario realizar la estandarización del inóculo y estar completamente seguros mediante pruebas confirmatorias que se realizan previamente de que estamos en presencia de la familia de las enterobacterias. Una vez que se incuba cada prueba con el inóculo según las indicaciones del fabricante, finalmente para su lectura, se obtienen nueve dígitos que constituyen el perfil numérico que se introduce en el Software encargado de revelar la posible identificación de la bacteria con la que se está trabajando (Devenish y Barnum, 1980; Turki *et al.*, 2013).

2.5.2.1 Estandarización de inóculos: Escala de McFarland

Para analizar una muestra determinada mediante el sistema API, se debe estandarizar su inóculo. Para ello se utiliza una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de McFarland). El estándar de McFarland de 0.5 tiene una turbidez comparable a una suspensión bacteriana que contiene 1.5×10^8 UFC/mL. Se prepara al agregar 0.5 mL de BaCl_2 0.048 M (1.175% P/V $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99.5 mL de H_2SO_4 , 0.18 M (0.36 N) (1% V/V). La densidad correcta del estándar se verifica usando un espectrofotómetro. Se dice que la absorbancia a 625 nm debe ser de 0.08 a 0.10, para el estándar 0.5 de McFarland (Murray *et al.*, 2007).

Una vez que se han preparado las suspensiones, se distribuyen en 4-6 mL dentro de tubos similares a los usados para la preparación de los inóculos y se mantienen guardados a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Los tubos se deben sellar estrechamente al ser preparados para evitar la evaporación de la suspensión. Algunos autores plantean que se deben agitar vigorosamente con vortex o manualmente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea (Atlas y Snyder, 2011).

2.5.3. Pruebas moleculares

Hoy día para la identificación de microorganismos como las bacterias, es ampliamente utilizada la taxonomía polifásica que no es más que la combinación de los métodos convencionales como las pruebas bioquímicas y los de biología molecular (Rives *et al.*, 2007). Entre las herramientas que se utilizan para los análisis moleculares se encuentran la extracción de ácidos nucleicos como el ADN y la secuenciación de genes (Henríquez *et al.*, 2002).

Para conocer la calidad, cantidad y pureza de la muestra de ADN se realiza la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), la cual ha sido utilizada para la detección de algunos agentes patógenos y tiene numerosas aplicaciones en los laboratorios donde se realizan investigaciones moleculares (Joshi y Deshpande, 2010). La PCR simula *in vitro* el proceso de la replicación del ADN y se utiliza para realizar una amplificación de una secuencia específica de este ácido nucleico (Saiki *et al.*, 1988). A través de una reacción se emplea la enzima ADN polimerasa y dos cebadores de extensión (primers), los cuales sintetizan el fragmento de ADN específico de una secuencia de ADN molde, así como magnesio y agua (Bartlett y Stirling, 2003).

Por otro lado, para separar moléculas como los ácidos nucleicos se utiliza la electroforesis donde el principio se basa en el movimiento que presentan estas moléculas en una fase líquida que es sometida a la acción de un campo eléctrico dependiendo de la carga que poseen (Peña-Castro *et al.*, 2013). El ADN es un polímero que presenta carga negativa unido por enlaces covalentes fosfodiéster y por tanto migrará al polo positivo. El proceso tiene lugar en una matriz sólida de agarosa y algunos autores plantean que es accesible debido a su bajo costo y la diversidad de diseños de cámaras donde tiene lugar (Brody y Kern, 2004).

La secuenciación es una herramienta molecular que se realiza para conocer exactamente cuál es el orden de los nucleótidos del ADN. El método por terminadores dideoxi es el más exitoso y por primera vez fue puesto en práctica por Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Es un proceso donde se utilizan nucleótidos modificados con la ausencia del extremo 3'OH, que es el grupo esencial para la polimerización por la ADN polimerasa. Al incorporar un dideoxinucleótido, queda un trozo trunco de ADN que puede ser separado electroforéticamente. El orden de los nucleótidos en el ADN se puede determinar si las bases nitrogenadas se marcan con una molécula fluorescente diferente (Peña-Castro *et al.*, 2013).

3. MÉTODOS

3.1. Área de estudio

Para llevar a cabo la colecta de organismos y el análisis de calidad de agua para este trabajo se seleccionaron tres puntos de muestreo, Corcovado, Palo Blanco y Achacales localizados en el canal principal del río Ayuquila en el Estado de Jalisco, México (Fig. 4). El primero constituyó el punto de control de la investigación, mientras que los otros dos sitios fueron los puntos de contraste.

El punto Corcovado está ubicado aguas arriba de un valle de producción agrícola, a la salida de un cañón y se caracteriza por una vegetación de ribera en relativamente buen estado. La existencia de zonas de rápidos, pozas y pendientes son poco uniformes. Las aguas se mueven de formas rápidas, de transición y no son tan profundas. El ancho es aproximadamente de 7 metros. Palo Blanco está río abajo de Corcovado en el Ayuquila y posee una vegetación ribereña afectada por actividad antropogénica. Cuenta con zonas de corrientes rápidas por lo general y las aguas son más profundas en algunos lugares respecto al punto anterior. Aproximadamente presenta de 3 a 4 metros de ancho. Por su parte, Achacales posee una vegetación de ribera en buen estado, abundante. Tiene zonas de rápidos también y pozas poco uniformes. Las aguas se mueven rápido aunque cuenta con un brazo donde el agua está tranquila en la cual se logró la captura de varios peces. Tiene lugares irregulares más profundos que otros y el ancho es de 10 metros aproximadamente. En el sustrato de fondo en los tres puntos de muestreo se observó arena y algo de gravas.

En cada uno de los sitios, utilizando un multímetro se midieron los parámetros físico-químicos: temperatura, pH, oxígeno disuelto medido en porcentaje y partes por millón, conductividad eléctrica, sólidos totales disueltos (TDS), salinidad, presión y turbidez con el objetivo de analizar si estos, influyeron en los aislamientos realizados. La ubicación de cada punto aparece en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Geoposición Satelital (GPS) de los sitios de estudio en el río Ayuquila, Estado de Jalisco, México

Estaciones de muestreo	Longitud	Latitud	Metros sobre el nivel del mar
Corcovado	104° 17'20''	19° 51'24''	912
Palo Blanco	104° 10'40''	19° 44'30''	860
Achacales	104° 08'40''	19° 42'15''	856

3.2. Plan de muestreos

La parte experimental de la tesis se dividió en dos etapas: el período de secas y el período de lluvias del año 2015. La primera comprendió los meses de febrero, marzo y abril, mientras que la segunda los de julio, septiembre y octubre. Se eligieron con el objetivo de verificar la influencia de las lluvias en las concentraciones microbianas que aparecen en el agua del río. Es de aclarar que en la temporada de lluvia hubo crecida del río lo que pudo influir en la dilución de las muestras. En cada etapa se desarrolló exactamente el mismo trabajo de campo y laboratorio, descrito a continuación.

3.3. Muestreo en campo

El primer paso en cada evento de muestreo consistió en recolección de peces y aguas para identificar las posibles bacterias patógenas o no, presentes en cada sitio del afluente.

3.3.1. Recolección de las muestras de peces

Las muestras de peces y aguas se tomaron en horarios de la mañana y tarde, entre las 8:15 am y las 3:45 pm. Los peces se pescaron con atarraya en tres sitios del mismo punto del río, separados por transectos de 200 m y se transportaron al laboratorio en hieleras con agua de río para garantizar su conservación; esto permitió que los peces se mantuvieran en un medio lo más parecido a su hábitat, con el objetivo de no crear condiciones de estrés que pudieran influir en los resultados obtenidos. Se trató de coleccionar la mayor cantidad posible de individuos en cada evento de muestreo. Para la identificación de los ejemplares se utilizaron las claves de peces de Álvarez del Villar (1970) y Miller (2005). Una vez en el laboratorio y durante las

24 h $\pm$ 2 h posteriores a su captura, fueron sacrificados, disectados y analizados. Se midieron sus longitudes con regla milimetrada (longitud total) y se pesaron en una balanza analítica (g).

3.3.2. Recolecta de las muestras de agua

Durante los mismos eventos de recolecta de peces, se realizaron tomas de muestras de agua en cada uno de los sitios. En total, se realizaron nueve tomas de muestras de agua mensuales, tres por cada uno de los tres puntos de muestreo. Las mismas se tomaron mediante la técnica del hisopo de Moore (Barrett *et al.*, 1980). Los hisopos se introdujeron en el río de forma que quedaran entre 2 y 10 cm de profundidad con 1 h de exposición al curso del agua. Seguidamente se colocaron en recipientes de cristal previamente esterilizados de 350 mL de capacidad con tapa de rosca.

En cada sitio, se colectó una muestra de agua para cada uno de los medios de cultivo. Se utilizaron tres frascos de cristal con una capacidad de 200 mL: dos con los medios líquidos de pre-enriquecimiento Caldo de Tioglicolato y Agua de Peptona con 0.5% W/V de NaCl y el otro solamente con agua del río. Este último se utilizó para realizar el análisis de concentración de los coliformes. Se adicionó el NaCl con el objetivo de buscar posibles géneros bacterianos que se caracterizan por crecer en condiciones de alta salinidad (Villota, 2014). Los frascos con los medios de cultivos se transportaron en hieleras a una temperatura de 4 °C hasta llegar al laboratorio para garantizar su conservación. Ya en el laboratorio las muestras con los medios de cultivos líquidos se incubaron a 37 °C durante 24 $\pm$ 2 h. Las muestras de agua por su parte fueron examinadas inmediatamente al llegar al laboratorio dentro de las 12 horas siguientes a su colecta (Romeu, 2012). En total se tomaron 54 muestras de las cuales 18 se destinaron para la cuantificación de los coliformes y las otras 36 para la identificación de cepas bacterianas en el agua.

3.4. Determinación de la presencia de *E. coli*, bacterias coliformes totales y otras de interés ambiental

3.4.1. *E. coli* y bacterias coliformes totales

Una vez que se colocaron a temperatura ambiente las muestras de agua del río en el laboratorio, la presencia de microorganismos coliformes fue confirmada utilizando placas de Petrifilm (3M™ Petrifilm™, México, DF) (Schraft y Watterworth, 2005). Estas placas son

sistemas de medios de cultivos listos para ser usados y que tienen aplicación en el análisis de muestras ambientales y de alimentos. Están elaboradas de un papel especial que contiene en una de sus partes los nutrientes del medio Violeta Rojo y Bilis Glucosa (VRBG) modificado, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador que facilita la enumeración de colonias. Se tomó un mililitro de cada muestra y se depositó en el centro de cada placa. Seguidamente se incubó cada placa a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 2 h.

Para la interpretación de los resultados según la guía del fabricante, se consideraron como colonias coliformes totales a las de color rojo y con producción de gas, mientras que las cepas de *E. coli* produjeron gas igualmente pero fueron de color azul violáceo (Schraft y Watterworth, 2005). Se realizó el conteo de todas las cepas que crecieron. Las placas Petrifilm se leyeron con un contador de colonias standard. De cada muestra de agua, se realizaron tres réplicas completando así un total de 54 placas para las lecturas.

3.4.2. Otras bacterias de interés ambiental

Posterior a la incubación de los hisopos de Moore, se tomó un mililitro de cada muestra recolectada y se sembró en los siguientes medios selectivos: Agar TCBS, Agar Sulfito de Bismuto, Agar Salmonella-Shigella, Agar McConkey y en Agar Nutritivo (BIOXON, México). Este último medio de cultivo sólido, se utilizó además para un hacer un cultivo no específico ni selectivo con el objetivo de obtener todas las cepas posibles que se encontraban en el agua. Los medios de cultivo se colocaron en placas de Petri estériles de 47 mm. Cada mililitro de muestra se extendió sobre el medio de cultivo con espátula de Drigalsky por cada placa y con condiciones de incubación de 24 ± 2 h, a una temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$. En todos los casos, se realizaron tres siembras a partir de cada muestra por medio de cultivo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la descripción de las cepas que crecieron en cada medio de cultivo se realizó teniendo en cuenta los aspectos morfológicos que aparecen en el Manual del Bergy (Bergy, 2001).

3.5. Determinación de la presencia de microbiota bacteriana en peces

Pasadas las 24 h de la recolección de peces, se les dio muerte a estos mediante un shock térmico con bolsas de geles congeladas que se les pusieron en las hieleras en las cuales fueron transportados al laboratorio. Esto se realizó con la finalidad de que se mantuvieran lo

más intactas posibles las estructuras internas para su análisis. Seguidamente se enumeró cada pez en orden creciente por cada punto de muestreo, y se pesó (g) y midió (longitud total) (mm). A simple vista cada pez se analizó para verificar si presentaba lesiones externas en la piel o aletas por afectaciones de organismos presentes en las aguas de donde se pescaron. Luego se diseccionó cada ejemplar y se tomaron 10 g de tejido que incluía intestinos, branquias, hígado, músculo y huevos en el caso de las hembras para enriquecerlo por unos minutos manualmente en 90 mL de agua de peptona, contenidos en vasos de precipitado de 200 mL. La finalidad de esta técnica fue obtener la mayor cantidad de microorganismos suspendidos en la solución.

A partir de las muestras obtenidas se prosiguió a la obtención de bacterias en general pasando un mililitro de la muestra a cada medio (ver sección anterior). Se mantuvieron las condiciones de esterilidad en flujo laminar y se utilizó para cada pez un juego de guantes y navaja nuevos durante la manipulación y procesamiento. Entre cada análisis se limpió el flujo laminar con alcohol al 70 % v/v para garantizar la sanitización de la zona de trabajo para evitar contaminación cruzada.

3.6. Aislamiento e identificación inicial de microorganismos en muestras de peces y agua

Para el aislamiento e identificación de las bacterias, se aislaron todas las cepas que crecieron en los medios de cultivo. Se realizaron análisis morfológicos y culturales al microscopio óptico y estereoscopio según las características descritas en el Manual del Bergy para descartar los aislamientos que tuvieran semejanzas con el objetivo de trabajar con las cepas que fueran realmente diferentes. Una vez que se logró determinar la cantidad total de unidades formadoras de colonias (UFC) diferentes, se prosiguió con la purificación de cada una al sembrarlas por agotamiento de estrías (Fig.5) en el medio Agar de Soya Tripticaseína (AST) (Becton, Dickinson and Company, France). Estas placas se incubaron a 24 ± 2 h, a una temperatura de 37 ± 1 °C. Las colonias aisladas se caracterizaron de acuerdo a los aspectos morfológicos y tintoriales a través de la tinción de Gram (Allen, 2006), y seguidamente fueron caracterizadas presuntivamente mediante pruebas bioquímicas (ver sección 3.6.1, abajo). Para confirmar los resultados obtenidos, se utilizó el sistema API 20E (Biomereux® FR) para enterobacterias (ver sección 3.6.2) (Apéndice 1).

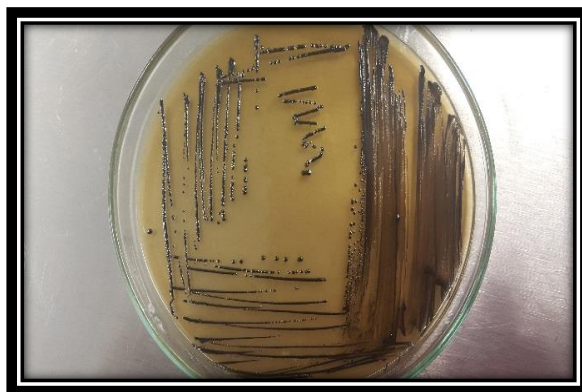


Figura 5. Siembra por agotamiento de una de las cepas aisladas en el muestreo. Medio Sulfito de Bismuto luego de ser incubado a 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 h. Fuente de la autora.

3.6.1. Pruebas bioquímicas para identificación presuntiva

A cada una de las cepas puras se le realizaron las pruebas específicas de: Gram, catalasa, oxidasa, fermentación de la glucosa, lisina, utilización del citrato, motilidad, producción de ácido sulfúrico (H_2S) e indol, la descarboxilación o desaminación de la ornitina, rojo de metilo y Voges Proskauer. Estas pruebas bioquímicas permiten un primer nivel de identificación. La interpretación de cada una tiene características específicas, lo que aparece reflejado en el Apéndice 2 (Allen, 2006).

3.6. 2. Pruebas de identificación según el sistema API 20E

Para la realización de la identificación por medio del API fue necesario estandarizar el inóculo para cada reacción. Lo anterior garantizó que en cada una de las pruebas de las galerías API se tuvo la misma cantidad aproximada de microorganismos inoculada. La estandarización del inóculo se realizó mediante la escala de McFarland. Se mezclaron los volúmenes de $BaCl_2$ (1,175% W/V) y de H_2SO_4 (1% V/V) que aparecen en el Apéndice 3. De esta forma quedaron preparados los estándares con el objetivo de construir la curva de calibración (densidad óptica vs. estándar de la escala) y se verificó que la pendiente se igualara a valores cercanos o igual a la unidad. Para el diseño de la curva, se tomaron alícuotas para cada uno de los estándares de la escala y se les midió la absorbancia en un espectrofotómetro con una longitud de onda $\lambda=600$ nm (Sequoia Turner, Modelo 340). Igualmente se realizaron tres réplicas en cada caso (Cuadro 2). Se promediaron las lecturas y se graficaron los resultados en Excel (Microsoft® 2013) para obtener la ecuación $y = mx + b$.

Cuadro 2. Estándar de McFarland con sus tres respectivas mediciones de absorbancias realizadas en un espectrofotómetro y su promedio correspondiente.

Estándar de McFarland	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio
0.1	0.010	0.009	0.007	0.0086
0.3	0.044	0.032	0.033	0.0363
0.5	0.051	0.059	0.056	0.0553
0.7	0.057	0.057	0.059	0.0576
0.9	0.079	0.088	0.088	0.085
1.1	0.108	0.108	0.107	0.1076
1.3	0.149	0.153	0.150	0.1506
1.5	0.163	0.158	0.163	0.1613

Una vez que se purificaron cada una de las cepas aisladas y que se construyó la escala de McFarland, se subcultivaron las cepas en medios de MacConkey y en Agar de Soya Trypticaseína para obtener cultivos jóvenes con un crecimiento entre 18 y 24 h para garantizar la viabilidad de la mayor parte de los microorganismos en cada colonia, así como observar el crecimiento en cada medio. La pureza de las cepas aisladas se comprobó mediante la tinción de Gram y se les realizó las pruebas de la catalasa y oxidasa (Apéndice 2) (Allen, 2006).

Para cada cepa se utilizó una galería API independiente que se colocó en su respectiva cámara de incubación. Cada galería se humedeció previamente con 5 mL de agua destilada. Seguidamente se tomó una azada de cada microorganismo y se inoculó en dos tubos de medio basal de OF (Becton, Dickinson and Company, France) en cada caso. A uno de ellos se le adicionó aceite mineral con una pipeta Pasteur estéril para lograr la anaerobiosis requerida. Luego se tomó una colonia de cada placa que se tenía con las cepas de interés en Agar de Soya Trypticaseína y se pasó a un tubo con solución salina (5 mL al 0,85% de NaCl W/V). Seguidamente se agitó la mezcla vigorosamente y se comparó con el estándar 0,5 de McFarland con el objetivo que ambos tuvieran la misma turbidez. Luego se procedió a inocular con la suspensión bacteriana ajustada según la escala, cada pocillo de la galería API con pipetas Pasteur evitando que quedara alguna burbuja en el fondo. En el caso necesario, según la prueba, se llenó el pocillo y la cúpula o se colocó aceite mineral. Luego se cerró cada cámara

húmeda y se puso a incubar a 36 ± 2 °C de 18 a 24 horas. Pasado el tiempo, se interpretaron los resultados, según el perfil numérico que se obtuvo como resultado de las reacciones.

3.6.3. Prueba molecular para identificación microbiana

Además de las pruebas a nivel de laboratorio y los sistemas API, se llevaron a cabo identificaciones de las cepas obtenidas utilizando el método molecular de secuenciación genética. Esta metodología suele brindar información mucho más precisa y rápida sobre la identidad los microorganismos (Tomalá, 2011). También constituyó una forma de corroborar los resultados previos obtenidos.

Para ello, de las cepas obtenidas, se tomó una asada y se puso a crecer mediante siembra por agotamiento en medio Luria Broth (siglas en inglés, "LB") con agar para obtener un cultivo fresco. Los componentes del LB son: 10 g/L de Peptona, 5 g/L de Extracto de levadura, 10 g/L de NaCl y 15 g/L de Agar Bacteriológico. Es un medio nutritivo rico utilizado para el crecimiento y mantenimiento de cultivos puros de diversos microorganismos a los que se les van a hacer análisis moleculares como las enterobacterias (López et al., 2013).

Los medios de cultivos con las cepas se pusieron a incubar a 24 ± 2 h, a una temperatura de 37 ± 1 °C. Seguidamente se les comprobó la pureza mediante la Tinción de Gram. Una vez pura la cepa, se tomó una asada y se pasó a 5 mL de caldo LB en tubo, ya que este es un medio enriquecedor y favorece el desarrollo de enterobacterias principalmente aunque pueden crecer otros microorganismos ambientales. Luego, el caldo LB con cada cepa se puso a incubar bajo las condiciones mencionadas anteriormente, agitando entre 150 y 200 rpm y se les comprobó una vez más la pureza antes de la extracción de los ácidos nucleicos totales.

3.6.3.1. Extracción de ácidos nucleicos totales

Para la extracción de los ácido nucleicos totales, se tomó de cada tubo que contenía caldo LB, 1.0 mL de medio con la cepa crecida y se colocó en un tubo de polipropileno con tapa de capacidad de 1.5 mL. Este tubo se tapó y pesó. Se preparó otro tubo con agua que tuviera el mismo peso para colocarlos en la centrifuga. Una vez pesadas todas las muestras, se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min y se decantaron los sobrenadantes en cada caso. Luego se agregó otro mililitro de medio, se taparon los tubos de polipropileno y se resuspendieron

los pellets de bacterias que se formaron en el fondo de cada uno. Este procedimiento se repitió varias veces hasta que se logró separar la totalidad del medio de cultivo.

Seguidamente se le agregó al precipitado de cada muestra 250 μL de agua desionizada estéril y se resuspendió agitando por inversión. Se utilizó un vortex para lograr la resuspensión completa. A las muestras se le agregó 250 μL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% y 0.2 g de perlas de lisis. Cada tubo se calentó a 65° C 10 min y se agitó otra vez en vortex durante 10 minutos a máxima velocidad. Los tubos se incubaron 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm durante 5 minutos.

El sobrenadante obtenido por cada muestra (alrededor de 500 μL) se colocó en un tubo limpio y se le agregó 500 μL de cloroformo. Para obtener el ADN es necesario lisar la célula por métodos como el de fenol-cloroformo- alcohol. Mediante este conjunto se eliminan impurezas que presenta el ADN y se remueven los productos de degradación, lo que conserva el ADN por mayores períodos de tiempo (Henríquez *et al.*, 2002). Se agitó el tubo durante 2 minutos en vortex y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos más. La fase acuosa (que se encontraba en la parte superior del tubo) se colocó en un tubo limpio. Se tuvo cuidado para no trasladar cloroformo junto con la fase acuosa. A cada tubo se le agregó un décimo de volumen de acetato de sodio a una concentración de 3.0M (alrededor de 50 μL) y el doble del volumen de etanol absoluto helado (alrededor de 1100 μL). El tubo se agitó por inversión suavemente y se incubó durante 20 min a -20° C. Seguidamente se centrifugó a 13 000 rpm durante 20 min a 10° C. Se eliminó el sobrenadante y se le agregó al tubo 700 μL de etanol al 70%.

Sin agitar ninguno de los tubos, estos se centrifugaron a 13 000 xg 15 min a 10° C. Posteriormente se eliminaron los sobrenadantes con una pipeta y se secaron al aire los contenidos que quedaron. Finalmente se resuspendieron en 50 μL de agua desionizada y se almacenaron a -20° C para el siguiente análisis.

3.6.3.2. Patrón de bandas electroforéticas.

Una vez extraídos los ácidos nucleicos totales de cada muestra, las cuales fueron identificadas desde la letra A hasta la X, se procedió a realizar un análisis electroforético para confirmar que se había obtenido en la cantidad adecuada para los posteriores análisis. De lo extraído por cada muestra, se tomaron 5 μL que se resuspendieron junto a 2 μL de Syber Green (colorante azul) en un pocillo para su análisis. Seguidamente se realizó la corrida de cada muestra en

electroforesis a través de un gel de agarosa al 0.5%. Se aplicó un voltaje de 30V y 110 mA por 40 minutos en Buffer TBE al 1X. Transcurrido el tiempo de corrida el gel fue expuesto a luz UV para observar las bandas de ácidos nucleicos obtenidas. Los tamaños (en pares de bases) correspondientes a las bandas fueron determinados por comparación directa con el marcador de peso molecular que se colocó como patrón en el primer pocillo de la electroforesis.

3.6.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para el siguiente paso hacia la identificación de las cepas aisladas, se llevó a cabo la PCR a partir de las muestras de ácidos nucleicos totales extraídos. Se hicieron diluciones 1:20 de todas las muestras y se utilizaron 2 µl para realizar la PCR utilizando los primers fD1 y rD1 (específicos para una región del gen ribosomal 16S) los cuales tienen la siguiente secuencia:

fD1. -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

rD1. -AAGGAGGTGATCCAGCC

Las PCRs se llevaron a cabo con un volumen final de 25 µl. Las concentraciones finales de reactivos fueron: Taq Buffer (solución Buffer) al 1X, 5 pmol de cada primer, 1.5 mM de MgCl₂ y 1U Taq Polimerasa. La reacción de termociclaje que es para que se puedan llevar a cabo las PCRs, consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95 °C (5 min), seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C (30 seg), alineamiento a 53 °C (30 seg) y extensión a 72 °C (90 seg). Finalmente se realizó una extensión a 72 °C (5 min). Las temperaturas utilizadas se determinaron como las más adecuadas gracias a ensayos previos.

3.6.3.4. Purificación del producto de la PCR

Los resultados de la PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%. Para la mayoría de las cepas con excepción de la F y la I, el producto único de aproximadamente 1500 pares de base (pb) se purificó utilizando las columnas de Bio-Rad (Quantum Prep PCR Klenn Spin columns, No. Cat 732-6300). De los productos de las cepas F e I, que mostraron bandas inespecíficas, se cortó del gel la que más se acercaba al peso esperado. Posteriormente se recuperó el ADN de esta banda con el Kit Wizard SV Gel and PCR clean up System (Promega, Cat No. A9281). Todos los productos purificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%

utilizando 2 de 23 µl de reacción para cargar el gel. Después de la electroforesis, los resultados de la purificación se visualizaron con luz ultravioleta.

3.6.3.5. Secuenciación e identificación de las bacterias

Para llevar a cabo la secuenciación se tomaron 25 µL de los productos purificados de ADN de cada una de las muestras y se enviaron a "MACROGEN", empresa localizada en Seul, Corea del Sur. La secuenciación se realizó mediante la técnica Sanger *et al.* (1977). Los amplicones obtenidos para cada uno de los aislados se secuenciaron en los dos sentidos 5' a 3' y 3' a 5', se revisaron y compararon con los electroferogramas obtenidos para determinar la limpieza y confiabilidad de la señal. Posteriormente las secuencias se analizaron por medio de los algoritmos tipo BLAST de dos bases de datos diferentes:

- a) National Center of Biotechnology Information (NCBI BLAST).
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- b) KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome). <http://www.kegg.jp/>

3.7. Análisis de los resultados

Se llevó a cabo un análisis t de Student en Origin Pro 8.5.1 entre las muestras de *E. coli* y de los coliformes totales en temporada de secas y de lluvias para verificar si existían diferencias significativas en las concentraciones de ambos grupos de bacterias entre las temporadas. También se realizó un ANOVA considerando a los tres sitios de muestreo, bajo la hipótesis de que todos los sitios en secas, así como en lluvias, tenían la misma concentración de los grupos microbianos antes mencionados. Para identificar cuales muestras fueron diferentes una de la otra, se realizó un análisis posthoc de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de las mediciones de los parámetros físico- químicos.

Los resultados de las mediciones de los parámetros físico-químicos de las aguas en los tres puntos Corcovado, Palo Blanco y Achacales del río Ayuquila aparecen representados en el cuadro 3.

En la figura 6 se observa que los parámetros que más influyeron en los muestreos de los tres puntos del río Ayuquila fueron el pH y el oxígeno disuelto debido a su alta variabilidad, mientras que el análisis de conglomerados para los mismos se aprecia en la figura 7. Se obtuvieron tres grupos. El primero y segundo agrupan a los puntos Palo Blanco y Achacales. En el tercero solo apareció Corcovado.

Cuadro 3. Parámetros físicos- químicos medidos en los puntos Corcovado, Palo Blanco y Achacales del río Ayuquilla, Jalisco, México. Los valores no mostrados se deben a que no se pudieron medir los parámetros por las crecidas del río debido a las precipitaciones.

Sitio de muestreo	Mes de muestreo	T (°C)	pH	Oxígeno D. (%)	Oxígeno D. (ppm)	Conductividad (µS/cm)	TDS (ppm)	Salinidad (mg/L)	Presión (mbar)	Turbiedad (NTU)
Achacales	Febrero	23.96	9.23	72.8	5.45	0.00	0.00	0.00	903.5	
Achacales	Marzo	19.79	7.74	54.7	4.5	532	266	0.26	916.7	72.1
Corcovado	Marzo	18.57	7.75	55.9	4.64	162	81	0.08	900.9	74.2
Palo Blanco	Marzo	20.27	7.27	2.2	0.17	657	329	0.32	905.1	88.8
Corcovado	Abril	19.34	8.15	88.8	7.23	140	70	0.07	898.6	
Palo Blanco	Abril	24.95	7.53	56.3	4.14	378	189	0.18	905.1	
Achacales	Julio	23.00	7.84	46.2	3.54	268	134	0.13	909.8	52.2
Corcovado	Julio	20.01	8.58	64.7	5.23	143	72	0.07	904.5	11.2
Palo Blanco	Julio	22.46	7.89	51.3	3.98	223	111	0.11	909.6	33
Corcovado	Septiembre	20.67	8.26	79.7	6.35	52	26	0.02	903.6	13.6
Palo Blanco	Septiembre	24.11	7.4	22.9	1.71	508	254	0.24	907.1	66.7
Corcovado	Octubre									125
Achacales	Octubre	22.52	8.01	8.5	0.65	185	93	0.09	908.5	169
Palo Blanco	Octubre	25.08	7.53	44.1	3.25	617	308	0.3	909.8	166

Leyenda:

TDS: Sólidos Totales Disueltos.

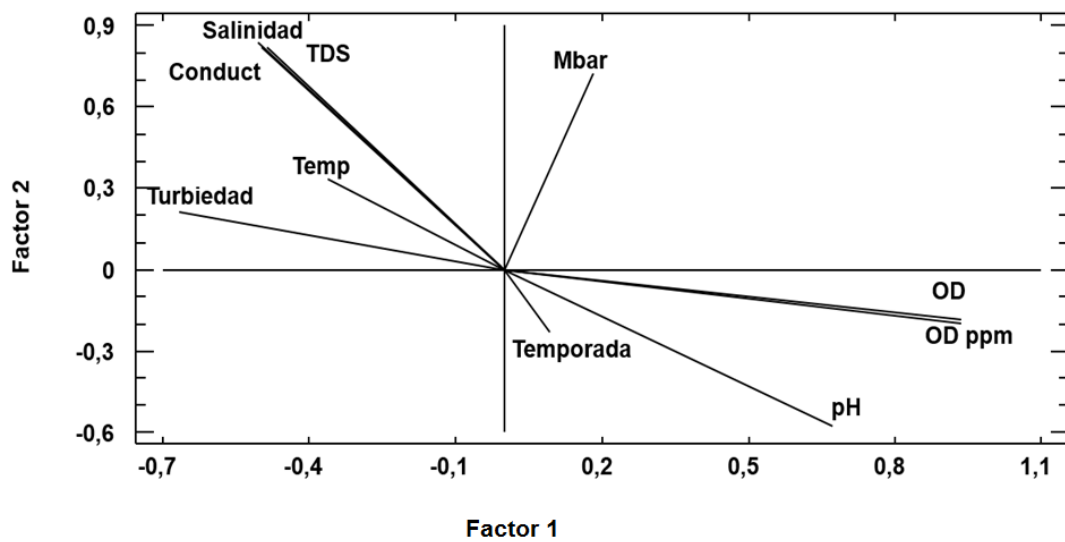


Figura 6. Análisis de factores de los parámetros físico-químicos en los puntos Corcovado, Palo Blanco y Achacales del río Ayuquila, Jalisco, México.

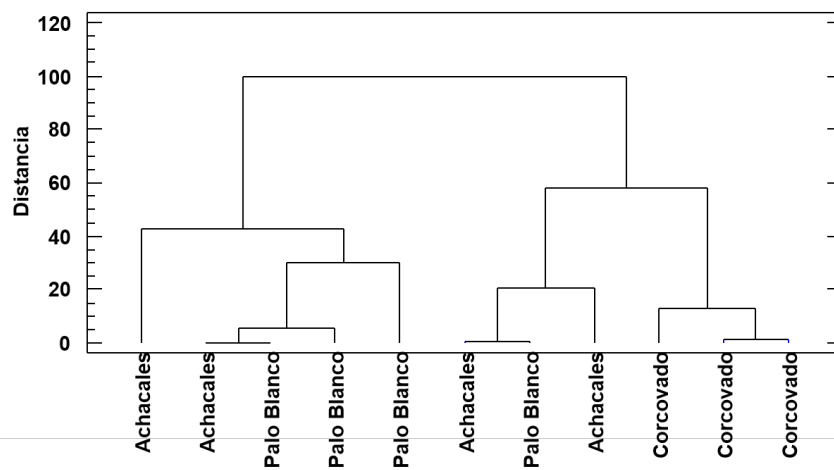


Figura 7. Análisis de conglomerados en los puntos de muestreo Corcovado, Palo Blanco y Achacales del río Ayuquila, Jalisco, México.

4.2. Análisis de las cantidades de *E. coli* y de coliformes totales en aguas del río Ayuquila.

A partir de las 18 muestras de agua tomadas para cuantificación en ambas temporadas de los tres sitios de muestreo, se observaron diferencias importantes en los valores de *E. coli* y coliformes totales (Cuadro 4). En Corcovado para la temporada de seca, los valores obtenidos de *E. coli* fueron 0 UFC/mL respecto a los otros dos puntos Palo Blanco y Achacales.

Cuadro 4. Valores de *E. coli* y coliformes totales (unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ mL)) observadas en muestras de agua provenientes del río Ayuquila (Jalisco, México) durante las temporadas de secas y lluvias del año 2015 en tres sitios de muestreo.

Temporada	Mes	Sitio	<i>E. coli</i> (UFC/ mL)	Coliformes totales (UFC/ mL)
Seca	Febrero	Corcovado	0	$2.8 \cdot 10^3$
Seca	Febrero	Palo Blanco	$1.6 \cdot 10^4$	$4.5 \cdot 10^4$
Seca	Febrero	Achacales	$9 \cdot 10^3$	$2.3 \cdot 10^4$
Seca	Marzo	Corcovado	0	$9.5 \cdot 10^3$
Seca	Marzo	Palo Blanco	$6.9 \cdot 10^3$	$3.57 \cdot 10^4$
Seca	Marzo	Achacales	$1.44 \cdot 10^4$	$3.42 \cdot 10^4$
Seca	Abril	Corcovado	0	$8.4 \cdot 10^3$
Seca	Abril	Palo Blanco	$1.68 \cdot 10^4$	$3.32 \cdot 10^4$
Seca	Abril	Achacales	$3.8 \cdot 10^3$	$8.6 \cdot 10^3$
Lluvia	Julio	Corcovado	$0.4 \cdot 10$	$1.34 \cdot 10^3$
Lluvia	Julio	Palo Blanco	$1.2 \cdot 10$	$2.24 \cdot 10^3$
Lluvia	Julio	Achacales	$1.8 \cdot 10$	$3.49 \cdot 10^3$
Lluvia	Septiembre	Corcovado	$0.2 \cdot 10$	$1.14 \cdot 10^3$
Lluvia	Septiembre	Palo Blanco	$1.3 \cdot 10$	$1.5 \cdot 10^3$
Lluvia	Septiembre	Achacales	$1 \cdot 10$	$1.62 \cdot 10^3$
Lluvia	Octubre	Corcovado	$0.3 \cdot 10$	$9.46 \cdot 10^2$
Lluvia	Octubre	Palo Blanco	$1.6 \cdot 10$	$2.46 \cdot 10^3$
Lluvia	Octubre	Achacales	$2.1 \cdot 10$	$5.89 \cdot 10^3$

De manera general, los valores obtenidos para *E. coli* en temporada de secas para los tres puntos de muestreo fueron superiores a los de la temporada de lluvias (Media para secas = 7055.55 UFC/ mL, desviación estándar = 6551.54; Media para lluvias = 11 UFC/ mL, desviación estándar = 6.83). Los análisis estadísticos realizados arrojaron que los niveles de *E. coli* y de

coliformes totales no fueron significativamente diferentes entre los tres sitios. Sin embargo, y de manera descriptiva, los valores de *E. coli* para la temporada de secas en el sitio Corcovado fueron de cero, mientras que los de las otras estaciones de muestreo fueron de $1.3 \cdot 10^4$ UFC/mL y de $9 \cdot 10^3$ UFC/mL para Palo Blanco y Achacales, respectivamente.

4.2.1. Relación entre las concentraciones de *E. coli* y coliformes totales

Las cantidades de *E. coli* y coliformes totales durante las temporadas de secas y de lluvias en los puntos de muestreo mostraron una relativamente fuerte relación lineal (Fig. 8). Al analizar el valor del coeficiente de correlación de Pearson ($r = 0.93$) se concluye que existe una correlación positiva alta de un 93% entre los coliformes totales y *E. coli* según el criterio planteado por Daza en el 2006 (correlación positiva muy alta cuando $r = 0.9-0.99$).

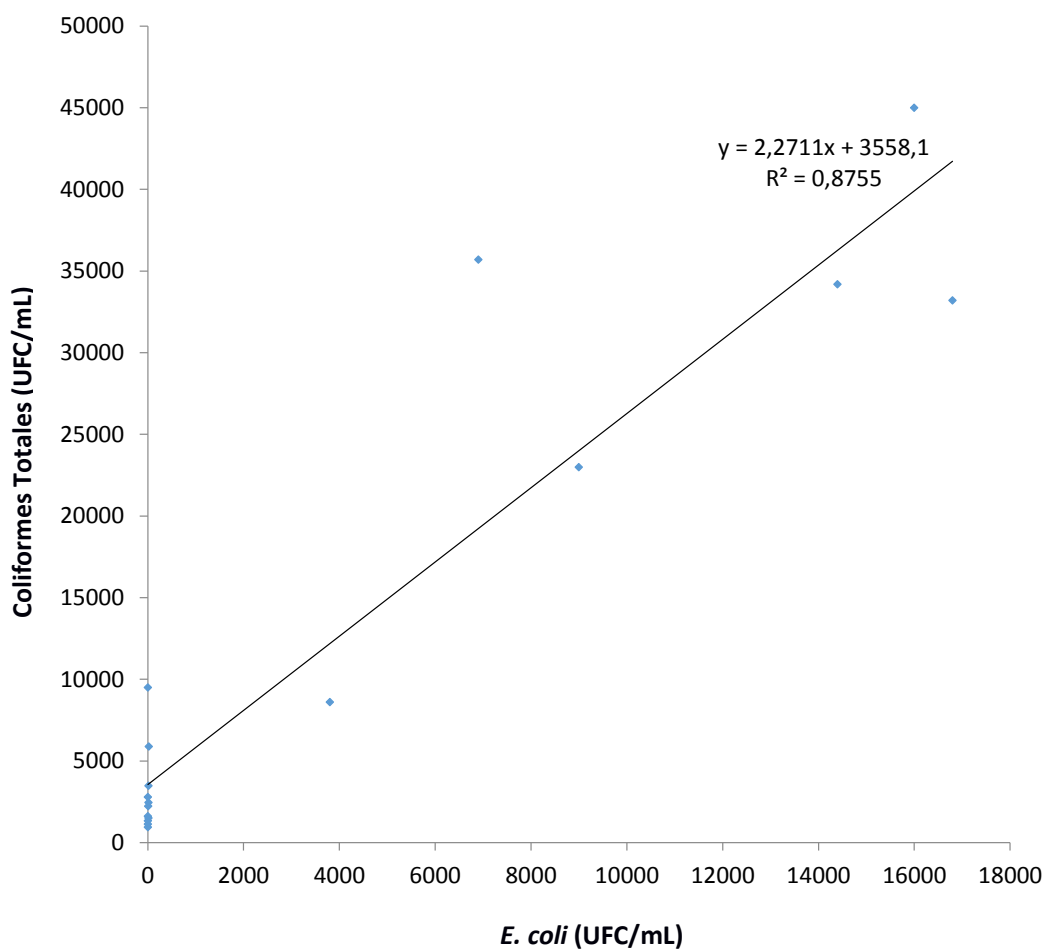


Figura 8. Relación entre los valores de coliformes totales y *E. coli* obtenidas de muestras de agua de río durante la temporada de secas y de lluvias en los puntos Corcovado, Palo Blanco y Achacales del río Ayuquila, Jalisco, México.

4.3. Aislamiento e identificación de bacterias presentes en peces y muestras de agua

Se obtuvieron un total de 128 muestras de peces y 18 muestras de agua para identificar las bacterias presentes en ambas temporadas de trabajo. A partir del cultivo de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras de peces y agua se lograron aislar 219 cepas diferentes (identificadas por los rasgos que presentaron a simple vista en cada medio específico). De ellas, 143 fueron obtenidas en el período de secas y 76 en el período de lluvias. Como resultado de los aislamientos, luego de realizar los análisis morfológicos y culturales al microscopio óptico y estereoscopio, se obtuvieron al inicio 24 UFC diferentes (Cuadros 5 y 6; Apéndice 4). Los análisis demostraron que dos de ellas (F y G) mostraron los mismos resultados ante las pruebas bioquímicas, por lo que se obtuvieron solo 23 UFC diferentes.

4.3.1. Identificación mediante pruebas bioquímicas y características morfo-culturales

Todos los aislados fueron identificados morfológicamente como bacilos o cocobacilos Gram negativos y no presentaron endospora bacteriana. Lo anterior permitió ubicar a 18 de ellos (78 %) en las familias específicas: Enterobacteriaceae (14 cepas), Flavobacteriaceae (una cepa), Pseudomonaceae (una cepa), Pasteurellaceae (dos cepas), mientras que los otros cinco (22 %) respondieron ante las pruebas como posibles integrantes en más de una familia Aeromonaceae, Pseudomonaceae o Vibrionaceae. De las 18 cepas, 11 (61 %) fueron identificados hasta los géneros *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Pasteurella* sp., *Proteus* sp., *Yersinia* sp. y 2 (11 %) se ubicaron en la especie *Proteus mirabilis*.

Los resultados de las pruebas bioquímicas y las características morfológicas para los 23 aislados, (F = G), se muestran en la cuadro 4. Las características culturales observadas aparecen reflejadas en el cuadro 6 y en el Apéndice 4.

Cuadro 5. Características morfológicas y respuesta a pruebas bioquímicas de las cepas aisladas de tejidos de peces y muestras de agua del río Ayuquila, Jalisco, México. Las diferentes letras en la parte superior están asociadas a cada una de las cepas a identificar. Los resultados positivos de las pruebas bioquímicas están identificados por el signo + y los negativos por el signo -.

Pruebas	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morfología	Ccb	Ccb	B	Ccb	B	Ccb	Ccb	Cc	Cc	B	Ccb	Ccb	B	B	Ccb	Ccb	Ccb	Cc	Cc	Cc	Ccb	Ccb	Cc	B
Endospora	-	-	-	-	-	-	-	b	b	-	-	-	-	-	-	-	-	b	b	b	-	-	-	-
Catalasa	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Fer. Glucose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	Des.	Des.	+	+
Lisina	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Motilidad	-	+	-	+/-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Prod. H ₂ S	-	+/-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	-	-	-
Indol	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Ornitina	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+/-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+/-
Rojo melilo	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
V-P	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+/-	-

LEYENDA: Ccb: Cocobacillos, B: Bacilos, Des.: Desaminación de la Lisina

Cuadro 6. Identificación bacteriana teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas y las características culturales obtenidas de las cepas aisladas a partir de las muestras de tejidos de peces y muestras de aguas del río Ayuquilia, Jalisco, México. Se tuvo en cuenta el Manual del Bergy para la identificación (Bergy, 2001).

Cepa	Características culturales	Familia/Género/ Especie
A	En medio Sulfito de Bismuto, colonia circular plana de color café brillante con borde entero	Enterobacteriaceae
B	En medio MacConkey, colonia circular elevada de color rosa de borde entero	Enterobacteriaceae, <i>Escherichia</i> sp.
C	En medio TCBS, colonia irregular elevada de color verde oscuro con borde entero	Enterobacteriaceae, <i>Klebsiella</i> sp.
D	En medio Sulfito de Bismuto, colonia circular plana de color café con borde entero	Enterobacteriaceae, <i>Klebsiella</i> sp.
E	En medio Salmonella-Shigella, colonia irregular plana de color beige con borde entero	Pseudomonaceae, <i>Pseudomonaceae</i> sp.; <i>Vibronaceae</i> , <i>Vibrio</i> sp.
F	En medio MacConkey, colonia rizoide plana de color rosa con borde lobulado	Enterobacteriaceae, <i>Citrobacter</i> sp.
G	En medio MacConkey, colonia rizoide plana de color rosa con borde lobulado	Enterobacteriaceae, <i>Citrobacter</i> sp.
H	En medio MacConkey, colonia circular elevada de color rosa brillante con borde entero	Enterobacteriaceae, <i>Citrobacter</i> sp.
I	En medio TCBS, colonia irregular plana de color verde con borde lobulado	Enterobacteriaceae, <i>Citrobacter</i> sp.
J	En medio TCBS, colonia irregular elevada de color amarillo claro con borde entero	Flavobacteriaceae
K	En medio MacConkey, colonia circular plana de color beige con borde entero	Pseudomonaceae, <i>Pseudomonaceae</i> sp.; <i>Vibronaceae</i> , <i>Vibrio</i> sp.
L	En medio TCBS, colonia puntiforme elevada de color verde oscuro y borde lobulado	Pseudomonaceae, <i>Pseudomonaceae</i> sp.; <i>Vibronaceae</i> , <i>Vibrio</i> sp.
M	En medio Salmonella-Shigella, colonia irregular plana de color beige con borde lobulado	Pasteurellaceae, <i>Pasteurella</i> sp.
N	En medio Salmonella-Shigella puntiforme elevada de color beige brillante con borde entero	Aeromonaceae, <i>Aeromonas</i> sp.; <i>Vibronaceae</i> , <i>Vibrio</i> sp.
O	En medio MacConkey, colonia puntiforme elevada de color rosa claro con borde entero	Pseudomonaceae
P	En medio Salmonella-Shigella, colonia irregular elevada de color beige con borde entero	Enterobacteriaceae, <i>Proteus mirabilis</i>
Q	En medio Salmonella-Shigella, colonia circular plana de color beige claro con borde entero	Enterobacteriaceae, <i>Yersinia</i> sp.
R	En medio Sulfito de Bismuto, colonia irregular elevada de color café oscuro con borde lobulado	Enterobacteriaceae
S	En medio Sulfito de Bismuto, colonia irregular plana de color café con borde entero	Pseudomonaceae, <i>Pseudomonas</i> sp.; <i>Vibronaceae</i> , <i>Vibrio</i> sp.
T	En medio Sulfito de Bismuto, colonia puntiforme plana de color café con borde entero	Enterobacteriaceae
U	En medio Sulfito de Bismuto, colonia irregular elevada de color café con borde lobulado	Enterobacteriaceae, <i>Proteus mirabilis</i>
V	En medio Sulfito de Bismuto, colonia circular elevada de color café con borde entero	Enterobacteriaceae
W	En medio Sulfito de Bismuto, colonia circular plana de color café con borde entero	Enterobacteriaceae
X	En medio Sulfito de Bismuto, colonia irregular elevada de color verde opaco con borde lobulado	Pasteurellaceae, <i>Pasteurella</i> sp.

4.3.2. Identificación mediante el sistema API 20E

El segundo nivel de identificación, basado en la utilización de los sistemas API 20E, permitió identificar el 74 % de los 23 aislados de las muestras de peces y agua (Cuadro 7). Ese porcentaje se ubicó en los géneros *Raoultella* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Chryseobacterium* sp., *Pasteurella* sp., *Proteus* sp., *Yersinia* sp., *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. y *Serratia* sp. El 61 % de los aislados pudo ser identificado hasta el nivel de especie, encontrándose las siguientes: *Raoultella ornithinolytica*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Chryseobacterium indologenes*, *Pasteurella pneumotropica*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia pestis*, *Enterobacter cloacae* y *Serratia fonticola*. El 27 % de los aislados no logró ser identificado. Los perfiles numéricos que se obtuvieron mediante el sistema de identificación API 20E, aparecen reflejados en el cuadro 7.

Cuadro 7. Identificación de las cepas aisladas de las muestras de peces y de agua del río Ayuquila, Jalisco, México teniendo en cuenta el perfil numérico obtenido por el sistema API 20 E.

Cepa	Perfil numérico	Microorganismo
A	534177317	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
B	516057237	<i>Escherichia coli</i>
C	525177737	<i>Klebsiella oxytoca</i>
D	100056711	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
E	002075431	SIN RESULTADOS
F	160417267	<i>Citrobacter freundii</i>
H	360477257	<i>Citrobacter freundii</i>
I	362457237	<i>Citrobacter freundii</i>
J	061200004	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
K	242400644	SIN RESULTADOS
L	040075401	SIN RESULTADOS
M	002034405	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
N	002071420	SIN RESULTADOS
O	001462100	SIN RESULTADOS
P	042400077	<i>Proteus mirabilis</i>
Q	002210205	<i>Yersinia pestis</i>
R	330457377	<i>Enterobacter cloacae</i>
S	371037737	SIN RESULTADOS
T	375677317	<i>Citrobacter</i> sp.
U	073200477	<i>Proteus mirabilis</i>
V	003077347	<i>Pantoea</i> sp.
W	500077347	<i>Serratia fonticola</i>
X	000210000	<i>Pasteurella</i> sp.

4.4. Análisis molecular

4.4.1. Productos de PCR y purificación

Como resultado de la purificación de los productos de PCR, se obtuvo el patrón de bandas electroforéticas correspondiente al ADNr 16S de cada cepa. Las corridas que se observaron a la luz ultravioleta aparecen en la figura 13. En todos los casos, las amplificaciones de PCR mediante el empleo de los cebadores o primers fD1 y rD1, permitieron obtener los fragmentos esperados aproximadamente de 1500-2000 pares de base (pb) para las 23 cepas en estudio, con excepción de la cepa I que mostró un menor peso molecular respecto al resto.

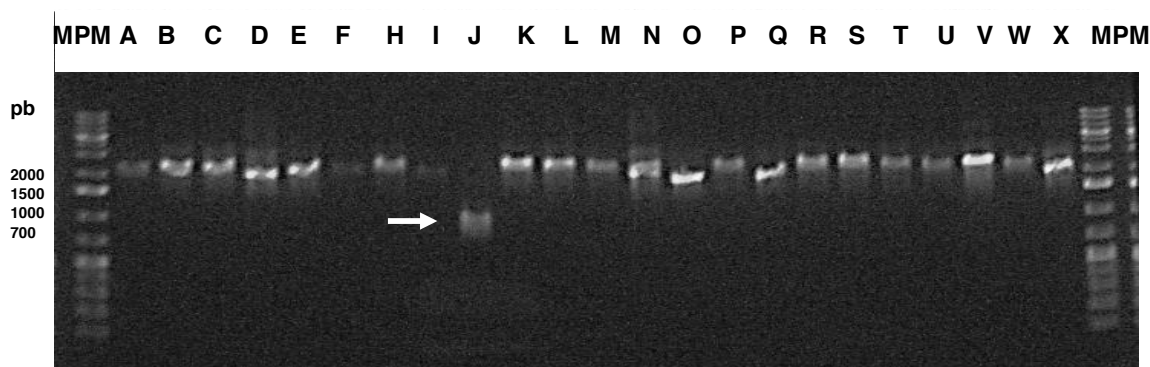


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de la purificación de los productos de PCR para la detección de ADNr 16S para las 23 cepas bacterianas obtenidas de muestras de agua del Ayuquila y tejidos de peces desde la letra A hasta la X. Primer y último carril: Marcador de Peso Molecular (MPM) (1Kb). Los productos obtenidos tuvieron un peso molecular entre los 1500 y 2000 pares de bases (pb). La flecha indica que la cepa J tuvo un menor peso molecular que el resto. G=F por lo que no aparece en la parte superior.

4.4.2. Identificación de las cepas a partir de secuenciación molecular

La comparación de las secuencias de las PCRs con las bases de datos moleculares NCBI Blast y KEGG, permitieron ubicar al 100% de las cepas bacterianas en 11 géneros diferentes con un porcentaje de similitud entre un 98 y un 100%. Sin embargo, las cepas H e I mostraron valores menores de similitud, 80 y 79% respectivamente como se aprecia en el cuadro 8. De las 23 cepas, el 100% fueron identificadas hasta el nivel de género. De ellas, cinco fueron ubicadas en el género *Pseudomonas* sp., cuatro en *Bacillus* sp., tres en *Escherichia* sp., dos en el género *Citrobacter* sp., dos en el género *Providencia* sp. y dos en el género *Alcaligenes* sp. Se halló solo un representante en cada caso de los géneros *Methanobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Shigella* sp., *Proteus* sp. y *Serratia* sp. El 74% de las 23 cepas se ubicaron

en 9 especies. Sólo una (4 %) se pudo identificar hasta el nivel de subespecie que fue el caso de *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*.

Cuadro 8. Géneros, especies y subespecies microbianas provenientes de muestras de peces y aguas del río Ayuquila, Jalisco, México identificados a nivel molecular, según análisis BLAST en dos bases de datos diferentes NCBI Blast y KEGG (MACROGEN, Corea). Aparece representado el porcentaje de identidad genética que presentó cada cepa, el número de acceso a la secuencia genética, la cobertura y el valor del error.

Cepa	Base de datos	Resultado	% de Identidad	No. de Acceso	Cobertura	Valor error
A	KEGG	<i>Shigella sonnei</i>	100%	K01977	100%	0
B	NCBI Blast	<i>Escherichia coli</i>	100%	CP013112.1	100%	0
C	NCBI Blast	<i>Escherichia coli</i>	100%	CP013112.1	100%	0
D	NCBI Blast	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	JN707686.1	100%	0
E	NCBI Blast	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100%	KR140200.1	100%	0
F	NCBI Blast	<i>Citrobacter freundii</i>	100%	KT260291.1	99%	0
H	NCBI Blast	<i>Citrobacter freundii</i>	99%	KT261414.1	99%	0
I	KEGG	<i>Methanobacterium</i> sp.	80%	0.17	80%	0.17
J	KEGG	<i>Bacillus</i> sp.	79%	743958794	79%	2e-09
K	NCBI Blast	<i>Pseudomonas fragi</i>	100%	0	100%	0
L	KEGG	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100%	12530560	100%	0
M	NCBI Blast	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100%	KP202687.1	100%	0
N	NCBI Blast	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	100%	KT719957.1	100%	0
O	NCBI Blast	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	KC901546.1	100%	0
P	NCBI Blast	<i>Providencia alcalifaciens</i>	99%	AB682262.1	100%	0
Q	NCBI Blast	<i>Proteus</i> sp.	100%	KF917137.1	99%	0
R	NCBI Blast	<i>Enterobacter cloacae</i>	100%	CP011798.1	100%	0
S	NCBI Blast	<i>Alcaligenes</i> sp.	99%	AY346138.1	100%	0

T	NCBI Blast	<i>Serratia liquefaciens</i>	98%	1074	82%	0
U	NCBI Blast	<i>Alcaligenes</i> sp.	99%	AY346138.1	99%	0
V	NCBI Blast	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	HQ143563.1	100%	0
W	NCBI Blast	<i>Providencia stuartii</i>	99%	KT216580.1	100%	0
X	NCBI Blast	<i>Escherichia coli</i>	99%	CP013112.1	100%	0

De las 23 cepas obtenidas mediante la secuenciación, se pudo ubicar a 10 de ellas en cuatro especies diferentes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri* y *Citrobacter freundii*) y a dos en el género *Alcaligenes* sp. Se obtuvieron finalmente sólo 16 organismos disímiles como se observa en el cuadro 9. En los acápites venideros, a partir de aquí, se analizarán los resultados y discutirán teniendo en cuenta únicamente las identificaciones bacterianas obtenidas a través del análisis de las secuencias del ADNr 16 S ya que este brinda mayor precisión acerca de la ubicación de cada bacteria dentro de su propio grupo.

Cuadro 9. Resumen de la identificación de las cepas bacterianas encontradas en las muestras de agua y en los tejidos de peces del río Ayuquila mediante secuenciación genética. Las filas en color gris representan las cepas que se identificaron como pertenecientes a las mismas especies o al mismo género.

No.	Cepas	Microorganismo
1	A	<i>Shigella sonnei</i>
2	B,C,X	<i>Escherichia coli</i>
3	D, V	<i>Bacillus subtilis</i>
4	E, K, L,M	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
5	F,H	<i>Citrobacter freundii</i>
6	I	<i>Methanobacterium</i> sp.
7	J	<i>Bacillus</i> sp.
8	K	<i>Pseudomonas fragi</i>
9	N	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>
10	O	<i>Pseudomonas</i> sp.
11	P	<i>Providencia alcalifaciens</i>
12	Q	<i>Proteus</i> sp.
13	R	<i>Enterobacter cloacae</i>
14	S,U	<i>Alcaligenes</i> sp.
15	T	<i>Serratia liquefaciens</i>
16	W	<i>Providencia stuartii</i>

4.5. Tallas y peso de los peces capturados en el río Ayuquila

De manera general se colectaron 128 peces de interés comestible de los cuales el 94.53% correspondió a la tilapia común (*Oreochromis* sp.), el 3.12% a la especie *Lepomis macrochirus*, el 1,56% a *Carassius auratus* y sólo el 0.78% a *Cyprinus carpio*. En los peces capturados en cada punto de muestreo, se encontraron las bacterias identificadas independientemente de su tamaño y peso. Las longitudes y el peso promedio obtenido para cada pez, considerando la temporada de muestreo y los sitios aparecen representados en la Cuadro 10. Los peces más grandes se capturaron en el Corcovado para secas con una talla promedio de 156.45 mm y los más pequeños en Achacales, en lluvias (142.89 mm). El mayor peso promedio lo presentaron los peces de Achacales en secas, mientras que el menor peso lo presentaron los de ese mismo punto pero en la temporada de lluvias.

Cuadro 10. Longitud total (mm) y *peso promedio* (gr) para peces capturados en tres sitios de colecta del río Ayuquila, Jalisco, México que fueron procesados para análisis bacteriológico. Se presentan los datos obtenidos en dos diferentes temporadas, secas (febrero, marzo y abril) y lluvias (julio, septiembre y octubre) de 2015. n=número de peces obtenidos en el evento de muestreo. Los promedios para longitud total y peso se basan en n.

Sitio	Tempor.	n	<i>Cyprinus</i> <i>carpio</i>	<i>Oreochromis</i> sp.	<i>Lepomis</i> <i>macrochirus</i>	<i>Carassius</i> <i>auratus</i>
Corcovado	Secas	19		161.84 (100)	136.25 (43.45)	
	Lluvias	22		145.09 (53.81)		
Palo Blanco	Secas	16		141.69 (54.29)		155 (66.96)
	Lluvias	17		152.6 (69.68)		
Achacales	Secas	26	400 (952.1)	143.36 (53.75)		
	Lluvias	28		142.89 (49.64)		

4.6. Cepas microbianas encontradas en los peces del río Ayuquila

En los cuadros 11 y 12 aparecen representadas las cepas identificadas en las muestras de peces y agua del río Ayuquila respectivamente, teniendo en cuenta el sitio de muestreo y la temporada de trabajo. En Corcovado la especie más representativa en las muestras de peces (cuadro 11) fue *E. coli* (encontrado en 13 peces) en secas, seguido de *Shigella sonnei* y *Pseudomonas stutzeri* que aparecieron en la misma cantidad de individuos en lluvias. En Palo Blanco se encontró con más frecuencia también *Shigella sonnei* (encontrado en 14 peces), seguida de *Bacillus subtilis* (14 peces) y *Pseudomonas stutzeri* (12 peces) en secas, mientras que *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Alcaligenes* sp. se encontró en 8 peces durante lluvias. *Pseudomonas stutzeri* en Achacales fue la que más frecuentemente más apareció encontrándose en 19 peces, seguida de *E. coli* y *Shigella sonnei* (en 13 peces ambas) en secas y *E. coli* en lluvias (14 peces).

Las especies más abundantes durante la temporada de secas fueron *Escherichia coli* en Corcovado, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas stutzeri* en Palo Blanco y *Pseudomonas stutzeri* en Achacales. En la temporada de lluvias prevalecieron *Escherichia coli* y *Pseudomonas stutzeri* en Corcovado y Palo Blanco, mientras que *E. coli* en Achacales. La especie que

menos se encontró en los peces para ambas temporadas en los sitios de muestreo fue *Enterobacter cloacae*.

En el caso de las muestras de agua (cuadro 12), en Corcovado la especie más abundante fue *Citrobacter freundii* (apareció en tres muestras). En Palo Blanco prevalecieron *Escherichia coli* y *Pseudomonas stutzeri* (en dos muestras), mientras que en Achacales se encontró *Citrobacter freundii* en tres muestras. Respecto a las temporadas, las mismas especies mencionadas anteriormente por punto se identificaron en secas aunado a que apareció también *Serratia liquefaciens* en Corcovado y Achacales. En la temporada de lluvias *E. coli* apareció en Corcovado y Achacales, así como las especies nombradas en secas. La especie que no se encontró en ninguna de las muestras de agua, pero si en muestras de peces fue *Bacillus subtilis*

Cuadro 11. Número de peces en los que se encontraron las cepas aisladas de las muestras de tejidos y músculos. Se presentan el número total de organismos colectados por temporadas en los puntos de muestreo Corcovado, Palo Blanco y Achacales del río Ayuquila, Jalisco (n: Número de peces en temporada de secas; n: Número de peces en temporada de lluvias). En el cuerpo del cuadro, el número bajo cada columna corresponde al número de peces que presentó a cada género. Rectángulos en negro especies más reportadas al considerar la mitad o más del número de peces por temporada y los grises, cepa menos encontrada.

	Corcovado		Palo Blanco		Achacales	
	(Secas n, Lluvias n)	(Secas n, Lluvias n)	(Secas n, Lluvias n)	(Secas n, Lluvias n)		
Aislado	n	n	n	n		
Shigella sonnei	19	22	16	17		
Escherichia coli	9	13	14	6		
Bacillus subtilis	13	5	4	8		
Pseudomonas stutzeri	6	7	14	8		
Citrobacter freundii	7	13	12	4		
Methanobacterium sp.	3	1	3	2		
Bacillus sp.	0	2	0	0		
Pseudomonas fragi	0	0	7	0		
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum	0	5	1	1		
Pseudomonas sp.	5	10	2	7		
Providencia alcalifaciens	2	4	6	4		
Proteus sp.	0	0	2	0		
Enterobacter cloacae	1	3	0	2		
Alcaligenes sp.	0	0	0	0		
Serratia liquefaciens	8	1	1	8		
Providencia sp.	6	0	0	7		
	4	0	0	4		

Cuadro 12. Número de muestras de agua en las que se encontró cada cepa aislada. Se presentan el número total de muestras colectadas por temporadas en los puntos de muestreo Corcovado, Palo Blanco y Achacales (n: Número de muestras en temporada de secas; n: Número de muestras en temporada de lluvias). En el cuerpo del Cuadro, el número bajo cada columna corresponde al número de muestras que presentó a cada género. Rectángulos en negro especies más reportadas al considerar la mitad o más del número de peces por temporada y los grises, cepa menos reportada.

	Corcovado			Palo Blanco		Achacales	
	(Secas n, Lluvias n)			(Secas n, Lluvias n)		(Secas n, Lluvias n)	
Aislado	n	n	n	n	n	n	n
<i>Shigella sonnei</i>	2	0	1	1	2	1	
<i>Escherichia coli</i>	1	2	2	2	2	2	2
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	1	2	2	2	2	0
<i>Citrobacter freundii</i>	3	2	1	1	3	1	1
<i>Methanobacterium</i> sp.	1	1	0	0	0	0	1
<i>Bacillus</i> sp.	2	0	1	0	1	0	0
<i>Pseudomonas fragi</i>	1	0	0	0	3	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i>	2	1	1	0	1	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	1	0	0	0	0	0
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1	2	0	0	3	1	1
<i>Proteus</i> sp.	0	0	1	0	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	1	1	0	3	2	2
<i>Alcaligenes</i> sp.	0	1	0	1	0	2	2
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	1	1	0	2	2	2
<i>Providencia</i> sp.	1	0	1	0	3	1	1

4.7. Análisis de la relación entre la presencia de las cepas identificadas en peces y las cepas identificadas en las muestras de agua

Mediante la secuenciación se obtuvieron diferentes especies y géneros como *Serratia liquefaciens*, *Providencia* sp., *Methanobacterium* sp., *Pseudomonas fragi* que en el caso de Corcovado suelen ser microorganismos temporales, o sea, que se encuentran según la época del año. Lo mismo sucedió en Palo Blanco con *Bacillus* sp., *Providencia alcalifaciens*, *Proteus* sp. y *Serratia liquefaciens* que aparecieron indistintamente, mientras que en Achacales *Pseudomonas fragi*, *Proteus* sp., *Serratia liquefaciens* y *Providencia* sp. tampoco aparecieron en ambos muestreos de secas y de lluvias.

4.7.1. Corcovado

En los peces capturados en Corcovado las especies bacterianas que se encontraron con mayor frecuencia en la mayoría de las muestras obtenidas fueron *E. coli* en temporada de secas, así como *Shigella sonnei*, *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* en temporada de lluvias (Fig.10). En ninguna de las dos épocas se encontró presencia en los peces de *Bacillus* sp., *Providencia alcalifaciens* y *Enterobacter cloacae*. Se observó que la cantidad de especies bacterianas identificadas en la temporada de lluvias para estos organismos fue superior a las identificadas en la temporada de secas.

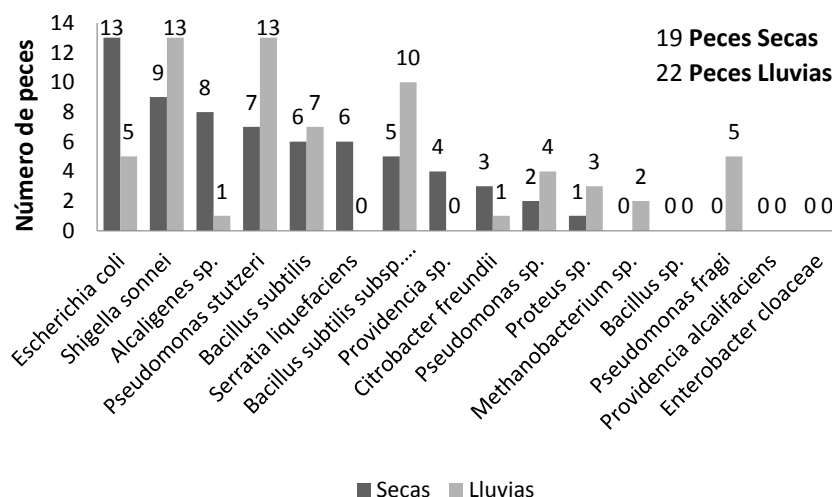


Figura 10. Bacterias identificadas en las muestras de peces en el punto Corcovado del río Ayuquila, Jalisco, México en ambas temporadas de estudio. En el eje de las Y aparece representado el número de peces examinados: 19 peces en secas y 22 en lluvias. En el eje de las X se representa cada microorganismo.

En las muestras de agua del Corcovado sobresalieron las especies bacterianas *Shigella sonnei*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus* sp. y *Serratia liquefaciens* en secas, mientras que *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Providencia alcalifaciens* sobresalieron en temporada de lluvias (Fig.11). En agua no se encontró *Bacillus subtilis*, ni *Proteus* sp. Se logró identificar un mayor número de microorganismos presentes en secas que en lluvias.

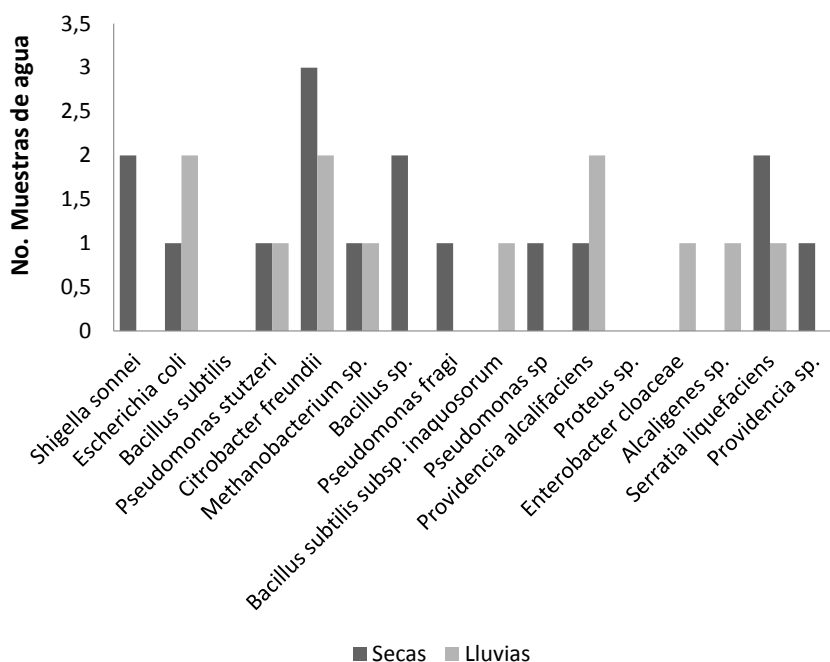


Figura 11. Especies bacterianas identificadas en las muestras de aguas en el punto Corcovado del río Ayuquila, Jalisco, México en ambas temporadas de estudio. En el eje de las Y aparece representado el número de muestras (3) y en el eje de las X cada uno de los microorganismos identificados.

4.7.2. Palo Blanco

En Palo Blanco las especies presentes en la mayoría de los peces fueron *Shigella sonnei*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas stutzeri* en temporada de secas, mientras que *E. coli* y *Alcaligenes* sp. fueron las especies que más sobresalieron en temporada de lluvias (Fig. 12). Los peces no presentaron en este punto las especies *Enterobacter cloacae* ni *Methanobacterium* sp. Se observa una mayor prevalencia microbiana en los peces en temporada de lluvias que en secas.

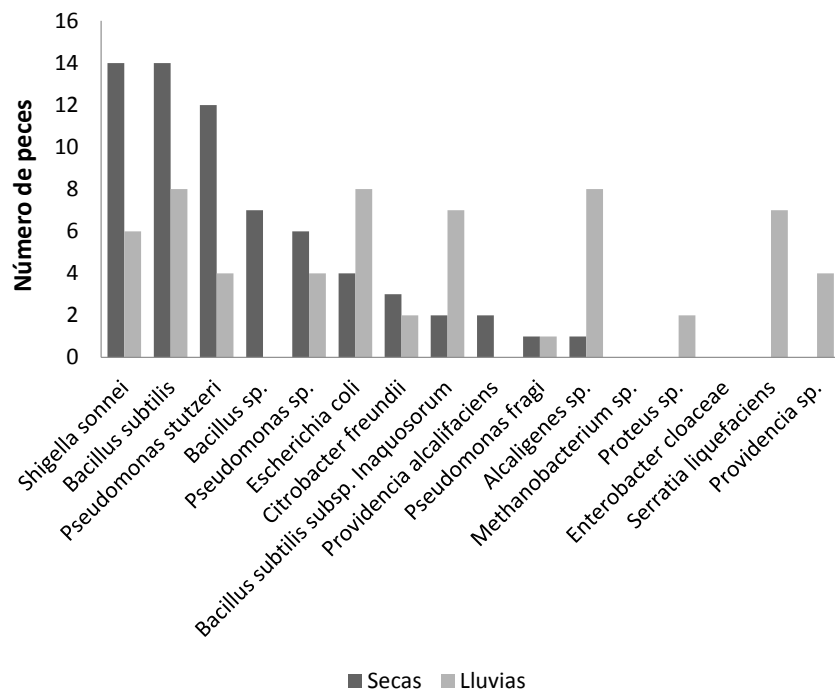


Figura 12. Bacterias identificadas en las muestras de peces en el punto Palo Blanco del río Ayuquila, Jalisco, México en ambas temporadas de estudio. En el eje de las Y aparece representado el número de peces examinados: 16 peces en secas y 17 en lluvias. En el eje de las X se representa cada microorganismo.

Por su parte, los aislados más prevalentes en agua en el mismo punto fueron *E. coli*, *Pseudomonas stutzeri* y *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* en temporada de secas, mientras que en lluvias prevalecieron las dos primeras especies mencionadas anteriormente (Fig.13). En este caso no aparecieron *Bacillus subtilis*, *Methanobacterium* sp., *Pseudomonas fragi* ni *Providencia alcalifaciens*. En temporada de secas se observó un mayor número de muestras de aguas con presencia de bacterias que en temporada de lluvias.

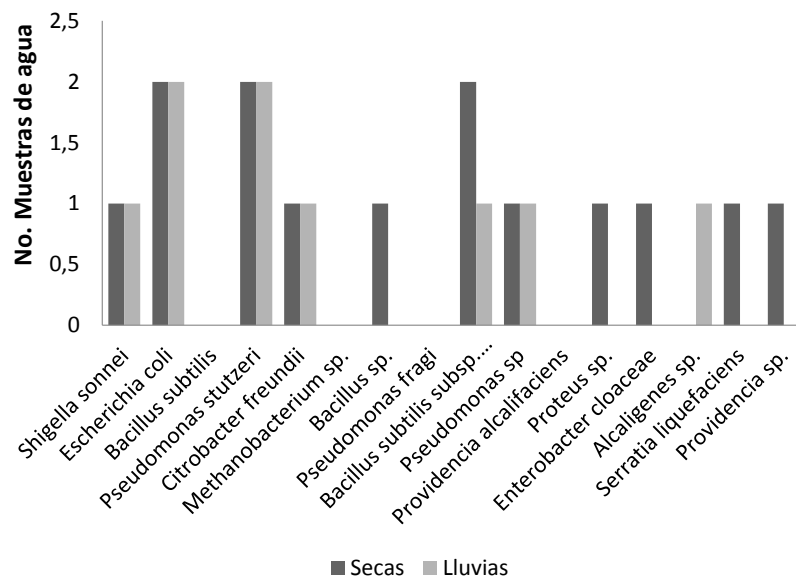


Figura 13. Especies bacterianas identificadas en las muestras de aguas en el punto Palo Blanco del río Ayuquila, Jalisco, México en ambas temporadas de estudio. En el eje de las Y aparece representado el número de muestras (3) y en el eje de las X cada uno de los microorganismos identificados.

4.7.3. Achacales

Los peces en este sitio presentaron en su mayoría *E. coli*, *Pseudomonas stutzeri* y *Shigella sonnei* en temporada de secas, mientras que en temporada de lluvias predominaron *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Alcaligenes* sp. (Fig.14). En la época de lluvias los peces presentaron un mayor número de especies que en la época de secas. Corcovado fue el sitio de muestreo que presentó una menor diversidad en cuanto a presencia de microorganismos en sus aislados, mientras que Achacales mostró mayor diversidad bacteriana.

En las muestras de aguas de Acachales se encontraron las especies: *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fragi*, *Providencia alcalifaciens*, *Enterobacter cloacae* y *Providencia* sp. en temporada de secas, mientras que en temporada de lluvias se identificó *E. coli*, *Alcaligenes* sp., *Enterobacter cloacae* y *Serratia liquefaciens* (Fig.15). Tan sólo en las muestras de agua no se encontraron las especies *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas* sp. En secas se identificaron un mayor número de especies que en época de lluvias.

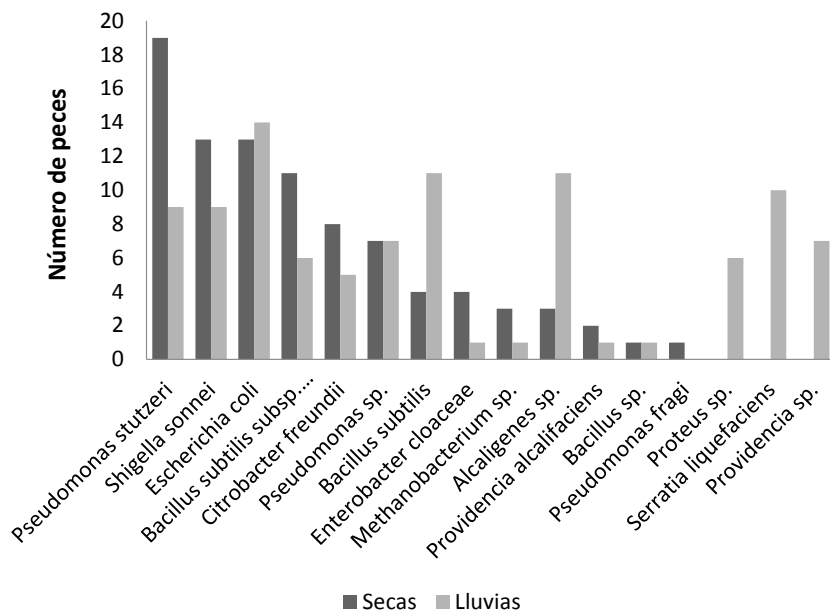


Figura 14. Bacterias identificadas en las muestras de peces en el punto Achacales del río Ayuquila, Jalisco, México en ambas temporadas de estudio. En el eje de las Y aparece representado el número de peces examinados: 26 peces en secas y 28 en lluvias. En el eje de las X se representa cada microorganismo.

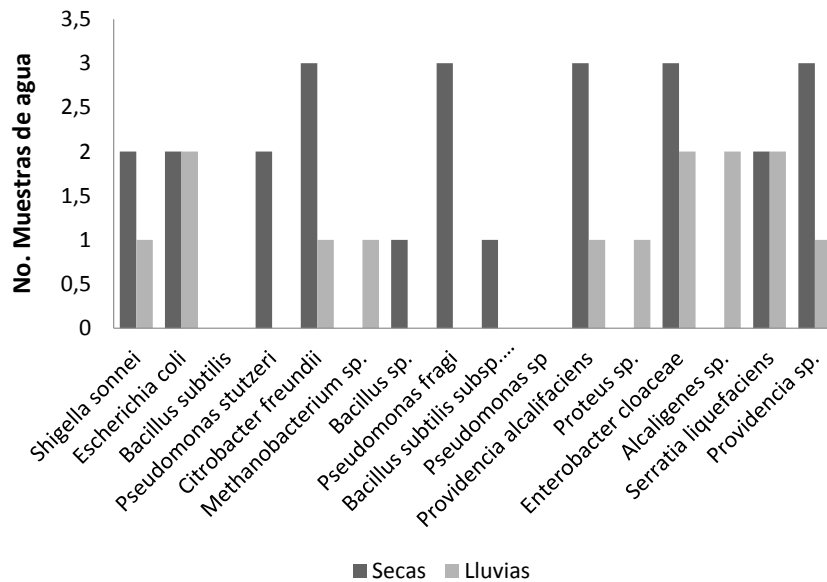


Figura 15. Especies bacterianas identificadas en las muestras de aguas en el punto Achacales del río Ayuquila, Jalisco, México en ambas temporadas de estudio. En el eje de las Y aparece representado el número de muestras (3) y en el eje de las X cada uno de los microorganismos identificados.

5. DISCUSIÓN

La identificación y detección de bacterias patógenas en peces de interés comestible, cobra vital importancia para el hombre ya que ofrece la ventaja de tomar mejores decisiones sobre el uso, manejo y aprovechamiento de los recursos pesqueros para su propia alimentación.

Mediante esta investigación se ha podido identificar hasta nivel molecular un grupo de microorganismos que se lograron aislar a partir de muestras de peces y de agua provenientes del río Ayuquila en el estado de Jalisco, México. El trabajo constituye una primera aproximación que aporta información primaria sobre la microbiota bacteriana presente en aguas y peces que habitan en el río Ayuquila y permite hacer algunas recomendaciones relacionadas con la necesidad de trabajar hacia la prevención de la llegada de aguas negras provenientes de los drenes de diversas poblaciones localizadas en los municipios de Autlán de Navarro y El Grullo localizados en el mismo estado.

5.1. Análisis de las mediciones de los parámetros físico-químicos

Factores como el crecimiento de la población, diversas actividades humanas como las agrícolas, la falta de decisión de las instituciones así como la indolencia cultural, contribuyen a la contaminación de los ríos y acuíferos en general (Wallach, 1994). De ahí que una de las principales fuentes de organismos patógenos son las aguas negras que provienen de los poblados y que son vertidos sin tratamiento (Ramírez *et al.*, 2015). El desarrollo de los microorganismos en ambientes naturales está influenciado por factores abióticos como la temperatura, el pH, la salinidad, etc.

En esta investigación el pH y el oxígeno disuelto fueron los parámetros que más influyeron en los aislados obtenidos en los tres puntos de muestreos Corcovado, Achacales y Palo Blanco con valores promedios de 7.9 y 3.9 ppm respectivamente. El valor de pH se corresponde con el obtenido por otros autores ya que las bacterias ambientales crecen óptimamente a pH neutro-básico (Chiroles *et al.*, 2007). La turbiedad, la temperatura, la conductividad, la salinidad y los sólidos totales disueltos mostraron una relación positiva entre sí como se aprecia en la figura 6. En este caso las condiciones ambientales de cada cuerpo de agua guardan sus propias características lo que pudiera explicar el comportamiento de dichos parámetros en el río Ayuquila.

5.2. Análisis de las concentraciones de *E. coli* y de coliformes totales en aguas del río Ayuquila

Las concentraciones medidas de coliformes fecales y totales en las aguas del río Ayuquila sugieren una afectación importante al sistema. La concentración en UFC/mL de coliformes, superó los valores que maneja la Norma de aguas de recreo en Arizona, EE.UU teniendo en cuenta la misma unidad de medida para dicho grupo microbiano (Sanders *et al.*, 2013). Los valores de *E. coli* obtenidos en Palo Blanco y Achacales estuvieron por encima del orden de 10^3 UFC/mL, mientras que para esta bacteria en Arizona el límite máximo permisible es de 2.35 UFC/ mL. Sin embargo, los valores obtenidos para Corcovado no superaron los límites sugiere que existen aportes altos y no controlados de aguas negras al ecosistema. Estos aportes provienen no solamente de descargas domésticas, sino también de fuentes no puntuales como pueden ser operaciones ganaderas, etc. (Bianchi *et al.*, 2014).

Aunque los valores de *E. coli* disponibles para el sitio Corcovado en la temporada de secas fueron de cero, la desviación estándar obtenida en los datos para los otros dos sitios de colecta fue de tal magnitud que no permitió discernir estadísticamente de aquellos obtenidos para el sitio Corcovado. Es importante además mencionar que es necesario llevar a cabo una exploración más profunda de las posibles causales de la inexistencia (concentración cero) de *E. coli* en Corcovado. Es muy raro no haber encontrado concentraciones detectables de dicho microorganismo en este sitio. Es posible que haya existido alguna falla en la toma muestras o datos. En un estudio futuro se podría llevar a cabo un análisis de las series de datos en tiempo (disponibles en el Laboratorio de Cuencas, CUCSUR Universidad de Guadalajara.) para los sitios sobre los que se enfocó este trabajo; este podría arrojar evidencias más contundentes para poder comprender las bajas concentraciones de *E. coli* en el sitio Corcovado.

Lo anterior no quiere decir que Corcovado sea un sitio prístino, este sitio recibe aportes de agua presuntamente contaminada de las partes altas de la cuenca del Ayuquila; sin embargo, dado que el sitio Corcovado se encuentra a la salida de una cañada, donde existe una población humana mínima, el río ha tenido oportunidad de “limpiarse” y ello explica la baja concentración. Los valores bajos de coliformes pudieran deberse también a que las aguas residuales en las partes altas del río van a las presas, donde se diluyen por el gran volumen de agua y a su salida no tienen una concentración alta de coliformes. Algunos autores expresan que las concentraciones de *E. coli* se correlacionan positivamente con los períodos de mayores precipitaciones (Lipp *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2013). Esto pudiera justificar los resultados obtenidos en Corcovado.

Por otro lado, las diferencias encontradas en las concentraciones de *E. coli* entre los sitios durante la temporada de lluvias, pudieron estar dadas porque al analizar el mapa del área de estudio, se observa que a Palo Blanco y Achacales reciben contribución de aguas negras los drenes de Autlán de Navarro y El Grullo, no siendo así para Corcovado. Lo que también podría justificar la presencia de dicha bacteria con comportamiento semejante entre ambos puntos. El afluente también atraviesa zonas, que en su conjunto están más habitadas que el Corcovado hasta llegar a los otros dos puntos (Figura 4) y posiblemente recibe más escorrentía de aguas albañales de los pobladores ribereños con mayor frecuencia. También las aguas que llegan al cauce con restos de heces de animales de sangre caliente (Toze, 2006) podrían influir, así como la que proviene del estiércol de potreros cercanos. La falta de fosas o canales que recolecten las aguas negras es otra de las posibles causas de la aparición de este microorganismo ya que se vierten los desechos albañales directamente al río por los pobladores ribereños (Olguín *et al.*, 2010).

De acuerdo con los resultados de identificación que se llevaron a cabo, el grupo de los coliformes totales está formado por el género *Escherichia* sp. pero también por *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Edwardsiella* sp. y *Citrobacter* sp. La presencia de estos indica contaminación bacteriana reciente y degradación de los cuerpos de agua (Fernández *et al.*, 2001). Los valores obtenidos para los coliformes en los puntos de muestreo fueron superiores a los de *E. coli*, lo que de cierto modo es justificable porque son varios los géneros que pertenecen a los coliformes y por tanto reportarán en su conjunto un mayor número de UFC que analizándolos por separado.

La presencia de los coliformes de manera general puede explicarse ya que además de que suelen vivir en el tracto gastrointestinal del hombre y otros animales, también pueden encontrarse formando parte del agua y del suelo (Breed *et al.*, 1957). En las salidas al campo muchas veces se muestreó agua turbia por la presencia de sedimentos que habían sido arrastrados por crecidas del río, sobre todo en la temporada de lluvia, los cuales provenían de las franjas ribereñas del río (Mendoza *et al.*, 2014).

La presencia de estos microorganismos coliformes representa no solo un problema sanitario sino que también de riesgo ambiental (Berthe *et al.*, 2008). Pueden encontrarse en los sedimentos y penetrar a organismos acuáticos como los peces de consumo por absorción a través del tegumento o de las branquias, captación de partículas suspendidas y/o por consumo de alimentos contaminados (Dang y Dalsgaard, 2012). Lo antes mencionado representa un riesgo para la salud de las personas que se alimentan de los

peces que se desarrollan en el Ayuquila. Esto evidencia la necesidad de realizar análisis periódicos para conocer la calidad microbiológica del agua en este afluente y determinar si los peces están aptos o no para ser ingeridos.

5.2.1. Análisis de la relación entre las concentraciones de *E. coli* y coliformes totales

Los coliformes fecales y totales fueron de los primeros microorganismos utilizados como indicadores de contaminación fecal (Arcos *et al.*, 2005). Hoy día siguen siendo utilizados para tales fines y generalmente indican eventos de contaminación reciente, pues no sobreviven por mucho tiempo en el agua al perder su capacidad de formar colonias en medios diferenciales y selectivos. Factores como la temperatura del agua, la luz solar, el desarrollo de otras bacterias y la composición química del agua afectan su supervivencia (Rodríguez, 2003).

Las tendencias y correlaciones muestran que la concentración de coliformes y de *E. coli* generalmente aumenta en los meses de verano. Considerando que se muestreó en agosto y septiembre, para Corcovado nuestros resultados coinciden con los obtenidos en estudios similares en aguas de ríos (Lipp *et al.*, 2001) donde se apreció un aumento de ambos grupos microbianos. Por tanto, con estos resultados, la alta correlación que se obtuvo entre las concentraciones de *E. coli* y fecales sugiere que *E. coli* es uno de los principales componentes de todas las coliformes dentro del río (Peters, 2009; Daly *et al.*, 2013). La aparición de todos los organismos coliformes, se debe a que viven en hábitats comunes, como lo son el tracto gastrointestinal de organismos de sangre caliente, agua, suelo, entre otros (Vinuesa, 2015).

Los coliformes tienen fuentes comunes para su dispersión en el medio acuático como lo son los vertimientos albañales con grandes cargas de heces de poblaciones ribereñas cercanas. Es de señalar que dentro de la especie *E. coli*, existen grupos de este microorganismo que son patógenos como *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterotoxigénica capaces de producir enfermedades intestinales en humanos y animales (Romeu, 2012). Sin dudas, los resultados discutidos hasta el momento evidencian que la calidad microbiológica en cuanto a coliformes totales y *E. coli* de las agua del río Ayuquila es baja.

5.3. Aislamiento e identificación de bacterias presentes en peces y muestras de agua del río Ayuquila

5.3.1. Identificación mediante pruebas bioquímicas y características morfo-culturales

Las bacterias constituyen un grupo microbiano ampliamente estudiado lo que se justifica por su presencia en números hábitats como lo son agua, suelo, aire así como ambientes extremos (Vásquez-Piñeros *et al.*, 2010). Recientes investigaciones reflejan que se han estudiado las comunidades bacterianas transitorias y las residentes en el tracto intestinal de algunos peces (Angeles, 2012).

De manera general se logró identificar mediante las pruebas bioquímicas realizadas y las características morfoculturales a todas las cepas aisladas hasta género o especie indistintamente. La mayoría pertenecen a la familia de las enterobacterias donde se encuentran los coliformes. Estos resultados coinciden con otras investigaciones donde la presencia de este grupo bacteriano en ambientes naturales (ríos) y en tejidos de vertebrados como los peces es indicadora de contaminación y consecuentemente de la calidad del agua. Lo anterior cobra vital importancia porque dichos organismos patógenos pueden afectar la salud humana. Su aparición pudo estar debida, además de las aguas con excretas de animales, a desechos orgánicos derivados de actividades antropogénicas (Cupul-Magaña *et al.*, 2006; Sidhu *et al.*, 2012; Barrera-Escorcia *et al.*, 2013; Ochoa Izaguirre y Soto-Jiménez, 2013; Valdés *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014).

Los microorganismos identificados en esta investigación son de vida libre y pueden encontrarse en diferentes ambientes, incluyendo el acuático (Breed *et al.*, 1957; Huddleston *et al.*, 2006; Renato *et al.*, 2014). El análisis de las muestras de los peces contenía intestinos y los resultados obtenidos son similares a los reportados por otros autores que han detectado géneros como *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Citrobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. (Austin y Austin, 2003; Álvarez y Agurto, 2000; Giset y Rosa, 2011) en este tejido. Por su parte, *Proteus mirabilis* no sólo se encuentra en aguas y heces, también puede encontrarse en heridas y carne en descomposición (Corrales *et al.*, 2011).

Los géneros microbianos referidos aquí, en su mayoría, han sido encontrados también como patógenos en el hombre y con los que se deben tener sus cuidados por las posibles enfermedades que causan. Un buen número de las especies encontradas en este trabajo son enterobacterias en su mayoría y son capaces de producir enfermedades como gastroenteritis, diarrea, disentería, etc. (Romero *et al.*, 2016). El género *Escherichia* sp.

puede producir artritis séptica, endoftalmitis, tiroiditis supurada, abscesos intraabdominales, entre otras, mientras que *Klebsiella* sp. ocupa el segundo lugar en la incidencia, sólo después de *E. coli*, como causa de bacteriemia por microorganismos Gram negativos (Ko *et al.*, 2002). Entre las infecciones nosocomiales *Serratia* sp. provoca aproximadamente el 4% de las bacteriemias y las infecciones del tracto respiratorio inferior y el 2% de las infecciones de las vías urinarias (Hervé *et al.*, 2015). *Citrobacter* sp. está relacionada en infecciones intraabdominales, infecciones de tejidos blandos y osteomielitis (Shaw *et al.*, 2015). *Proteus mirabilis* puede ser la segunda causa de bacteriemia, sólo después de *E coli* (Puerta García y Mateos-Rodríguez, 2010).

La alta incidencia de enterobacterias en las muestras de peces puede estar ocasionada por descargas de aguas negras que son vertidas al río constantemente sin previo tratamiento. Resultados similares fueron obtenidos por algunos investigadores en la ciudad de Puebla, México (Rivera *et al.*, 2015). También se han realizado estudios en varios cuerpos acuáticos como en el lago de Pátzcuaro, Michoacán, el ecosistema lacustre de Xochimilco, D. F, la laguna de Metztlán, Hidalgo y en el lago de Zirahuén, Michoacán donde se han encontrado también bacterias entéricas como las reportadas (Barrera-Escordia *et al.*, 2013). Familias como Flavobacteriaceae, Pasteurellaceae, Aeromonaceae, Pseudomonaceae y Vibrionaceae tienen algunos géneros y especies que son capaces de encontrarse en ecosistemas acuáticos. De ahí que se justifique su presencia en los aislados realizados (Allen, 2006). Se esperaba que aparecieran los géneros referidos aquí pues casi todos pertenecen a la familia de las enterobacterias.

5.3.2. Identificación mediante el sistema API 20E

La utilización del sistema API 20E permitió llegar a una identificación más precisa que la realizada únicamente mediante las pruebas bioquímicas. Se pudo identificar la mayor cantidad de cepas del estudio en el nivel de especie. Coincidieron algunas de las cepas identificadas mediante las pruebas bioquímicas con los resultados obtenidos con este ensayo.

Con los API se identificaron dos géneros que no lograron ser encontrados con el análisis bioquímico, *Raoultella* sp. y *Chryseobacterium* sp., que estaban definidos como las cepas A y J respectivamente. En la identificación bioquímica dichos aislados lograron ser identificados hasta el nivel de familia, Enterobacteriaceae y Flavobacteriaceae respectivamente. Estos resultados demuestran en su conjunto una complementación de las dos pruebas realizadas.

Raoultella ornithinolytica era conocida antes como *Klebsiella ornithinolytica* (Morais *et al.*, 2009) y al pertenecer a la familia de las enterobacterias comparte las características de este grupo. Se ha investigado que es capaz de producir envenenamiento en peces (Nakajo *et al.*, 2004). Las infecciones humanas causadas por bacterias del género *Raoultella* son poco frecuentes. No se han reportado casos de bacteriemia (Morais *et al.*, 2009). Hasta hace poco, los miembros del género *Chryseobacterium* no fueron comúnmente asociados con infecciones en peces. Respecto a este microorganismo, hoy día se ha producido un aumento en la frecuencia de casos clínicos en varias especies piscícolas, independientemente de la temperatura del agua de donde este género ha sido aislado. Como ha desarrollado resistencia a varios antibióticos puede producir enfermedades en el hombre si consume peces infestados con este patógeno (Michel *et al.*, 2005). Los miembros de la familia Flavobacteriaceae han sido encontrados en ambientes acuáticos también, lo que justifica su presencia en las muestras analizadas (Allen, 2006).

Aunque el sistema API 20E permitió la identificación específica de diversas especies que no pudieron ser precisadas con las pruebas bioquímicas, tiene la limitante de que este en particular es un sistema que está diseñado para enterobacterias por lo que no permite identificar otras familias que pudieran estar presentes en las muestras analizadas. En este estudio se utilizó API 20E considerando que al río Ayuquila se vierten desechos albañales por parte de los drenes de Autlán de Navarro y El Grullo donde se encuentran dichos microorganismos. Por lo que es posible sugerir que los sistemas API podrían ser una opción viable para el análisis específico de patógenos posibles en el Ayuquila para dar seguimiento a eventos de contaminación de manera relativamente rápida.

5.3.3. Identificación mediante pruebas moleculares: secuenciación genética

En el medio ambiente existe una gran diversidad de microorganismos asociados en comunidades que no han logrado ser identificados. Se estima que solo se conoce del 1 al 10% aproximadamente (Rascovan, 2013) porque la mayoría no son cultivables (Tamagnini y Paraje, 2015) mediante los métodos tradicionales que se conocen hoy día en microbiología. Esto se debe a condiciones de temperatura, pH, salinidad, condiciones alimentarias adversas, tratamientos con antibióticos, etc. (Cook y Bolster, 2007; Kana *et al.*, 2008; Polifroni *et al.*, 2009). De ahí que pruebas moleculares como la secuenciación de genes se ha convertido en los últimos tiempos en una importante herramienta utilizada para la identificación de bacterias ambientales en peces, mariscos y agua (Cruz-Leyva *et al.*, 2014). La identificación de los microorganismos aislados del río Ayuquila fue posible

gracias a la información que proporcionan los genes que codifican la subunidad menor del ribosomal bacteriano 16S ADNr como plantean algunos autores (ARNr) (Cole *et al.*, 2005). Aquí se evidencio una vez más que la secuenciación molecular brinda información más precisa y fidedigna acerca de la ubicación de bacterias en sus géneros y especies que las pruebas bioquímicas a nivel de laboratorio los sistemas API 20E.

5.3.3.1. Productos de PCR y purificación

En los análisis realizados, el método molecular permitió una identificación más precisa de las cepas en estudio que las pruebas bioquímicas a nivel de laboratorio y que el sistema API 20E. Cabe destacar que es un método más caro que los anteriores debido a los numerosos reactivos y la complejidad de las técnicas que emplea. Los resultados obtenidos mediante la PCR para la cepa J donde se observa un patrón de banda de menor peso molecular respecto al resto pudiera deberse a impurezas o baja calidad del ADN, lo que inhibe la amplificación. Bandas similares han obtenido otros autores como Jiménez (2007). También pudo deberse a posibles problemas de contaminación durante el proceso de transporte y análisis de la misma. La intensidad de la banda que aparece reflejada para dicha cepa puede asociarse con numerosas copias de una misma secuencia en el mismo microorganismo o que quizás existen muchas células del organismo que poseen la secuencia como demuestran estudios previos realizados por Escalante en el 2007. Es importante dejar claro que esto no impidió la identificación de la cepa.

5.3.3.2. Identificación de las cepas a partir de secuenciación molecular

La secuenciación molecular del ADN bacteriano es uno de los métodos más precisos y rápidos que existen para poder llevar a cabo la identificación de bacterias patógenas y no patógenas. A pesar de ser un poco cara económicamente, suele ser una técnica muy utilizada (Rodicio y Mendoza, 2004) en diversos laboratorios. En cuestiones de salud pública, las técnicas moleculares presentan niveles de sensibilidad entre 70-99% y una especificidad de 86-100%, con un tiempo de detección dentro del rango de 1- 4 horas para bacteria patógenas, lo que representa sin dudas una gran ventaja sobre los métodos convencionales (Farfán, 2015). En esta investigación, la secuenciación genética permitió la identificación de una de las posibles subespecies de las cepas en estudio con un 100% de similitud teniendo en cuenta la secuenciación del gen 16S ribosomal. Esto representa una ventaja respecto a los dos métodos utilizados anteriormente pues ninguno logró una identificación hasta el nivel de subespecie, lo que resulta muy útil cuando se quieren realizar estudios específicos y dependiendo de ello, por ejemplo, se implementan

mecanismos de control dirigidos a esa subespecie y no a otra. Esto evidencia que esta metodología fue superior en cuanto a resultados respecto a lo obtenido con las pruebas bioquímicas y el sistema de identificación API 20 E.

Por otro lado, si se quisiera comparar los costos de los tres métodos de identificación utilizados en este trabajo, los moleculares fueron los más encarecidos. Se empleó menos dinero en la compra de los sistemas API 20E y a su vez menos en los medios de cultivo para realizar las pruebas bioquímicas. Es de señalar que esto pudiera representar una limitante en caso de que se quisiera realizar un estudio muy específico mediante el análisis molecular para controlar el desarrollo y multiplicación de alguna de las cepas aisladas. Ahora bien, si se necesitara tener una respuesta rápida, específica o confirmativa respecto a la identificación de enterobacterias en agua y peces, los sistemas API 20E serían muy útiles. Si el interés es tan solo saber si están presentes algunos géneros bacterianos comunes en dichas muestras o en el caso de los coliformes si se encuentran o no, los medios de cultivo son los más recomendados. Todo depende de lo que se persiga y se quiera conocer tras cada metodología de trabajo.

Aquí se reflejó que la desventaja fundamental para este tipo de análisis molecular es que los costos son mucho más elevados respecto a los ensayos de laboratorio comúnmente utilizados en diagnósticos para el mismo propósito, lo que coincide con lo expuesto por otros autores (Farfán, 2015). Con este, se ubicaron los géneros *Citrobacter* sp. y *Enterobacter* sp. Teniendo en cuenta que la mayoría de los peces analizados fueron tilapias, nuestros resultados se corresponden con estudios realizados por otros autores que han encontrado la misma microbiota bacteriana mencionada en sus tejidos (Molinari *et al.*, 2003). La mayoría de los aislados se correspondieron a géneros pertenecientes a las familias Enterobacteriaceae (seis) y Pseudomonaceae (tres). *Pseudomonas* sp. es importante a nivel de salud pública ya que algunas especies se consideran patógenas oportunistas (Centeno y Rodríguez, 2005).

Algunos autores plantean que en los peces de agua dulce las familias antes mencionadas pueden encontrarse formando parte de los intestinos (Escobar-Briones *et al.*, 2006). De ahí que independientemente del tamaño o el peso del pez analizado en cada uno de los tres sitios de muestreos, aparecieron dichas familias y géneros bacterianos. Es de destacar que no fue posible en la investigación poder analizar la presencia de las bacterias en cada tejido disectado por separado debido a la falta de recursos económicos, por lo que las cepas obtenidas son resultado de la microbiota presente en la unión de todas las partes extraídas de los peces. Para obtener una mayor diversidad bacteriana se pudieran llevar a

cabo muestreos similares en otras especies de interés comestible dentro de la región, ya que en este estudio solo se analizaron las que son comúnmente consumidas.

5.3.3.3. Cepas microbianas encontradas en el río Ayuquila

Corcovado fue el punto donde menos abundancia de cepas bacterianas en peces se encontró. Por lo explicado en acápites anteriores, este constituyó nuestro sitio de control. Sin embargo, en Palo Blanco y Achacales se detectó un número mayor de microorganismos, sobre todo de *E. coli* lo que pudiera estar dado por la existencia de algunas viviendas y establecimientos agrícolas, ganaderos en las márgenes de ambos sitios, lo que sugeriría la influencia de fuentes de contaminación. Lo mismo sucedió con las cepas encontradas en las muestras de agua. Corcovado, Palo Blanco y Achacales se comportaron igual. Otro de los microorganismos que con más frecuencia se detectó en las muestras fue *Pseudomonas stutzeri* que suele ser una especie muy común en aguas de ríos y muestras ambientales (Lalucat *et al.*, 2006).

5.4. Relación entre la presencia de las cepas identificadas en las muestras de peces y las cepas identificadas en las muestras de aguas

Las cepas identificadas en las muestras de agua se corresponden con las halladas en los tejidos de los peces, lo que evidencia sin dudas, que la microbiota de estos vertebrados está dada por el medio acuático donde se desarrollan a excepción de *Bacillus subtilis*. Dicho microorganismo es una bacteria que en este estudio demostró estar asociada únicamente con los peces colectados en el Ayuquila ya que no apareció en ninguna de las muestras de aguas analizadas. Se plantea que suele encontrarse en peces de aguas dulces, en intestino por ejemplo. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros autores que han aislado *Bacillus* sp. *Bacillus subtilis* y *Bacillus laterosporus* de peces sanos (Monroy-Dosta *et al.*, 2015).

5.4.1. Corcovado, Palo Blanco y Achacales

La presencia de *E. coli* en los sitios de muestreo puede sugerir la aparición de otras especies patógenas como *Shigella* sp. otro de los microorganismos encontrados en este estudio. La bacteria *E. coli* se ha demostrado que es capaz de producir enfermedades en el huésped mediante elementos patógenos que habitualmente no están presentes en el género (Romeu, 2012). Por su parte el género *Shigella* sp. que se aisló también en las muestras de peces analizadas es el causante de la inflamación de las paredes de la

mucosa intestinal denominada shigelosis o disentería bacilar (Cabral, 2010). El resto de los géneros y especies bacterianas tienen sus implicaciones a la salud humana como se ha explicado en acápite anteriores.

Así mismo la aparición de la variedad de los géneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., y *Enterobacter* sp. indistintamente en los tres puntos de muestreo evidencia la presencia de microbiota bacteriana variada en las diferentes épocas de año. No se debe dejar de considerar también que en este caso influyó la calidad higiénico-sanitaria del medio ambiente en el que se desarrollaron. Este estudio sirvió para conocer la calidad microbiológica de las aguas en Corcovado, Palo Blanco y Achacales. Aunque el río Ayuquila tiene cerca de ocho puntos más de muestreo, se pudo hacer inferencias acerca del agua del afluente, así como de la calidad de los peces de consumo en la región.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Esta investigación constituye el primer trabajo que se realizó para determinar microbiota bacteriana en peces de consumo en el río Ayuquila. Las diferencias en cuanto a coliformes totales y fecales entre los puntos de muestreo Corcovado, Palo Blanco y Achacales sugiere que los drenes de los municipios Autlán de Navarro y el Grullo, así como el resto de los drenes que se encuentran en el valle son los responsables de los elevados niveles encontrados de estos organismos en el en las aguas del afluente.

Durante la temporada de lluvias se encontró una menor cantidad de coliformes que en temporadas de secas lo que sugiere que los muestreos para conocer las máximas concentraciones de estos microorganismos se deben realizar en esta última.

Si se quisiera realizar estudios para determinar la presencia o no de coliformes en aguas del río se sugiere utilizar medios de cultivo a nivel de laboratorio, no siendo así si se quiere conocer específicamente cuáles son las bacterias patógenas que se encuentran en los peces de consumo. En este caso se sugiere utilizar métodos moleculares debido a su nivel de precisión.

Los métodos de identificación a nivel molecular de bacterias como la secuenciación genética respecto a los que se realizan a nivel de laboratorio (pruebas bioquímicas) y los sistemas API (20 E) utilizados en este estudio, son más exactos para conocer hasta nivel de especie, en algunos casos subespecies, cuales bacterias patógenas se encuentran en peces de consumo del río Ayuquila.

Para realizar un análisis microbiológico rápido de las aguas del Ayuquila y de sus peces para el consumo, se recomienda utilizar los métodos API 20 E debido a la obtención de los resultados a corto plazo. Al ser específico para la familia de las enterobacterias no brinda información acerca de otros grupos microbianos que pudieran afectar la salud de los pobladores ribereños. Sin embargo, para obtener información específica a detalle, se sugiere los métodos moleculares aunque son de costos más elevados.

Mediante este estudio se evidenció que los peces del afluente contienen bacterias patógenas lo que sugiere la necesidad de una adecuada cocción de la carne para su consumo y no mezclarlos con los que no se hayan cocinado adecuadamente.

En este estudio solo se trabajó con tres puntos de muestreos en el río Ayuquila por lo que los análisis descritos sería interesante realizarlos en otros puntos y analizar el

comportamiento de otras especies de peces comestibles. La investigación se realizó durante un año de trabajo y en dos temporadas de trabajo diferentes, por lo que se sugiere realizar los estudios a lo largo de otro año por lo menos, para tener idea de las variaciones de microorganismos en las mismas temporadas pero en diferentes años. Los datos pueden no ser representativos de todas las condiciones que se presentan en el río.

Se podrían realizar muestreos en todos los meses del año para analizar si existe variación debido al mes de muestreo y no a la temporada. Se recomienda muestrear en períodos de 24 horas y en horarios nocturnos para comparar la posible variación de los microorganismos.

7. LITERATURA CITADA

- Acuña, M.A. 2013. Peces de cultivo, composición, comparación con carnes de consumo Habitual . Ventajas del consumo de pescados. *Diaeta*. 31(143):26-30.
- Alba, J.J., Ortega, J. L., Álvarez, G., Cervantes, M., Ruiz, E., Urtiz, N.; Martínez, A. 2013. Riesgos microbiológicos en agua de bebida: una revisión clínica. *Química Viva*. 12 (3): 215-233.
- Alcaide, E., Barrera, R. y Amaro, C. 2002. Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E). *Aquaculture*. 212: 21-30.
- Allen, S. 2006. Koneman: Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color. Editor: Elmer W. Koneman.
- Álvarez del Villar, J. 1970. Peces mexicanos (claves). Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras. México. 166.
- Álvarez, J.D. y Agurto, C.P. 2000. Bacterioflora gram negativa aerobia de tilapias silvestres y cultivadas en la región central de Venezuela durante el período 1999- 2000. *Veterinaria Tropical*. 25(2). 209-228.
- Álvarez-León, R. 2007. Associationes and patologies in the fishes fresh waters, estuarines and marines of Colombia: waters frees and controlates. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*. 11(20): 81-129.
- Ama-Abasi, D. y Ogar, A. 2013. Proximate analysis of snakehead fish, *Parachanna obscura*, (Gunther 1861) of the cross river, Nigeria. *Fisheries and Aquatic Science*, 8(1): 295-298.
- Angeles, E. M. 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology*, 1: 1-29.
- Arcos, M. P., Ávila de Navia, S. L., Estupiñán, S.M., Gómez, A.C. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua . *NOVA - Publicación científica*. 3 (4): 69-79.
- Arellano, A. y Rivera, Y. 2011. Asociacionismo municipal y medio ambiente. La Junta Intermunicipal del Río Ayuquila, Jalisco. *Espacios Públicos*. 14 (31): 32-56.
- Atlas, R.M. y Snyder, J.W. 2011. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition J. Versalovic et al., eds., American Society of Microbiology.
- Austin, B. y Austin, D.A. 2003. The pathogenicity of *Vibrio* tipe strains to salmonids. Department of Biological Sciences. Herriott-Walt University of Richartown. Edinburgh, EH144AS. UK International Symposium of Aquatic Animal Health.
- Aydin, A. 2007. The microbiological and physico-chemical quality of groundwater in west

- thrace, Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*. 16(3): 377-383.
- Bagordo, F., Serio, F., Lugoli, F., Grassi, T., Idolo, A., Gabutti, G., De-Dono, A. 2012. Phenotypic characterization of culturable marine luminous bacteria isolated from coastal waters of the southern Adriatic Sea (Otranto, Italy). *Ciencias Marinas*. 38 (4): 599-608.
- Barbknecht, M., Sepsenwol, S., Leis, E., Tuttle-Lau, M., Gaikowski, M., Knowles, N.J., Lasee, B., Hoffman, M.A. 2013. Characterization of a new picornavirus isolated from the freshwater fish *Lepomis macrochirus*. *Journal of General Virology*. 95(3): 601-613.
- Barrera-Escorcia, G., Fernández-Rendón, C.L., Wong-Chang, I., Ramírez-Romero, P. 2013. La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. *Hidrobiológica*. 23: 87-96.
- Barrett, T.J., Blake, P.A., Morris, G.K., Puhr, N.D., Bradford, H.B., Wells, J.G. 1980. Use of Moore swabs for isolating *Vibrio cholerae* from sewage. *Journal of Clinical Microbiology*. 11(4): 385-388.
- Bartlett, J.M.S. y Stirling, D. 2003. PCR protocols. 2nd Edition. Edited by Humana Press, 226 (PCR Protocols Volumen 226 de Methods in molecular biology). 545.
- Becerra, L. K. y Horna, M.V. 2016. Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*. 7 (1): 23-31.
- Berthe, T., Touron, A., Leloup, J., Deloffre, J., Petit, F. 2008. Faecal-indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mudflats (Seine, France). *Marine Pollution Bulletin*. 57: 59-67.
- Bianchi, V., Varela, P., Flores, D., Duran, P. 2014. Evaluación de *Escherichia coli* resistente a antibióticos como especie bioindicadora de contaminación fecal en agua y peces en la cuenca inferior del río San Juan. *Natura neotropicalis*. 45: 45-69.
- Breed, R.S., Murray, E.D.G. y Smith, N.R., 1957. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Bergey's Manual Trust Ed. New York: Springer-Verlag 1 y 2: 2001.
- Brody, J.R. y Kern, S.E. 2004. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical biochemistry*. 333 (1): 1-13.
- Brogia, A. y Kapel, C. 2011. Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Veterinary Parasitology*. 182(1): 2-13.
- Cabral, J. P. 2010. Water microbiology bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research Public Health*. 7 (10): 3657-3703.
- Cahill, M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology*. 19(1): 21-41.

- Ceballos, G., Álvarez, E., Bolaños, M.M. 2014. Reducción de poblaciones de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (Smith) en plátano (Musa AAB Simmonds) con aplicación de extractos de *Trichoderma* sp. (Alexopoulos y Mims) y bacterias antagonistas. *Acta Agronómica*. 63 (1).
- Centeno, S. y Rodríguez, R. 2005. Evaluación microbiológica de pescados congelados producidos en Cumana, Venezuela, Estado Sucre. *Revista Científica*. 15 (2): 168-175.
- Chiroles, S., González, M.I., Torres, T., Valdés, M., Domínguez, I. 2007. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental*. 7: 222-227.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 33 (1): 294-296.
- Conabio, 2000. Estrategia nacional sobre biodiversidad de México. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22095986>. Consultado: 6 de Noviembre, 2014.
- CONAGUA: Comisión Nacional del Agua. 2015. Estadística del agua en México. Disponible en <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/EAM2015.pdf>. Consultado: 23 de octubre, 2016.
- Constantino, F., Armijo, A., Osorio, D., Chavez, L. A.1997. Infección por *Aeromonas hydrophila* e *Ichthyophthirius multifiliis* en trucha (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) y tilapia (*Oreochromis aureus*. L) de un centro de acopio de Morelos, México. Estudio patológico. *Veterinaria México*. 28(1): 59-62.
- Cook, K. L y Bolster, C.H. 2007. Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 573-583.
- Corrales Ramírez, L.C., Alvarado, M.A., Castillo, L.A., Camacho Beltran, Y. C. 2011. Estudio bacteriológico de la calidad del pescado fresco , Bagre (*Pseudoplatystoma* sp.) y Mojarra Roja (*Oreochromis* sp.) comercializado en el municipio de El Colegio, Cundinamarca (Colombia). *Nova*. 9:149-157.
- Cruz-Leyva, M.C., Zamudio-Maya, M., Corona-Cruz, A.I., González, U., Rojas-Herrera, R. A. 2014. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 2 (4): 99-115.
- Cucherousset, J. y Olden, J.D. 2011. Feature: Introduced fish and ecology. Ecological impacts of non-native freshwater fishes. *Fisheries Bethesda*. 36(5): 215-230.
- Cupul-Magaña, L., Mösso-Aranda, C., Sánchez-Arcilla, A., Sierra-Pedrico, J., Fermán-Almada, J., Romero, I., Falco, S. 2006. Distribución bacteriológica en el agua de mar en la Bahía Cullera, España. *Ciencias Marinas*. 32 (2). 311-318.

- Daly, E., Kolotelo, P., Schang, C., Osborne, C.A., Coleman, R., Deletic, A., McCarthy, D.T. 2013. *Escherichia coli* concentrations and loads in an urbanized catchment: The Yarra River, Australia. *Journal of Hydrology*. 497, 51-61.
- Dang, S. T. y Dalsgaard. A. 2012. *Escherichia coli* contamination of fish raised in integrated pig–fish aquaculture systems in Vietnam. *Journal of Food Protection*. 75 (7):1317-1319.
- Daza J. 2006. Estadística Aplicada con Microsoft Excel. Grupo Editorial Megabyte, Lima, Perú.
- De La Vega-Salazar, M.Y., 2006. Estado de conservación de los peces de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes) en la mesa central de México. *Revista de Biología Tropical*, 54(1),163-177.
- Devenish, J.A. y Barnum, D.A., 1980. Evaluation of API 20E system and encise enterotube for the identification of Enterobacteriaceae of animal origin. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 44(3): 315-319.
- Eldar, A., Bejerano, Y. y Bercovier, H. 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: Two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*. 28:139-143.
- Eldar, A., Frelie, P.F., Assenta, L., Varner, P.W., Lawhon, S., Bercovier, H. 1995. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45(4): 840-842.
- El-Sayed, A.F.M., 2006. *Tilapia Culture*, CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, 294.
- Escalante, A. 2007. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas en Ecología Molecular (Eguiarte, L., Souza, V y Aguirre, X. eds.). INE, SEMARNAT, CONABIO, UNAM. México D.F., 393-416.
- Escobar-Briones, L., Olvera-Novoa, M.A. y Puerto, C. 2006. Avances sobre la ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones avances sobre la ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. *Avances en nutrición acuícola*. 8:107-128.
- Espinosa, H. 2014. Biodiversidad de peces en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*.85: 450-459.
- FAO, 2012. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. 2012.
- Farfán, M.J. 2015. Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 26 (6): 788-793.
- Fernández, M.C., Álvarez, A. y Espigares, M. 2001. Transmisión fecohídrica y virus de la hepatitis A. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 18: 8-18.

- Fitzsimmons, K. 2000. Tilapia aquaculture in México in B.A. Costa-Pierce and J.E. Rakocy, eds. *Tilapia Aquaculture in the Americas*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 2: 171-183.
- Giset, M. y Rosa, D. 2011. Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
- Guzmán, F.J. y Salinas, F.S., 1988. Parásitos y enfermedades de la tilapia. Segunda. Fondopesca, ed., México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Hansen, G., Raa, J. y Olfen, J. 1990. Isolation of *Enterobacter agglomerans* from dolphin fish, *Coryphaena hippurus* L. *Journal of Fish Diseases*. 13: 93-96.
- Henríquez, C., Infante, B., Merello, J., Gal'Lino, M., Santivañez, L., Maguiña, C., Guerra, A., Humberto, B., Ventosilla, P. 2002. Identificación de *Bartonella bacilliformis* por métodos moleculares. *Revista Médica Herediana*. 13(2): 58-63.
- Henríquez, C., Infante, B., Merello, J., Galindo, M., Santivañez, L., Maguiña, C., Guerra, H., Birtles, R., Ventosilla, P. 2002. Identificación de *Bartonella bacilliformis* por métodos moleculares. *Revista Médica Herediana* 13 (2): 58-63.
- Hervé, B., Chomali, M., Gutiérrez, C., Luna, M., Rivas, J., Blamey, R., Espinoza, Izquierdo, G., Cabezas, C., Álvarez, C., de la Fuente, S. 2015. Brote de infección nosocomial por *Serratia marcescens* asociado a contaminación intrínseca de clorhexidina acuosa. *Revista Chilena de Infectología*. 32 (15): 517-522.
- Huddleston, J.R., Zak, J.C. y Jeter, R.M. 2006. Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental Sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(11): 7036-7042.
- Insaurralde, M., Balbuena, E., Frutos, A. 2013. Variedades de peces del lago Ypacarai. *Compendio de Ciencias Veterinarias*. 3 (2): 13-21.
- Jiménez, D. J. 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. Mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología industrial. Bogotá, D.C, Colombia.
- JIRA. 2008. Junta Intermunicipal de Medio Ambiente para la gestión Integral de la Cuenca Baja del Río Ayuquila. Disponible en <http://www.jira.org.mx/>. Consultado: 22 de Octubre, 2015.
- Joshi, M. y Deshpande, J.D. 2010. Polymerase Chain Reaction : Methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*. 1(5): 81-97.
- Kana, B.D., Gordhan, B.G., Downing, K. J., Sung, N., Vostroktunova, G., Machowski, E.E., Tsenova, L., Young, M., Kaprelyants, A., Kaplan, G., Mizrahi, V. 2008. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for

- virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Molecular Microbiology*. 67(3): 672-684.
- Kawamura, K., Yonekura, R., Katano, O., Taniguchi, Y., Saitoh, K. 2006. Origin and dispersal of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea. *Molecular Ecology*. 15 (3): 613-621.
- Kinkelin, P. de, Michel, C. y Ghittino, P. 1985. *Precis de pathologie des poissons*, Institut national de la recherche agronomique. Disponible en https://books.google.com.mx/books/about/Precis_de_pathologie_des_poissons.html?id=Ms8DPwAACAAJypqis=1. Consultado:17 de Abril, 2015.
- Ko, W.-C., Paterson, D.L., Sagnimeni, A. J., Hansen, D.S., Von, A., Mohapatraa, S., Casellas, J.M., Goossens, H., Mulazimoglu, L., Trenholme, G., Klugma, K.P., McCormack, J. G. Yu, V.L. 2002. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerging Infectious Diseases* 8(2):160-166.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., Palleroni, N.J. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (2): 510-547.
- Lara-Flores, M., Balan-Zetina, S., Zapata, A., Sonda-Santos, K. 2013. Determinación y prevalencia de *Mycobacterium* spp., en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) cultivada en Campeche, México. *Revista MVZ Córdoba*. 18 (1): 3273-3281.
- Lazado, C.C., Caipang, C.M.A. y Estante, E.G. 2015. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish and shellfish immunology*. 45(1): 2-12.
- Leal, Y., Reyes, M., Álvarez, J. D., Obregón, J., Viña, X. 2009. Enteropatogenicidad de bacterias aisladas de peces, del agua y plancton y de su entorno en Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 19(5): 446-454.
- Lipp, E., Kurz, R., Vincent, R., Rodríguez-Palacios, C., Farrah, S., Rose, J. 2001. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries and Coasts*. 24: 266-276.
- López, C., Vega, L.A. y Montoya, M.M. 2013. Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*. 18(2): 293-306.
- Lozano-Vilano, L. y García, M.E. 2014. Peces invasores en el noroeste de México. *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 401-412.
- MacFaddin, J.F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. 850.
- Madero, E., Frusso, E. y Casaubon, E. 2006. Manejo del cultivo de tilapia. 1-27.

- Martínez., L. M., Carranza, A. y García, M. 2000. Aquatic ecosystem pollution of the Ayuquila River, Sierra de Manantlán Biosphere Reserve, México. In: M. Munawar, S.G. Lawrence, I.F. Munawar and D.F. Malley (Ed.). *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. 165 – 181.
- Mendoza, M., Quevedo, A., Bravo, A., Flores, H., De la Isla de Bauer, M.L., Gavi, F., Zamora, B.P. 2014. Estado ecológico de ríos y vegetación ribereña en el contexto de la nueva ley general de aguas de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 30(4): 429-436.
- Mercado-Silva, N. 2001. Fish communities, fisheries and public perception of the Ayuquila river in west central México. Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de Master en Ciencias. Instituto para estudios medioambientales. Universidad de Wiscosin-Madison. Biología de la Conservación y Desarrollo Sostenible.
- Mercado-Silva, N., Santana, E., Martínez Rivera, L. M., Lyons., J., and Moermond, T. 2011. Subsistence fisheries in the Sierra Manantlán Biosphere Reserve (Jalisco/Colima, Mexico). *e-Gnosis*. 9: 1-19.
- Michel, C., Tailliez, M., Kerouault, B, Bernardet, J. F. 2005. Resistance pattern and assessment of phenicol agents' minimum inhibitory concentration in multiple drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats. *Journal of Applied Microbiology*. 99(2): 323-332.
- Miller, R. R., Minckley, W. L. y Norris, S. M. 2005. Freshwater fishes of Mexico. The University of Chicago Press. Chicago. 652.
- Molinari, L., De Oliveira, D., Bocchi, R., De Lucas, N., Vature, C., Uedanakamura, T., Alves, B., Prado, B. 2003. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, cultured in a semiintensive system. *Maringá*. 25 (2): 267-271.
- Monroy-Dosta M.C., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G., De Lara-Andrade, R., Ocampo-Cervantes, J.A., Cruz-Cruz, I. 2015. El uso de cinco cepas probióticas para la determinación de la sensibilidad (positiva o negativa) del crecimiento de bacterias patógenas (in vitro), aisladas de peces enfermos. *Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente*. 1 (7): 25-31.
- Morais, V.P., Trigo, M., Fernández, A., y García, M. 2009. Enteric fever-like syndrome caused by *Raoultella ornithinolytica* (*Klebsiella ornithinolytica*). *Journal of Clinical Microbiology*. 47(3): 868-869.
- Murray, P., Jo E., Jorgensen J., Landry M.L., Pfaller M.A. 2007. Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition. *Mycopathologia*. 146 (2):107-108.
- Nakajo, K., Nakazawa, F., Iwaku, M., Hoshino, E. 2004. Alkali-resistant bacteria in root canal

- systems. *Molecular Oral Microbiology*. 19 (6): 390-394.
- Negrete, P. y Romero, J. 2004. Presencia de bacterias patógenas en peces de ornato. *Hidrobiológica*. 35 (1): 21-30.
- Noriega, A., Rivas, D., Malavé, A., Ramos-Villarroel, A. 2014. Influence of vitamin c and e enriched feeding on growth and chemical composition of red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati*. 38: 104-116.
- O'Hara, C.M. 2005. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli. *Clinical Microbiology Reviews*. 18 (1): 147-162.
- Ochoa-Izaguirre, M.J. y Soto-Jiménez, M.F. 2013. Evaluation of nitrogen sources in the Urias lagoon system, Gulf of California, based on stable isotopes in macroalgae. *Ciencias Marinas*. 39: 413-430.
- Olguín, E. J., González-Portela, R. E., Sánchez-Galván, G., Zamora-Castro, J. E., Owen, T. 2010. Contaminación de ríos urbanos : El caso de la subcuenca del río Sordo en Xalapa , Veracruz , México. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*. 1(2): 178-190.
- Paniagua, G.L., Monroy, E., Perches, M., Negrete, E., García, O., Vaca, S. 2006. Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from charal (*Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835). *Hidrobiológica*. 16 (1):75-79.
- Peña-Castro, J.M., Gregorio-Ramírez, O. y Barrera-Figueroa, B.E., 2013. Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química*. 24 (2): 237-246.
- Pérez Ponce de Leon, G., Garcia, L., Osorio., D., Leon, V. 1996. Helminths parasites of fishes of continental waters of Mexico, UNAM. *Listados Faunísticos de México*, 6: 7-100.
- Periago, M.J., Ayala, M.D., López-Albors, O., Abdel, I., Martínez, C., Garca-Alcázar, A., Ros, G., Gil, F. 2005. Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*. 249: 175-188.
- Peters, N. E. 2009. Effects of urbanization on stream water quality in the city of Atlanta, Georgia, USA. *Hydrological Process*. 23 (20): 2860-2878.
- Polifroni, R., Etcheverría, A.I., Padola, N.L., Parma, A.E. 2009. *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC): Características de virulencia y persistencia en el medio ambiente. *InVet*. 11(1): 65-70.
- Puerta-García, A. y Mateos-Rodríguez, F. 2010. Enterobacterias. *Medicine*. 10 (51): 3426-3431.
- Ramírez-Herrejón, J.P., Mercado-Silva, N., Balart, E.F., Moncayo-Estrada, R., Mar-Silva, V., Caraveo-Patiño, J. 2015. Environmental degradation in a eutrophic shallow lake is

- not simply due to abundance of non-native *Cyprinus carpio*. *Environmental Management*. 56 (3): 603-617.
- Rascovan, N. 2013. Abriendo la caja negra de los microbiomas ambientales argentinos . Caracterizaciones funcionales y ecológicas en lagunas de altura andinas y suelos de la pampa húmeda con secuenciación de alto rendimiento lagunas de altura andinas y suelos de la pampa. Universidad de Buenos Aires.
- Renato, I., Carrasco, Z. y Lozano, J.C. 2014. *Vibrio vulnificus* una bacteria al acecho en las playas. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 28 (110): 532-534.
- Rey, A., Iregui, C. y Verján, N. 2002. Diagnóstico clínico patológico de brotes de enfermedad en Tilapia Roja (*Oreochromis* spp). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 49:13-21.
- Rincón, D.D., Semprún, A.M., Dávila, M. J., Velásquez, H. A., Morales, E.D., Hernández, J.L. 2013. Producción de harina de *Spirulina máxima* para ser empleada como ingrediente en la elaboración de dietas para peces. *Zootecnia Tropical*. 31 (3): 187-191.
- Rivera, J.A., Cedillo, L., Giono. S., Guzmán, M. 2015. Diagnóstico de enterobacterias en el río Alseseca. *Revista de la Facultad de Medicina*. 49 (1): 6-9.
- Rives, N., Acebo, Y. y Hernández, A. 2007. Reseña bibliográfica. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*. 28(2): 29-38.
- Rodicio, M. y Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22: 238-245.
- Rodríguez, A. 2003. Determinación de coliformes fecales y *E.coli* en aguas utilizando el Fluorocult LMX (MERCK) I: Comparación con los medios de cultivo tradicionales. *Ingeniería hidráulica y ambiental*. 24 (3): 15-20.
- Romero, J., Negrete, P. y Monroy, M.C. 2016. Bacterial load comparison of marine fish collected and commercially obtained for human consumption in western region of Yucatan Peninsula, Mexico. *International Journal of Aquatic Science*. 1: 6-12.
- Romeu, B. 2012. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana. Tesis presentada en opción al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de la Habana, Cuba. Departamento de Microbiología y Virología.
- Rubio, M., Cabrera, M., Silveira, A., Aguilera, Y. 2010. Suplementación Variabilidad bacteriana en *Oreochromis* sp durante las estaciones de lluvia y secas, cultivadas en ambiente dulceacuícola en diferentes regiones de Cuba. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 11(7): 1-11.

- Ryan, K. y Ray, C.G. 2011. Sherris: Microbiología Medica. 5ta Edicion. Editorial: McGraw-Hill.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffe, I. S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*. 239 (4839):487-491.
- Salazar, C.G. y Flores, C.P. 2013. Evaluación de los parámetros de crecimiento de los alevines de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) con dietas enriquecidas con dos aceites esenciales: Cúrcuma (*Curcuma longa*) y Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*). Tesis de pregrado. Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales GIRON. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador.
- Sanders, E.C., Yuan, Y. y Pitchford, A. 2013. Fecal coliform and *E. coli* concentrations in effluent-dominated streams of the upper Santa Cruz watershed. *Water*. 5: 243-261.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(12): 5463-5467.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(12): 5463-7.
- Santana, E., Navarro-Pérez, S. y Iñiguez, L. I. 1990. Utilización de la Fauna Silvestre por las comunidades rurales de la Reserva de la Biosfera de la Sierra de Manantlán. *Tiempos de Ciencia*. 18: 36-43.
- Santana, E., Navarro, S., Martínez, L.M., Aguirre, A., Figueroa, P., Aguilar, C. 1991. Contaminación, aprovechamiento y conservación de los recursos acuáticos del río Ayuquila, Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco-Colim. *Tiempos de Ciencia*. 30: 29-38.
- Schraft, H. y Watterworth, L.A. 2005. Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3M™ Petrifilm™ plates with standard plating procedures. *Journal of Microbiological Methods*. 60 (3): 335-342.
- Serrano, E., Leiva, C., Lonza, C., Sánchez, J.C., Wacyk, J., Zegers, T., Godoy, M. 2014. Caracterización histológica y morfológica del tracto digestivo de la merluza austral (*Merluccius australis*). *International Journal of Morphology*. 32(3): 1079-1084.
- Sevilla, K.P. y Gabriel, A.A. 2010. D Values of *Escherichia coli* in tilapia meat. *Journal of Muscle Foods*. 21(2):711-711.
- Shaw, J.P., Aviles, C., Chen, Y., Luna, A.J., Hernandez, A.C., Kutty, G.F. 2015. Complete Genome of *Citrobacter freundii* Siphophage Stevie. *Genome*. 3 (1).
- Sidhu, J.P., Ahmed, W., Hodgers, L., Toze, S. 2012. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface

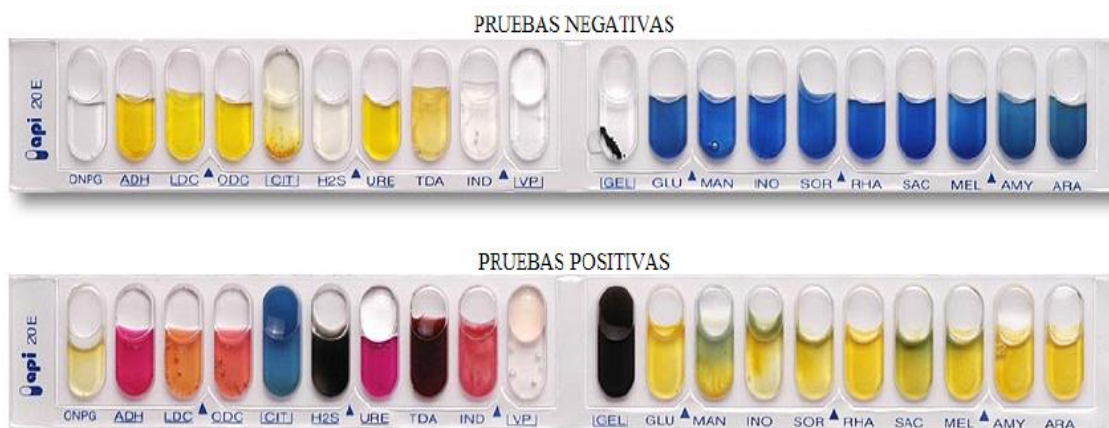
- water. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (1): 328-335.
- Tallón, P., Magajna, B., Lofranco, C., Leung, K.T. 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: A current perspective. *Water, Air, and Soil Pollution*. 166 (1): 139-166.
- Tamagnini, I.M. y Paraje, M. G. 2015. ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (revisión bibliográfica). *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2 (2): 99-102.
- Tapia, M., Zambrano, L. y Policy, C.I. 2003. From aquaculture goals to real social and ecological impacts: carp introduction in rural Central Mexico. *Ambio: A Journal of the Human Environment*. 32(4): 252-7.
- Toledo, J.S. y García, M.C. 2000. Nutrición y alimentación de tilapia cultivada en América Latina y el Caribe. *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18. 1998* (537):83-137.
- Tomalá, C.N. 2011. Análisis de la composición de productos probióticos comerciales empleados en la larvicultura de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, usando una metodología de análisis molecular, PCR-DGGE. Tesis de grado presentada en Opción al título de Biólogo Marino. Universidad Estatal, Península de Santa Elena. Facultad de Ciencias.
- Toze, S. 2006. Reuse of effluent water—benefits and risks. *Agricultural Water Management*. 80:147-159.
- Turki, Y. 2013. Identification of three related genera, *Salmonella*, *Citrobacter* and *Proteus* using API 20E , 16S-23S rDNA intergenic transcribed spacer fingerprinting and 16S rDNA sequencing. *Academic Journals*. 7 (29): 3874-3884.
- Urquía, N.F. 2014. La seguridad alimentaria en México. *Salud Pública De México*. 56 (1): 92-99.
- Valdés, J., Guíñez, M., Castillo, A., Vega, S.E. 2014. Cu, Pb, and Zn content in sediments and benthic organisms from San Jorge Bay (northern Chile): Accumulation and biotransference in subtidal coastal systems. *Ciencias Marinas*. 40:45-58.
- Valenzuela, M., Lagos, B., Claret, M., Mondaca, M.A., Pérez, C., Parra, O. 2009. Contaminación fecal en agua subterránea en una pequeña Cuenca de Secano Rural en Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 69 (2): 235-43.
- Van Den Bogaard, A. E., London, N., Driessen, C., Stobberingh, E. E., 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47: 763-771.
- Vásquez-Piñeros, M. A., Rondón-Barragán, I. S., Restrepo-Betancur, L. F., Eslava-Mocha, P. R. 2010. Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp. *Orinoquia*.

14(1): 33-44.

- Villagomez, B.R.L. y Benavides, L.A.C. 2012. Elaboración de un probiótico a base de microorganismos nativos y evaluación de su efecto benefico al proceso digestivo de la tirapia roja (*Oreochromis spp.*). Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la vida, Santo Domingo.
- Villota, T.D., 2014. Biorremediación de aguas residuales con alta salinidad mediante bacterias halófitas aisladas de perfiles costeros de Ecuador. Universidad de Las Américas.
- Vinueza, S.K. 2015. Comparación entre las pruebas enzima-sustrato definido “Colilert” y tubos múltiples “fluorocult” para el diagnóstico de *E. coli* y coliformes totales en aguas tratadas. Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: Ingeniería en biotecnología de los recursos naturales. Universidad Técnica Salesiana, sede Quito.
- Wallach R. 1994. Groundwater contamination by sewage irrigation. *Groundwater contamination and control* (U. Zoller, Ed.). Marcel Dekker Inc., Nueva York. 189-202.
- Weinstein, M.R., Litt, M., Kertesz, D.A., Wyper, P., Rose, D., Coulter, M., McGeer, A., Facklam, R., Ostach, C., Willey, B.M., Borczyk, A., Low, D.E.1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *The New England Journal of Medicine*. 337(9): 589-594.
- Wu, M-L., Wang, Y-T., Wang, Y-S., Sun, F-L. 2014. Influence of environmental changes on picophytoplankton and bacteria in Daya Bay, South China Sea. *Ciencias Marinas*. 40: 197-210.

8. APÉNDICES

1. Sistema API 20E (Biomereux® FR).



Interpretación

Prueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H2S	producción de H ₂ S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	producción de acetoina (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	amarillo
INO	fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	amarillo
SOR	fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	amarillo
ARA	fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	amarillo

2. Pruebas bioquímicas: fundamento y resultados (MacFaddin J, 1990)

Prueba bioquímica	Fundamento	Resultados
1. Ensayo de la catalasa	La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua.	Ensayo positivo: La liberación del oxígeno se puede observar a simple vista por la formación de burbujas. Ensayo negativo: No se producen burbujas
2. Ensayo de la oxidasa	Determina la presencia del citocromo C. El citocromo C oxida al NNN'N',tetrametil,1-4, fenilendiamina (solución acuosa al 1% (p/v). La oxidación se detecta como color azul	Ensayo positivo: La reacción indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos. Ensayo negativo: No hay coloración
3. Ensayo en Agar hierro tres azúcares (TSI)	El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (SH_2). El medio contiene 1 parte (0.1%) de glucosa y 10 partes (1.0%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de SH_2 . Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa y/o sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de SH_2 se manifiesta por un ennegrecimiento del medio.	A. Estría ácida/fondo ácido (amarillo/amarillo): fermentación de glucosa, sacarosa y/o lactosa (<i>E. coli</i>). B. Estría alcalina/fondo ácido (rojo/amarillo): fermentación de glucosa solamente (<i>Shigella</i> spp.) C. Estría alcalina/fondo alcalino (rojo/rojo): no fermentador (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>). D. Precipitado negro en el fondo: producción de SH_2 (<i>Salmonella</i> spp). E. Burbujas o roturas: producción de gas (<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.)

Prueba bioquímica	Fundamento	Resultados
4. Ensayo en Agar Citrato de Simmons	En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.	Ensayo positivo: crecimiento y color azul en el pico, alcalinidad. Ensayo negativo: el medio permanece de color verde debido a que no hay desarrollo bacteriano y no hay cambio de color
5. Ensayo en Agar Lisina Hierro (LIA)	La decarboxilación de la lisina a cadaverina produce una alcalinización del medio y un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la reacción tiene lugar en medio ácido, es necesario la fermentación previa de la glucosa. Los microorganismos que no decarboxilan lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje al amarillo en todo el medio. La formación de SH₂ produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido. Las bacterias del grupo <i>Proteus</i> sp., <i>Providencia</i> sp., con excepción de <i>Morganella morganii</i>, desaminan la lisina a ácido α-cetocarbónico que forma compuestos pardo-rojizos en el medio de cultivo con la sal de hierro y en aerobiosis	Ensayo positivo: Los microorganismos que descarboxilan la lisina producen un viraje al violeta. Ensayo negativo: Los microorganismos que no descarboxilan la lisina y fermentan glucosa producen un viraje al amarillo. Hay veces que se observa la parte superior del medio violeta. La formación de SH₂ se indica por la aparición de una coloración negra.

Prueba bioquímica	Fundamento	Resultados
6. Ensayo de movilidad, actividad de ornitina decarboxilasa y producción de indol (MIO)	Por su composición, es posible detectar tres reacciones en un mismo tubo: movilidad, presencia de ornitina decarboxilasa e indol. La movilidad se demuestra por un enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea de inoculación. La reacción positiva a la ornitina está dada por un color púrpura del medio. Debido a la fermentación de la glucosa se reduce el pH produciendo una condición ácida y originando que el indicador de pH púrpura de bromocresol vire al amarillo. La presencia de acidez, otorga condiciones óptimas para la actividad de la enzima ornitina decarboxilasa, la cual decarboxila la ornitina presente. Por decarboxilación, se alcaliniza el medio, con el consecuente viraje del indicador hacia el color púrpura. El indol, es producido a partir del triptofano por los microorganismos que contienen la enzima triptofanasa. El desarrollo de un color rojo luego de agregar unas gotas de reactivo de Kovac's o de Erlich, indica un resultado positivo	Movilidad: Resultado positivo: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra. Resultado negativo: crecimiento solamente en la línea de siembra. Ornitina decarboxilasa: Resultado positivo: color púrpura. Resultado negativo: color amarillo. A veces se puede desarrollar un color violáceo en la superficie del medio. Prueba del indol: La prueba de indol se realiza una vez que se ha determinado la movilidad y la prueba de ornitina. Resultado positivo: color rojo al agregar el reactivo revelador. Resultado negativo: el color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento.
7. Ensayo del Rojo de Metilo	Se usa para determinar la presencia de iones hidrógeno cuando un microorganismo fermenta glucosa. Todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae convierten glucosa en ácido pirúvico por el camino de Embden-Meyerhof. Los organismos que metabolizan ácido pirúvico producen ácido y bajan el pH a menos de 4.4. Los organismos que utilizan, en cambio, el camino del butilenglicol producen acetoina y butanodiol (diacetilo). El indicador del medio, rojo de metilo, es rojo a pH < 5.0 y amarillo a pH > 5.8	Ensayo positivo: el reactivo permanece rojo. Ensayo negativo: el reactivo se torna amarillo-naranja. Si el resultado es negativo continuar la incubación de la bacteria por 24 horas más.

Prueba bioquímica	Fundamento	Resultados
8.Ensayo de Voges Proskauer	El piruvato es un intermediario en el metabolismo de la glucosa. A partir del ácido pirúvico un microorganismo puede seguir varios caminos. Algunos lo rompen para formar como productos finales ácidos láctico, acético o fórmico. Otros metabolizan el piruvato por el camino del butilenglicol para formar como productos finales acetoína (acetilmetilcarbinol) y 2,3-butanodiol (diacetilo). El ensayo de Voges-Proskauer (VP) detecta estos productos metabólicos. En presencia de oxígeno e KOH, la acetoína se oxida a diacetilo, que da un complejo rojo. La sensibilidad del ensayo se aumenta por el agregado de α -naftol antes del agregado de KOH.	Ensayo positivo: desarrollo de color rojo dentro de los 15 minutos. Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

3. Medidas utilizadas para la construcción de la Escala de Mc Farland

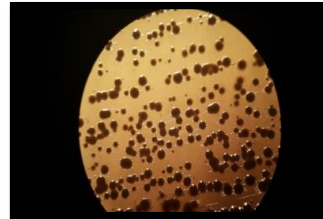
Estándar No.	BaCl ₂ (1,175%)	H ₂ SO ₄ (1%)
0,1	0,1	99,99
0,3	0,3	99,97
0,5	0,5	99,95
0,7	0,7	99, 93
0,9	0,9	99,91
1,1	1,1	98,9
1,3	1,3	98,7

4. Fotografías realizadas al microscopio óptico (1000 X). Cepas del período de secas.

LEYENDA: **SB:** Agar Sulfito de Bismuto, **Mc:** Agar MacConkey, **SS:** Agar Salmonella-Shigella, **TCBS:** Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa

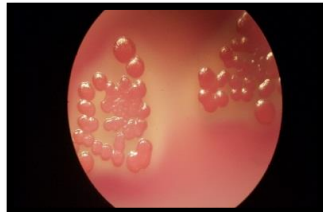
A

SB



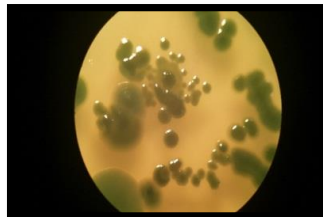
B

Mc



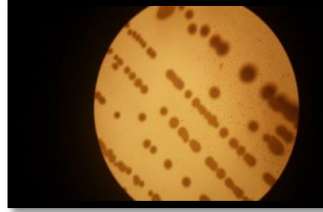
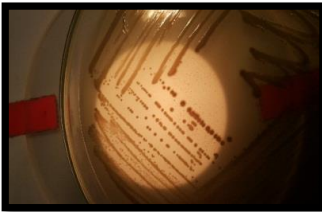
C

TCBS



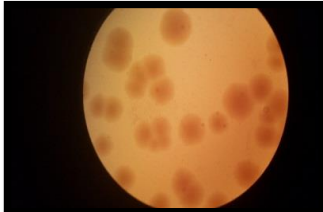
D

SB



E

SS



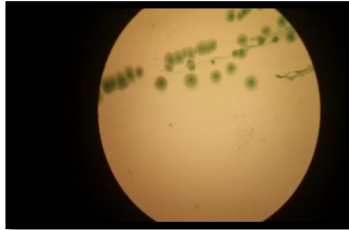
F

Mc



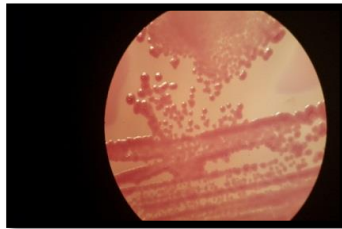
G

SB



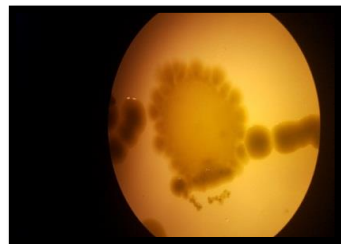
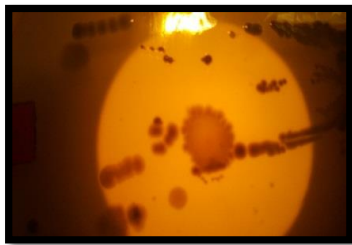
H

Mc



I

TCBS



J

TCBS



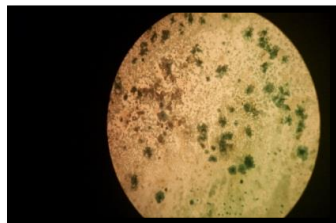
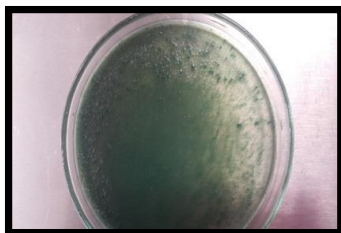
K

Mc



L

TCBS



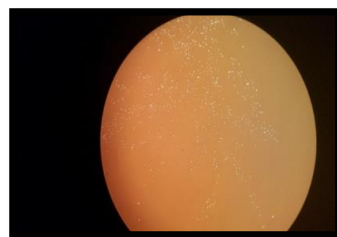
M

SS



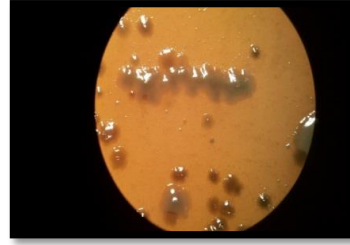
N

SS



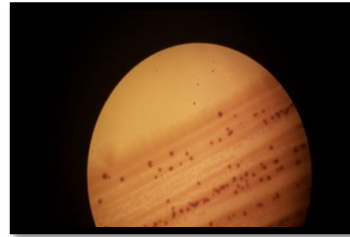
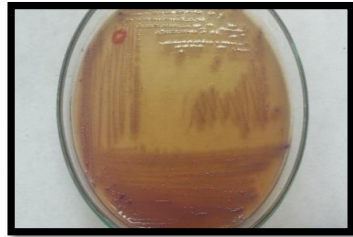
Ñ

SB



O

Mc



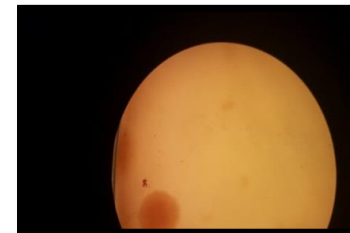
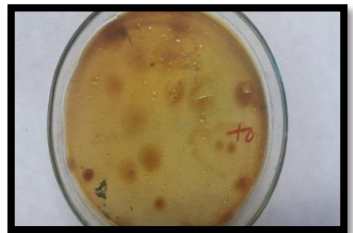
P

SS



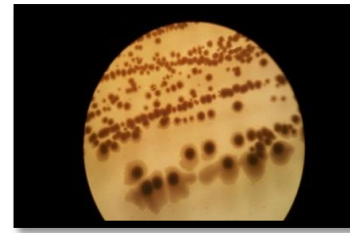
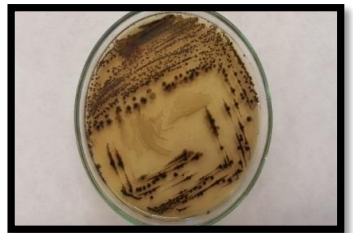
Q

SS



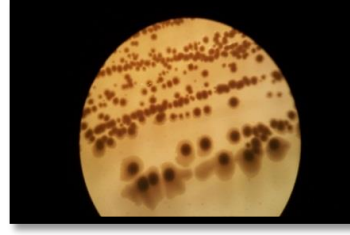
R

SB



S

SB



Las cepas aisladas R, S, T, U, V y W mostraron al microscopio estereoscopico características morfo culturales muy similares como se muestra en la imagen anterior. Por eso se tomó sólo esta foto para hacer una representación de las últimas cinco.