

## Veterinaria México

Volumen 34  
Volume

Número 3  
Number




Julio-Septiembre 2003  
July-September

*Artículo:*




### Presencia de plásmidos en pseudomonas aisladas de peces de ornato

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de  
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in  
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

# Presencia de plásmidos en pseudomonas aisladas de peces de ornato

## Presence of plasmids in pseudomonas isolated from ornamental fish

Pilar Negrete Redondo\*  
Jorge Romero Jarero\*\*  
Gabriela Villegas López\*\*\*  
Verónica del Carmen Vázquez Sánchez†

---

### Abstract

Following the analysis of the sanitary condition of production in fish farms from the state of Morelos in Mexico, which have used antibiotics continuously in order to prevent bacterial infection since all the fish farms have presented outbreaks, six different species of the Pseudomonadaceae family: *Pseudomonas cepaciae*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sutzerii* and *Pseudomonas vesicularis* were isolated, purified and identified. These bacteria are pathogenic to both humans and fish. The alkaline lysis technique was used to obtain DNA from these bacteria. Antibiotic resistant plasmids of very high molecular weight were obtained from all of them. Base pair number was determined for all plasmids. We demonstrated the use of antibiotics as preventative medicine against bacterial infections in all of the farms sampled. The objective of this study was to identify the presence of plasmids that are resistant to antibiotics in bacteria from the Pseudomonadaceae family from ornamental fish from the Cichlidae, Poeciliae and Cyprinidae families, cultivated in fish farm from the state of Morelos, Mexico.

**Key words: ORNAMENTAL FISH, AQUACULTURE, PSEUDOMONAS, PLASMIDS, ANTIBIOTICS.**

### Resumen

Después de haber efectuado el análisis de las condiciones sanitarias de producción de granjas piscícolas del estado de Morelos, México, que han usado sistemáticamente antibióticos para prevenir y controlar las infecciones de origen bacteriano sobre los cultivos, todas las granjas han presentado epizootias, se aislaron, purificaron e identificaron seis especies de bacterias pertenecientes a la familia pseudomonadaceae: *Pseudomonas cepaciae*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sutzerii* y *Pseudomonas vesicularis*, son patógenas del ser humano y de peces. Mediante la técnica de extracción alcalina, se determinó la presencia de plásmidos resistentes a antibióticos, de alto peso molecular, en todas las cepas. Se determinó el número de bases para cada plásmido. Se comprobó el uso de antibióticos como medida preventiva de infecciones bacterianas en las granjas en donde se efectuaron los muestreos. El objetivo del presente estudio fue comprobar la presencia de plásmidos resistentes a antibióticos en bacterias de la familia pseudomonadaceae de peces de ornato pertenecientes a las familias de los cíclidos, poecilidos y cyprinidos, cultivados en granjas piscícolas de Morelos, México.

**Palabras clave: PECES ORNAMENTALES, ACUICULTURA, PSEUDOMONAS, PLÁSMIDOS, ANTIBIÓTICOS.**

---

Recibido el 14 de octubre de 2002 y aceptado el 12 de marzo de 2003.

\* Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D. F.

\*\* Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

\*\*\* Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D. F.

† Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, México, D. F.

**R**ivers, streams, ponds, springs and other water sources can become contaminated by drainage deposits from big cities, agricultural activities and toxic deposits, all of which favor the development of microorganisms. In aquaculture farms, water is not the only access point for disease-causing agents that can enter the cultivation system, given that, on occasion, these agents can enter via the feed, through the introduction of certain fish to the ponds, as well as through inadequate installation management.<sup>1</sup> In all cases, these cause the producer serious problems by favoring the development of pathogenic bacteria and the manifestation of infectious diseases. The producer applies antibiotics to the ponds in order to control the problem,<sup>2</sup> but when these are used indiscriminately and are found in large quantities in the aquatic environment, microbial cells develop antibiotic resistance via selective toxicity, thus implying that a drug can be harmful for an organism without being so for the host.<sup>3-5</sup> Plasmids, which are responsible for this resistance, are extrachromosomal elements denominated the R factors that promote chromosomal transfer and, as such, are considered important elements in the evolution of bacterial cells.

Since the 1970's there have been reports of pathogenic bacteria that are resistant to antibiotics in fish cultivated on farms. This situation can considerably limit productive potential, as well as help develop zoonosis when pathogenic bacteria are not completely eliminated from aquatic organisms meant for human consumption.<sup>6</sup>

The objective of the present study is to prove the presence of plasmids that are resistant to the most commonly used antibiotics in aquaculture, in bacterial strains isolated from ornamental fish cultivated in fish farms from the state of Morelos in Mexico, where this type of farming has developed during the last ten years.

During the winter of 2000, 15 fish farms located in the state of Morelos received sanitary inspections due to the manifestation of severe production losses of fish lost to infections of bacterial origin, as well as to evaluate the sanitary and management conditions of these farms and confirm the etiological agent responsible. Part of the observation guide and questionnaire put forth to the producer included questions concerning the use of antibiotics and other chemicals as bacterial infection combatants, with details of the type and administration time of said chemicals.

Ornamental fish that were exhibiting signs of infection were collected, obtaining a total of ten fish from

**L**os ríos, arroyos, lagunas, manantiales y otras fuentes, pueden contaminarse con descargas de drenajes de grandes ciudades, por actividades agropecuarias y descargas de tóxicos, esto favorece el desarrollo de microorganismos. En las granjas acuícolas, el agua no es la única vía de introducción de agentes causales de enfermedades que pueden entrar en el sistema de cultivo, ya que en ocasiones pueden incorporarse mediante el alimento que se proporciona a los individuos en cultivo, o tal vez se deba a una inadecuada introducción de individuos a los estanques, así como al inadecuado manejo de las instalaciones,<sup>1</sup> lo que ocasiona al acuicultor serios problemas al favorecer el desarrollo de bacterias patógenas y la manifestación de enfermedades infecciosas. El acuicultor aplica antibióticos a los estanques para controlar el problema,<sup>2</sup> pero cuando son utilizados indiscriminadamente y se encuentran en grandes cantidades en el ambiente acuático, las células microbianas desarrollan resistencia a los antibióticos por toxicidad selectiva, esto implica que un medicamento puede ser nocivo para el microorganismo sin serlo para el huésped.<sup>3-5</sup> Los responsables de esta resistencia son los plásmidos, elementos extracromosómicos llamados factores R, que promueven la transferencia cromosómica, por ello son considerados elementos de importancia en la evolución de las células bacterianas.

Desde la década de los años 70 del siglo pasado, se ha informado de poblaciones resistentes a antibióticos en bacterias patógenas de peces cultivados en granjas acuícolas. Esta situación puede limitar considerablemente el potencial productivo, así como desarrollar zoonosis al no eliminar totalmente las bacterias patógenas de organismos acuáticos destinados para alimentación humana.<sup>6</sup>

El objetivo del presente trabajo es comprobar la presencia de plásmidos resistentes a antibióticos de uso común en la acuicultura, en cepas bacterianas aisladas de peces de ornato cultivados en granjas piscícolas de Morelos, México, donde esta actividad se ha desarrollado durante los últimos diez años.

En el invierno de 2000 se realizaron prospecciones sanitarias a 15 granjas piscícolas de Morelos, debido a la manifestación de graves pérdidas en la producción de peces por infecciones de origen bacteriano, para evaluar las condiciones sanitarias de manejo y producción de estas granjas desde el punto de vista sanitario y confirmar el agente etiológico. Como parte de la guía de observaciones y preguntas al productor, se cuestionó el uso de antibióticos u otros químicos como control de infecciones bacterianas, forma y tiempo de administración.

Se obtuvieron individuos con signos de infección, de cultivos de peces de ornato, pertenecientes a las familias ciclidae, poecilidae y cyprinidae (diez peces de cada fami-

each of the ciclidae, poecilidae and cyprinidae families. Fish were extracted from the cultivation ponds using a fish net, and were immediately euthanized by placing them in a 1% xylacine bath and then proceeding to the dissection. Prior to the first incision, disinfection of the dissection area was carried out using a swab dipped in ethyl alcohol. Dissection was carried out by cutting along the lateral line, from the operculum to the anus, so as to expose the viscera. A sterile bacteriological loop was used to collect a kidney sample from each fish,<sup>7,8</sup> which was then inoculated onto a brain-heart infusion agar (BHIA).

Samples were transported to the laboratory where they were incubated for 24 h at room temperature. They were then purified through successive re-inoculations onto the same type of agar. Once the purity of the samples had been proved via microscopic observation, they were Gram-stained. Gram negative strains were identified using API-20E and API-20NE<sup>9,10</sup> and complementary identification tests.<sup>11</sup>

The susceptibility of the strains identified to the following antibiotics: bacitracin, ampicillin, streptomycin, trimethoprim, kanamycin and chloramphenicol, was determined using the standard single disk method.<sup>12</sup> Strains were inoculated onto Lurian and Bertani (LB) agar plates, incubated at 30°C for 24 h, and then colonies were transferred to 5 ml tubes containing LB broth until a McFarland turbidity of 0.5 was obtained. Strains were then inoculated onto Huller-Milton agar plates using a sterile swab and, after 15 min, were placed on sterile filter disks impregnated with the previously described antibiotics, each at a 30 µg concentration, and incubated at 30°C for 24 h. Strains were classified as resistant (R), intermediate (I) or susceptible (S), depending on the diameter of the inhibition halo produced, as measured by Vernier calipers and including the diameter of the filter disk (6 mm).<sup>14,15</sup>

Following inoculation on LB agar plates and incubation at 30°C for 24 h, the colonies were transferred to 5 ml tubes containing LB broth, and incubated in a constant agitation water bath at 30°C for 24 h. A pipette was used to transfer 2 ml of the culture to a sterile Eppendorff tube for centrifugation at 4666 g for 30 s and subsequeute removal of the supernatant. The pellet that remained at the bottom of the Eppendorff tube was resuspended in 100 µl of lysozyme solution and agitated with a Vortex for 1 min, then incubated on ice for 30 min. Following this, 200 µl of sodium dodecyl sulfate was added and mixed gently by inversion, then incubated on ice for 5 min, after which 150 µl of 3M sodium acetate were added and mixed by inversion, for incubation during 60 min and further centrifugation at 4666 g for 5

lia). Los peces se extrajeron de los estanques de cultivo con una red de cuchara, inmediatamente después se sacrificaron adormeciéndolos en baño de xilocaína al 1%. Posteriormente se efectuó la disección por arriba y a lo largo de la línea lateral, desde el opérculo y hasta el ano, de tal manera que fueran expuestas las vísceras; los cuerpos de los individuos fueron previamente desinfectados, pasando sobre el campo de disección un hisopo impregnado con alcohol etílico. Con un asa bacteriológica previamente esterilizada, se tomó una muestra del riñón de cada uno de los peces,<sup>7,8</sup> y se sembró en placas de agar de infusión de cerebro corazón (BHIA, por sus siglas en inglés).

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio, en donde se incubaron por 24 h a temperatura ambiente, posteriormente se procedió a purificar por resiembras sucesivas en placas del mismo agar. Una vez comprobada la pureza de las cepas mediante observación de microscopio óptico, se efectuó la tinción de gram, las cepas que tiñeron gram negativo fueron identificadas por medio del API-20E y API-20NE<sup>9,10</sup> y pruebas de identificación complementarias.<sup>11</sup>

La susceptibilidad a los antibióticos bacitracina, ampicilina, estreptomycin, trimetropim, kanamicina y cloranfenicol, de las cepas identificadas, se determinó por el uso del método en placa.<sup>12</sup> Las cepas se sembraron en placas de agar de Lurian y Bertani (LB), se incubaron a 30°C durante 24 h, las colonias que crecieron se trasladaron a tubos con 5 ml de caldo de LB hasta obtener turbidez de 0.5 de Mc Farland,<sup>13</sup> enseguida con un hisopo estéril se sembraron las cepas en placas de agar de Huller-Milton, después de 15 min se colocaron los discos de papel filtro estéril, impregnados de los antibióticos anteriormente mencionados a concentración de 30 µg cada uno, se incubaron a 30°C durante 24 h. Las cepas se clasificaron en resistentes (R), intermedio (I) o susceptibles (S), dependiendo del diámetro de los halos medidos con un vernier, incluyéndose el diámetro del papel filtro (6 mm).<sup>14,15</sup>

Después de haber sembrado las cepas en placas de agar de LB, y de incubarse a 30°C durante 24 h; las colonias crecidas se trasladaron a un tubo con 5 ml de caldo de LB, se incubaron a baño María con agitación a 30°C durante 24 h; con una pipeta se transfirieron 2 ml del cultivo a otro tubo estéril Eppendorff, se centrifugó a 4 666 g durante 30 seg y se removió el sobrenadante. La pastilla que permaneció en el fondo del tubo Eppendorff se resuspendió con 100 µL de solución de lisosima; esto último se logró agitándose con un vortex durante 1 min, posteriormente se incubó en hielo durante 30 min, se agregaron 200 µL de duodecil sulfato de sodio, se mezcló suavemente por inversión y se incubó durante 5 min en hielo, después de lo cual se añadieron 150 µL de acetato de sodio 3 M, se mezcló suavemente por inversión del tubo y se incubó por 60 min, nuevamente se centrifugó durante 5 min a 4666 g, el sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorff estéril y se añadieron 1 000 µl de etanol frío, se incubó 30

min. The supernatant was transferred to another sterile Eppendorff tube and 1000 µl of cold ethanol were added. This was then incubated for 30 min, after which another 30 min centrifugation at 4666 g was carried out. Supernatant was once again removed and the pellet was dissolved in 100 µl of 0.1 M sodium acetate and 0.05 M Tris (pH 8), reprecipitating in 300 µl of cold ethanol. The supernatant was eliminated and 10 µl of 5X sample buffer solution (25% saccharose, 5mM sodium acetate, 0.05% bromophenol blue and 0.1% SDS) were added.

Extractions were treated with type I-AS bovine pancreatic RNase at a 0.01 µg/ml concentration, then incubated in a 60°C water bath for 10 min.

A total of 10 µl of the samples obtained were added to the 0.6% agarose gel wells for electrophoretic analysis. The gel was prepared with a TB borate buffered running solution at both 0.5% and 0.6% of agarose. Electrophoresis was carried out at 70 V and 250 W. The gel was stained for 45 min in an etidium bromide solution dissolved in distilled water, at a 0.5 µg/m concentration. The gel was then washed with water for 30 sec, so as to eliminate excess etidium bromide, and placed in a short-wave UV ray transilluminator. Photographs of the gel were taken with the transilluminator and with an instant Polaroid camera using Polaroid 667 film. The same procedure was used to process the reference *Escherichia coli* strains (HB 101, R27 and RP24); these reference plasmids were used to trace the linear regression curve.<sup>16</sup>

The extractions from the samples of *Pseudomonas* isolated were run in a gel simultaneously using a known molecular marker: GENE RULER™ 1kb DNA LADDER. Finally, the relative mobility of the plasmids and the reference marker were measured. The number of base pairs in the reference marker (10000 bp) and the measurements were used to calculate the molecular sizes (in base pairs) of the samples.

Sixty bacterial strains from the pseudomonadaceae family, belonging to six different species, distributed as follows: 12 *Ps. cepaciae* strains, eight *Ps. diminuta* strains, 14 *Ps. fluorescens* strains, 12 *Ps. putida* strains, seven *Ps. stutzeri* and seven *Ps. vesicularis* strains, were identified.

All the strains identified were resistant to the antibiotics tested, since none presented inhibition halos. Plasmids were obtained from all strains mentioned (Figure 1).

The *E. coli* reference plasmids (HB 101, R27 and RP24) were used to obtain the linear regression curve on which the logarithm of the relative mobility of the plasmids (ordinate axis) and the molecular weight expressed in MDa (abscissas axis) were plotted. The molecular weights of the problem plasmids were calculated by extrapolating the logarithm of the relative

min para posteriormente centrifugarse 30 min a 4666 g, se removió el sobrenadante y la pastilla se disolvió con 100 µl de acetato de sodio 0.1M y tris 0.05M pH 8, reprecipitándose en 300 µl de etanol frío. El sobrenadante se eliminó y se agregaron 10 µl de solución amortiguadora de muestra 5X (sacarosa al 25%, acetato de sodio 5 mM, azul de bromofenol al 0.05% y SDS al 0.1%).

Las extracciones se trataron con RNase pancreática de bovino tipo I-AS, a concentración de .01 µg/ml, se incubaron a baño María a 60°C durante 10 min.

Se aplicaron 10 µl de las muestras obtenidas en los pozos de gel de agarosa al 0.6% para el análisis de electroforesis. El gel se preparó con solución amortiguadora de borato TB de corrida al 0.5% y 0.6% de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo a 70V, 250 W de poder. El gel se tiñó durante 45 min en una solución de bromuro de etidio disuelto en agua destilada a concentración de 0.5 µg/m. El gel se lavó con agua durante 30 seg con el fin de eliminar excesos de bromuro de etidio, se colocaron en un transiluminador de rayos UV de longitud de onda corta. Las fotografías del gel se tomaron con transiluminador y con cámara fotográfica Polaroid instantánea con cartuchos de película polaroid 667. Se efectuó el mismo procedimiento con cepas de *Escherichia coli* de referencia (HB 101, R27 y RP24), con estos plásmidos de referencia se trazó la curva de regresión lineal.<sup>16</sup>

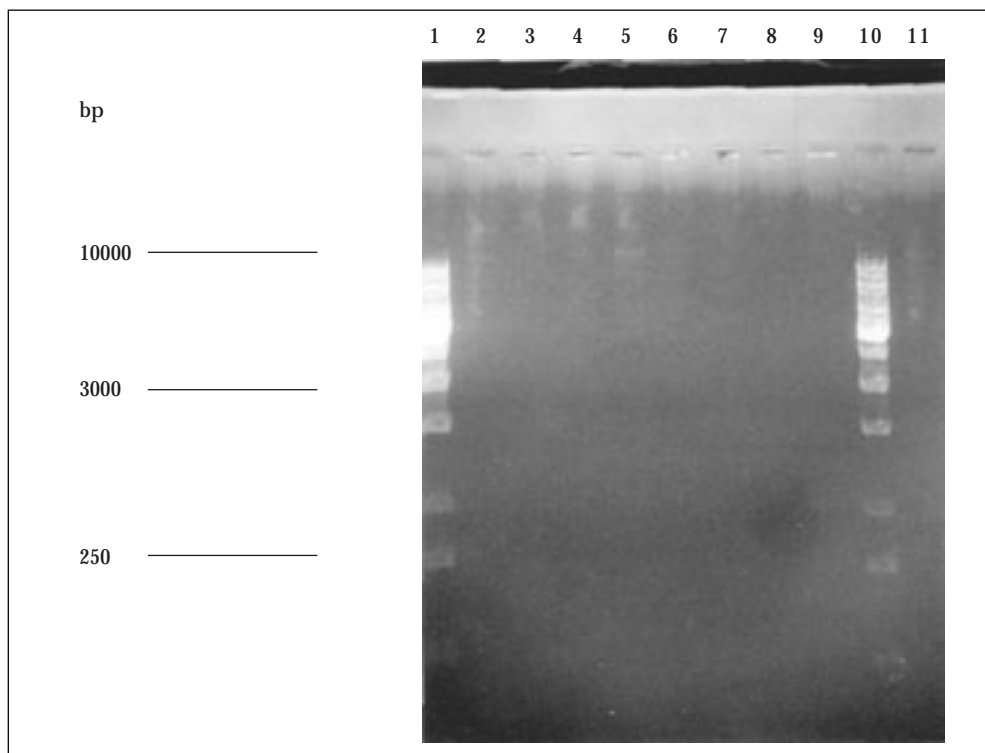
Las extracciones procedentes de *pseudomonas* aisladas de las muestras se corrieron en gel simultáneamente con el marcador molecular conocido: GENE RULER™ 1kb DNA LADDER, finalmente se midió la movilidad relativa de los plásmidos y del marcador de referencia, aplicando una regla de tres inversa para obtener los tamaños moleculares en número de bases de pares, en función del número de pares de bases conocido del marcador (10 000 pb).

Se identificaron 60 cepas bacterianas de la familia pseudomonadaceae, pertenecientes a seis especies diferentes: 12 cepas *Ps. cepaciae*, ocho cepas *Ps. diminuta*, 14 cepas *Ps. fluorescens*, 12 cepas *Ps. putida*, siete cepas *Ps. stutzeri* y siete cepas *Ps. vesicularis*.

Todas las cepas aisladas identificadas resultaron resistentes a los antibióticos probados, al no presentar halos de inhibición. Se obtuvieron plásmidos en todas las cepas anteriormente mencionadas (Figura 1).

Con los plásmidos de referencia de *E. coli* (HB 101, R27 y RP24) se obtuvo la curva de regresión lineal en la cual se graficó el logaritmo de la movilidad relativa de los plásmidos (eje de las ordenadas) y su peso molecular expresados en MDa (eje de las abscisas). Los pesos moleculares de los plásmidos problema se calcularon extrapolando el logaritmo de la movilidad relativa del ADN para cada una de las extracciones en la curva obtenida, se obtuvieron los pesos moleculares y sus correspondientes número de pares de bases para cada uno de los plásmidos extraídos de las *pseudomonas* (Cuadro 1).





**Figura 1.** Gel de agarosa (1) Marcadore de peso molecular Fermentas 1kb; (2) *Pseudomonas vesicularis*; (3) *Pseudomonas fluorescens*; (4) *Pseudomonas diminuta*; (5) *Pseudomonas fluorescens*; (6) *Pseudomonas fluorescens*; (7) *Pseudomonas diminuta*; (8) *Pseudomonas cepaciae*; (9) *Pseudomonas putida*; (10) Marcadore de peso molecular Fermentas 1kby (11) *Pseudomonas sutzerii*. (GeneRuler™.MBFERMENTAS. 1kb. DNA Ladder.)  
 Agarose gel (1) Molecular weight marker Fermentas 1 kb; (2) *Pseudomonas vesicularis*; (3) *Pseudomonas fluorescens*; (4) *Pseudomonas diminuta*; (5) *Pseudomonas fluorescens*; (6) *Pseudomonas fluorescens*; (7) *Pseudomonas diminuta*; (8) *Pseudomonas cepaciae*; (9) *Pseudomonas putida*; (10) Molecular weight marker Fermentas 1 kb; and (11) *Pseudomonas sutzerii*. (GeneRuler™.MBFERMENTAS. 1kb. DNA Ladder.)

mobility of the DNA for each of the extractions on the calculated curve. Molecular weights and the corresponding base pairs for each of the plasmids extracted from the *Pseudomonas* were obtained (Table 1).

The molecular weights resulted to be too high, falling beyond the regression curve. Therefore, we opted to use markers of known molecular weights;<sup>17</sup> the ranges of the molecular weights registered ran from 3,157 bp up to 30 000 bp. In the agarose gel, wells 2, 3, 4, 5 and 11 had more than one band (Figure 1). When calculating the MDa corresponding to each range of base pairs, the ranges obtained were from 286 MDa to 343 MDa.

All the plasmids extracted from the *Pseudomonas* strains presented ranges in common, between 3 000 bp, 18 000 bp and 16 363 bp, thus confirming that the bacteria received an antibiotic in common.

The *E. coli* markers, HB 101, R 27 and RP 24, had molecular weights of 143 MDa, 112 MDa and 136 MDa, respectively, corresponding to  $92\,500 \times 10^6$ ,  $22\,800 \times 10^6$  and  $88\,400 \times 10^6$ . When plotting a curve with these, the molecular weights and the logarithm of the relative mobility of the plasmids under investigation would not fit, since their weights were too heavy, ranging from 3 157 bp to 30 000 bp (Table 1).

The fact that plasmids with high molecular weights (3 157 to 16 363 bp) were located, indicates exposure of cultivated organisms, from which bacterial strains were isolated, to indiscriminate antibiotic dosing and use,

Los pesos moleculares fueron demasiado elevados, saliendo fuera de la curva de regresión, por lo que se optó por usar marcadores de peso molecular conocidos;<sup>17</sup> los rangos de los tamaños moleculares registrados fueron desde 3 157 pb hasta 30 000 pb. En los pozos del gel de agarosa: 2, 3, 4, 5 y 11 se obtuvo más de una banda (Figura 1). Al calcular los MDa correspondientes a cada rango de pares de bases se obtuvieron rangos desde 286 MDa hasta 343 MDa.

Todos los plásmidos extraídos de las cepas de *pseudomonas* presentaron en común de rangos entre 3 000 pb, 18 000 pb y 16 363 pb, lo que comprueba que las bacterias recibieron un antibiótico en común.

Los marcadores de las cepas *E. coli*, HB 101, R 27 y RP 24, registraron los pesos moleculares de 143 MDa, 112 MDa y 136 MDa, respectivamente, que corresponde a  $92\,500 \times 10^6$ ,  $22\,800 \times 10^6$  y  $88\,400 \times 10^6$ ; trazaron una curva dentro de la cual los pesos moleculares y el logaritmo de la movilidad relativa de los plásmidos problema no fue posible interpolar, debido a que sus pesos moleculares son demasiado pesados, con rangos desde 3 157 pb hasta 30 000 pb (Cuadro 1).

El hecho de haber encontrado plásmidos de pesos moleculares altos: 3 157 pb a 16 363 pb, indica la exposición de los organismos cultivados de donde se aislaron las cepas bacterianas a dosis y tipo de antibióticos de una forma indiscriminada, en comparación con el plásmido RP 24m, que fue resistente a la kanamicina, estreptomycin y la ampicilina.

**Cuadro 1**  
**PESO MOLECULAR DE PLÁSMIDOS EXTRAÍDOS DE *Pseudomonas* AISLADAS DE PECES DE ORNATO**  
**DE LAS FAMILIAS CICLIDAE, POECILIDAE Y CYPRINIDAE**  
**MOLECULAR WEIGHT OF PLASMIDS EXTRACTED FROM *Pseudomonas* ISOLATED FROM ORNAMENTAL FISH**  
**FROM THE CICLIDAE, POECILIDAE AND CYPRINIDAE FAMILIES**

| Well | Strain                         | Relative mobility | Log   | Molecular weight* | MDa |
|------|--------------------------------|-------------------|-------|-------------------|-----|
| 1    | Molecular weight marker        | 1.8               | .5440 | 1 000             | 286 |
|      |                                | 3.5               | .7481 | 5 143             | 147 |
|      |                                | 5.6               | .2552 | 3 214             | 91  |
| 2    | <i>Pseudomonas vesicularis</i> | 0.6               | .1461 | 30 000            | 858 |
|      |                                | 1.1               |       | 16 363            | 468 |
|      |                                | 1.5               |       | 12 000            | 343 |
| 3    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.6               | .1461 | 30 000            | 858 |
|      |                                | 1.1               |       | 16 363            | 468 |
| 4    | <i>Pseudomonas diminuta</i>    | 0.7               | .176  | 25 714            | 735 |
|      |                                | 0.1               |       | 18 000            | 514 |
| 5    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.6               | .2304 | 30 000            | 858 |
|      |                                | 1.0               | .777  | 18 000            | 514 |
|      |                                | 1.5               |       |                   |     |
| 6    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.5               | .413  | 30 000            | 858 |
| 7    | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0.5               | .413  | 30 000            | 858 |
| 8    | <i>Pseudomonas diminuta</i>    | 0.5               | .413  | 30 000            | 858 |
| 9    | <i>Pseudomonas cepaciae</i>    | 0.5               | .413  | 30 000            | 858 |
| 10   | <i>Pseudomonas putida</i>      | 0.5               | .413  | 30 000            | 858 |
| 11   | <i>Pseudomonas sutzterii</i>   | 0.7               | .76   | 25 714            | 735 |
|      |                                | 1.5               |       | 12 000            | 343 |
|      |                                | 2.3               |       | 7 826             | 223 |
|      |                                | 5.7               |       | 3 127             | 89  |
| 12   | Molecular weight marker        | 1.6               | .2552 | 11 500            | 343 |
|      |                                | 3.4               |       | 5 294             | 143 |

\*Gene Ruler TM.MB FERMENTAS. 1kb. DNA Ladder.

when compared to the RP 24m plasmids, that were resistant to kanamycin, streptomycin and ampicillin.

These high molecular weights could correspond to a mixture of plasmids with a closed circular shape (CCC). Intermediate weight plasmids could correspond to open chains (OC), while those with light molecular weights indicate the presence of linear open chains (COL) or even dimers of these.<sup>18</sup>

Obtaining multiplasmids from bacterial strains isolated from the kidneys of aquatic organisms cultivated on fish farms, proves the indiscriminate use of antibiotics of varying types and at high dosages as a preventative therapeutic strategy against bacterial infections.

In the sanitary inspection that took place at 15 fish farms, the use of antibiotics such as kanamycin, chloramphenicol and ampicillin incorporated into the feed, was proved, both through personal communications

Estos pesos moleculares tan elevados pueden corresponder a una mezcla de plásmidos de forma circular (CCC). Los plásmidos de pesos moleculares intermedios pueden corresponder a cadenas abiertas (OC), las de menores pesos moleculares indicarían la presencia de plásmidos de cadenas lineales abiertas (COL) o incluso a dímeros de ellas.<sup>18</sup>

La obtención de multiplasmidos en cepas bacterianas aisladas de riñón de organismos acuáticos cultivados en granjas acuícolas prueba el uso indiscriminado de antibióticos de diferente tipo y en dosis elevadas, como estrategia terapéutica preventiva de infecciones bacterianas en estos cultivos.

En la prospección sanitaria efectuada, a las quince granjas acuícolas, se comprobó el uso de antibióticos como kanamicina, cloranfenicol y ampicilina, incorporado al alimento, por comunicación personal de los produc-

from the producers and from the results obtained during the antibiotic resistance analysis on each isolated strain. The routine administration of antibiotics in the feed is considered both a growth and fattening strategy in the cultivated organisms, and is employed without prior knowledge and understanding of the antibiotics being used.

## Referencias

1. Romero JJ, Salas TA. Estudio de frecuencias de enterobacterias resistentes a antibióticos y metales pesados aisladas en ambientes marinos. *Biotechnol Bioeng* 1993;AM54-57.
2. Amabilé C F. La resistencia bacteriana a los antibióticos. *Cienc Des* 1988;80:57-68.
3. Schutt C. Plasmid in the bacteria assemblage of a dystrophic lake, evidence for plasmid encode. *Microbiol Ecol* 1989;17:49-56.
4. Kobari H, Sullivan C W, Shizuya H. Bacterial plasmid in antarctic natural microbial assemblages. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:246-262.
5. Tórtora G J, Funke B R, Case Ch L. Introducción a la microbiología. 3ª ed. España: Acribia 1995.
6. Aoki T. Technology of antibiotics resistant determinants of R-plasmid from fish pathogenic bacteria. V International Symposium of Microbiology and Ecology. 1989 august 27-september 1; Kyoto, Japan. Japanese Microbiology Society 1989:571-576.

tores y por los resultados obtenidos del análisis de la resistencia a antibióticos efectuada a las cepas aisladas de las muestras de estas granjas. Esta práctica se considera como estrategia de crecimiento y engorda de los organismos cultivados, administrados rutinariamente, sin conocimiento de la concentración de estos antibióticos.

7. Austin B, Austin, D A. Bacterial fish pathogen diseases in farmed and wild fish. London: England Ellis Horwood Ltd 1987.
8. Munro A L S. The pathogenesis of bacterial diseases of fish. En Robles RJ editor *Microbial diseases of fishes*. London: Academic Press 1982;131-149.
9. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria, 4<sup>a</sup> ed. Francia: BioMerioux 1977
10. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative bacteria, 4<sup>a</sup> ed. Francia: BioMerioux 1989.
11. Bradshaw L.J. *Laboratory microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1973.
12. Bauer A, Kirby W M, Sherris J C, Tueck, M. Antibiotic susceptibility by a standard single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;36:493-496.
13. Hindler, J. Antimicrobial susceptibility testing. In: Isenberg H.D editor. *Clinical Microbiology Procedures. Handbook*. Washington: Ame Soc Microbiol, 1992.
14. Giono C S. Prueba de Baues-Kirby para sensibilidad a los antimicrobianos. *Infectol. III*. 1983;7:325.
15. Stanley R S. *Lynch's Medical Laboratory Technology*. Philadelphia: WB Saunders, 1983.
16. Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular cloning (Laboratory Manual)*, 11a ed. New York: Cold Harbor Laboratory, 1995.
17. Ausubel M F, Brent R, Kingston E R. *Short protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons, Inc 1999.

