



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD XOCHIMILCO**

---

---

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**INFORME FINAL DEL SERVICIO SOCIAL POR INVESTIGACIÓN**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite  
esencial de naranja en bacterias de *Tubifex* sp  
como alimento de *Ambystoma***

**QUE PRESENTA EL ALUMNO:**

**Missael Alejandro Barrón Pineda**

**Matrícula: 2163081607**

**ASESORES:**

**Dra. Gabriela Vázquez Silva (30288)  
Departamento El Hombre y su Ambiente, UAM Xochimilco**

**Dr. Jesús I. Morales Jiménez (45368)  
Profesor Invitado  
Departamento El Hombre y su Ambiente, UAM Xochimilco**

**CDMX**

**octubre, 2024**

## RESUMEN

El *Tubifex tubifex* comúnmente conocido como “tubi”, pertenece a la Familia Oligochaeta, es uno de los alimentos vivos con mayor demanda en el sector acuícola, debido a su contenido proteico, aceptación, tamaño, movimiento y cuerpo blando. Es utilizado en la dieta de diferentes especies acuáticas de interés comercial, ornamental y no convencional como es el caso del ajolote. Sin embargo, se considera un vector de bacterias, hongos y parásitos, ya que habita de forma natural en ambientes con alta contaminación orgánica, bajas concentraciones de oxígeno y se alimenta del detritus y de microorganismos. Algunos de los patógenos potenciales asociados a este anélido y que generan enfermedades son los miembros de la familia Enterobacteriaceae. Los géneros con mayor incidencia son enterobacterias de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* y *Citrobacter*. Es por ello, que se buscan alternativas para su depuración, como lo es el uso de los aceites esenciales, en especial el Aceite Esencial de Naranja (AEN) el cual presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, ansiolíticas y ha mostrado efecto antimicrobiano. De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del aceite esencial de naranja *Citrus* sp. en la supervivencia del gusano de fango *Tubifex tubifex* y su actividad antimicrobiana en enterobacterias. Para lo cual, se realizó la integración y análisis de las bases de datos generadas de pruebas *in vivo* con el gusano e *in vitro* de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial, pruebas de sensibilidad en cepas bacterianas como *E. coli*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp y *Vibrios* y pruebas *in vivo* de la actividad bacteriana en *Tubifex tubifex*. Los resultados muestran, que la supervivencia del gusano disminuyó con la incorporación de diferentes dosis del AEN conforme al tiempo de exposición, además se identificaron presuntivamente dos géneros bacterianos presentes en el *T. tubifex* (*Salmonella* sp, y *Shigella* sp,) y tres especies (*Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio Cholerae*). En cuanto a la CMI se observó inhibición del crecimiento bacteriano a partir de la dosis de 0.02%, mientras que en la prueba de sensibilidad no se observó inhibición. Por lo que es necesario realizar más evaluaciones para conocer la dosis óptima y el modo de acción en específico del AEN en el gusano para que pueda ser utilizado en la depuración bacteriana del gusano.

**Palabras clave:** aceite esencial, antimicrobiano, enterobacterias, *Tubifex tubifex*.

---

## INDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>2 MARCO TEORICO .....</b>	<b>7</b>
2.1 Hábitat de <i>Tubifex tubifex</i> .....	7
2.2 Descripción de la especie .....	7
2.3 <i>Tubifex tubifex</i> como alimento vivo.....	8
2.4 Microbiota en <i>Tubifex</i> .....	8
2.5 <i>Escherichia coli</i> .....	9
2.6 <i>Salmonella spp</i> .....	9
2.7 <i>Shigella spp</i> .....	10
2.8 <i>Vibrio spp</i> .....	11
2.9 <i>Aeromonas spp</i> .....	11
2.10 <i>Pseudomonas spp</i> .....	12
2.11 Depuración del gusano tubifex .....	13
2.12 Aceites esenciales como como alternativa para la inhibición del efecto bacteriano .....	14
2.13 Aceite esencial de naranja .....	15
<b>3 OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>16</b>

---

<b>4 OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>16</b>
<b>5 METODOLOGÍA.....</b>	<b>17</b>
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
6.1 Supervivencia del gusano de fango <i>Tubifex tubifex</i> .....	17
6.2 Biometría del gusano de fango <i>Tubifex tubifex</i> .....	18
6.3 Identificación y aislamiento de cepas presentes en el <i>Tubifex tubifex</i> .....	19
6.4 Carga bacteriana en <i>Tubifex tubifex</i> .....	23
6.5 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AEN .....	24
6.6 Pruebas de sensibilidad en placa del AEN .....	28
<b>7 DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>8 CONCLUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>9 REFERENCIAS .....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

El anélido *Tubifex tubifex* se encuentra en lodos fangosos de aguas con una alta contaminación orgánica, debido a esta característica se le atribuye su nombre común “gusano de fango”. Estos oligoquetos se alimentan principalmente de bacterias y microalgas, entre otros microorganismos acuáticos, además de materia orgánica en descomposición (Rodríguez *et al.*, 2001; Luna y Figueroa, 2007). Estos hábitos propician que el gusano sea portador de una variedad de bacterias que incluso podrían tener un potencial patogénico, sobre todo si se ofrece a organismos acuáticos en cultivo. Dentro de la microbiota bacteriana del gusano se ha reportado bacterias de las familias: Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Aeromonadaceae, Vibronaceae y las especies *Myxobolus cerebralis* agente infeccioso de salmónidos (Negrete *et al.*, 2010) y *Mycobacterium marinum* (Nenoph y Uhlemann, 2006). Estas bacterias patógenas son de alto riesgo en la acuicultura y de importancia para la salud pública (Espinosa de los monteros y Labarta, 1988; Negrete *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2004; Balbuena y Ríos, 2011; Parrado *et al.*, 2014).

*Tubifex* constituiría una excelente alternativa de alimentación en el mantenimiento de especies acuáticas si no contara con patógenos de alto riesgo en su microbiota bacteriana, por sus características tales como: movimiento, contenido proteico, tamaño aceptable y cuerpo blando, las cuales son atractivas para los organismos que lo consumen, ya que estimulan conductas predatorias aún en cautiverio (Luna y Figueroa, 2007; Rodríguez *et al.*, 2016). Unos de los principales problemas de la acuicultura es el inadecuado control de la calidad del agua, aumentando la susceptibilidad de los organismos acuáticos a contraer alguna enfermedad y el uso ilimitado de antibióticos en la prevención y terapia de las enfermedades infecciosas (Negrete *et al.*, 2010). El uso indiscriminado de los antibióticos ha facilitado la aparición de cepas bacterianas multiresistentes, con

graves consecuencias ambientales y para la salud animal y humana. Es por eso, que se han desarrollado múltiples alternativas biotecnológicas, preventivas y tratamientos, tales como el uso de aceites esenciales como estrategias para reducir el uso de antibióticos en los cultivos, ya sea para eliminar patógenos o para fortalecer el sistema inmune de los organismos cultivados (Díaz *et al.*, 2012). Los aceites esenciales obtenidos de las plantas mostraron tener propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiparasitarias, antiinflamatorias, antidiarreicas y antimicóticas. Asimismo, mejoran la conversión alimenticia, estimulan enzimas digestivas y dan mejor sabor a los alimentos. Diversos estudios en diferentes especies pecuarias demostraron sus beneficios para mejorar la digestibilidad, conversión alimenticia y productividad de los animales, así como su efecto antioxidante y antiparasitario, que los hace una alternativa viable al uso de aditivos y fármacos utilizados hasta ahora en la producción animal (Martínez *et al.*, 2015). El aceite esencial de naranja presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, ansiolíticas y ha mostrado efectividad antimicrobiana, para controlar *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Mycobacterium tuberculosis* y otras Micobacterias no tuberculosas, presentando una mayor efectividad sobre bacterias Gram positivas (Palazzolo *et al.*, 2013). Con base en lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del aceite esencial de naranja *Citrus* sp. en la supervivencia del gusano de fango *Tubifex tubifex* y su actividad antimicrobiana.

## 2 MARCO TEORICO

### 2.1 Hábitat de *Tubifex tubifex*

*Tubifex tubifex* es una especie cosmopolita que habita ambientes caracterizados por abundante material orgánico y sedimentos finos (<2 mm), tolerante a temperaturas extremas y desecación (Alexander, 2010). Se encuentra en aguas dulces contaminadas con baja oxigenación donde existe materia orgánica en descomposición, viven parcialmente enterrados en el fango, mantienen una separación de uno o dos milímetros entre cada individuo, de forma que en la superficie se observan manchas rojizas (Pérez, 2005). Aunque la alta densidad y la abundancia relativa de *T. tubifex* son indicadores de hábitats muy contaminados, la especie también se ha observado en ambientes oligotróficos (Kaesler y Sharpe, 2006).

### 2.2 Descripción de la especie

*Tubifex tubifex* comúnmente conocido como “tubi”, pertenece a la Familia Oligochaete, la cual está constituida por anélidos hermafroditas a los que también se les llama “gusanos de fango”. Su ciclo de vida es de 50-57 días a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . También se les suele llamar “gusanos de sangre” debido a su color rojo y al alto contenido de hemoglobina en su sangre (Luna y Figueroa, 2007). En su estado adulto mide aproximadamente de 1.5 a 5 cm de longitud con un grosor de 0.4 a 0.5 mm (Castro *et al.*, 2003), su cuerpo está dividido en subunidades denominadas metámeros, carecen de branquias. Una característica fundamental de la clase Oligoquetos es la ausencia de cabeza lo cual se observa en el *T. tubifex* ya que ésta se encuentra una pequeña estructura con una boca como órgano principal que constituye el inicio del tubo digestivo (Pérez, 2005).

## 2.3 Tubifex tubifex como alimento vivo

El alto contenido de nutrientes del alimento vivo favorece su empleo en las especies cultivadas. En las primeras etapas del desarrollo de los individuos cubre todas sus demandas nutricionales. Por ejemplo, *Tubifex* y *Artemia*, son dos especies que se utilizan ampliamente con estas premisas, sobre todo en cultivos de crustáceos y peces de ornato (Negrete *et al.*, 2001).

El gusano de fango (*Tubifex tubifex*) es una buena opción, como alimento vivo, por las siguientes razones: a) el tiempo de generación es corto en comparación con otros organismos (42 días); b) se produce en una amplia gama de hábitats; c) tiene una alta fecundidad, de 92 a 340 huevos; y d) se reproduce dentro de un intervalo de temperatura entre 0.5 - 30°C. Brinda un alto contenido proteico satisfaciendo el requerimiento nutrimental de los animales acuáticos: 8.1% de proteína cruda, (Negrete *et al.*, 2010), 59% de proteína (Rodríguez *et al.*, 2016), 50-55% de proteína (Herawati *et al.*, 2016), 63.32% de proteína (Mollah y Siddik, 2015), por lo que es también una excelente opción para los ajolotes (*Ambystoma* spp) ya que requieren de una dieta nutritiva para su óptimo crecimiento, reuniendo las características necesarias para la crianza (Rodríguez *et al.*, 2016).

## 2.4 Microbiota en *Tubifex*

Debido a que *Tubifex tubifex* vive en ambientes ricos en materia orgánica, con poco oxígeno, alimentados principalmente de residuos orgánicos en descomposición, su microbiota es diversa y presentan intervalos altos de contaminación bacteriana (Negrete *et al.*, 2001). Son vectores y portadores de bacterias de las familias: Enterobacteriaceae (*Salmonella arizona*, *Salmonella* spp, *Proteus rettgeri*, *Pantoea* spp, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Pasteurella peumotropica*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca* y *Providencia* spp) Pseudomonadaceae (*P. cepacia*), Aeromonadaceae (*A. hydrophila* y *A. Salmonicida*) Vibronaceae (*V. fluvialis*, *V. Cholerae* y *V.*

*Algynolyticus*) (Negrete *et al.*, 2001, 2008), Myxobolidae (*Myxobolus cerebralis*) (Negrete *et al.*, 2010) y Mycobacteriaceae (*Mycobacterium marinum*) (Nenoph y Uhlemann, 2006) .

Estas bacterias patógenas son de alto riesgo en la acuicultura y de importancia para la salud pública (Espinosa de los monteros y Labarta,1988; Negrete *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2004; Balbuena y Ríos, 2011; Parrado *et al.*, 2014).

## **2.5 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, de la familia Enterobacteriaceae, no esporulado, móvil y con flagelos peritricos, de alrededor de 0.5 µm de ancho por 3 µm de largo, resisten a presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas, mesófilo, con un óptimo de desarrollo a la temperatura corporal de los animales de sangre caliente (35 - 43 °C). Producen indol a partir de triptófano, no utilizan citrato como fuente de carbono y no producen acetoina. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas (Rodríguez, 2002). Usualmente se mantiene de forma inocua y confinado al lumen intestinal, sin embargo, en huéspedes inmunosuprimidos o cuando las barreras gastrointestinales son sobrepasadas las cepas de *E. coli* pueden producir infecciones. Las infecciones debidas a clones de *E. coli* patogénicos pueden limitarse a superficies mucosas o pueden diseminarse en todo el cuerpo. Dentro de las infecciones más frecuentes originadas por *E. coli* se encuentran las enfermedades entéricas y diarreas (Margall *et al.*, 1997).

## **2.6 *Salmonella spp***

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos, generalmente móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos y no esporulados. No fermentan la lactosa (excepto *Salmonella enterica subesp. arizonae* y *Salmonella enterica subesp. diarizonae*), fermentan

glucosa con producción de gas (excepto *Salmonella typhi*), no producen indol, no degradan la urea y decarboxilan la lisina y la ornitina (RENAPRA, 2021).

La salmonelosis es causada por una gran cantidad de especies de *Salmonella*. Se caracteriza por los signos de septicemias y enteritis aguda que puede convertirse en crónica. La enfermedad es vista en todos los animales y ocurre a nivel mundial. Los animales son a la vez importantes como reservorios de la infección humana, la cual es adquirida por vía oral al ingerir bebidas y comidas contaminadas, especialmente aves y huevos (Parra *et al.*, 2002). Las salmonelas son sensibles al calor, pueden sobrevivir en superficies como cerámica, vidrio y acero inoxidable, pero son destruidas fácilmente por los desinfectantes utilizados en la industria alimentaria (ej: 200 ppm cloro) (RENAPRA, 2021).

## **2.7 *Shigella spp***

El género *Shigella* pertenece a la Familia Enterobacteriaceae., son microorganismos Gram negativos, no encapsulados, anaerobios facultativos, inmóviles, oxidasa negativos, fermentadores de la glucosa. Con base en pruebas bioquímicas y serológicas se reconocen 4 especies: *Shigella dysenteriae* (Shiga, 1898), *Shigella flexneri* (Flexner, 1900), *Shigella boydii* (Boyd, 1938) y *Shigella sonnei* (Sonne, 1915). Todas las especies poseen capacidad patógena, causando enteritis invasora, su patogenicidad la lleva a cabo por la invasión de la mucosa intestinal. Una vez que el individuo ingiere el microorganismo, éste debe fijarse al intestino delgado (íleon o yeyuno) y multiplicarse. La transmisión de este patógeno es principalmente por ruta fecal-oral directa o indirecta. La infección puede surgir después de ingerir muy pocos microorganismos (de 10 a 100). Como resultado de la contaminación fecal directa puede ocurrir la transmisión por el agua (Ramírez, 2001).

## 2.8 *Vibrio spp*

Los *vibrios* son bacterias Gram negativas, pertenecientes a la familia Vibrionaceae, son bacilos cortos, curvos, agrupados en parejas o en cadenas cortas, móviles con flajelo polar, anaerobios facultativos, producen enfermedades intra y extraintestinales (Llop *et al.*, 2001). La especie más importante de este género es *Vibrio cholerae* (Gil Quintero, 2005); otras especies de *vibrios* patógenos reportadas en la literatura y causantes de enfermedad son: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. carchariae*, *V. damsella*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. mediterranii*, *V. nigripulchritudo*, *V. ordalii*, *V. orientalis*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagicus*, *V. penaeicida*, *V. splendidus* y *V. vulnificus* (Cuéllar, 2013). Se encuentran en la naturaleza y pueden persistir en el medio por su capacidad de adherirse a la superficie de moluscos y crustáceos y su tolerancia a altas concentraciones de sal. Su transmisión es por la ingestión de agua y alimentos contaminados, principalmente en las épocas cálidas del año. Su patogénesis se basa principalmente en la presencia de motilidad, quimiotaxis, formación de biopelículas, adhesinas y la producción de la enterotoxina colérica, la cual es la responsable de la pérdida de líquidos intestinales, causando deshidratación y complicaciones que ocasionan mortalidad (Gil Quintero, 2005).

## 2.9 *Aeromonas spp*

El género *Aeromonas* pertenece a la familia Aeromonadaceae son bacilos cortos, Gram negativos, todas las especies excepto *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas media* son móviles gracias a un flagelo polar, son aerobios facultativos, oxidasa y catalasa positivos, reducen el nitrato a nitrito y fermentan la D-glucosa como fuente principal de carbono y energía. Los miembros de este género producen varias exoenzimas como: proteasas, DNasas, RNasas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, entre otras, muchas de ellas

consideradas factores de virulencia (Castro *et al.*, 2002). A pesar de ser considerados microorganismos autóctonos del medio acuático, también han sido aislados con frecuencia en alimentos destinados al consumo humano, peces sanos y enfermos, huevos de mosquitos y en diversos procesos infecciosos en humanos (Latif, 2015). La gastroenteritis se manifiesta con mayor frecuencia; sin embargo, se han descrito infecciones extraintestinales de gravedad como septicemia a causa de estas bacterias (Rivera *et al.*, 2018).

### **2.10 *Pseudomonas spp***

El género *Pseudomonas* está conformado por bacilos gramnegativos ampliamente distribuidos en la naturaleza, móviles por uno o varios flagelos polares. En algunas especies también se pueden formar flagelos laterales de longitud corta, aerobias, que tiene un tipo de metabolismo estrictamente respiratorio con oxígeno como aceptor terminal de electrones; en algunos casos, el nitrato se puede utilizar como aceptor de electrones alternativo, lo que permite que el crecimiento se produzca de forma anaeróbica. La mayoría de las especies no crecen en condiciones ácidas (pH 4.5 o menos) y no requieren factores de crecimiento orgánicos. Son oxidasa positivas o negativas y catalasa positiva (Palleroni, 2015).

Habitan en el agua, el suelo, las plantas, materia orgánica en descomposición y aguas negras. Las *Pseudomonas* son resistentes a la mayoría de los antibióticos por su gran capacidad de desarrollar resistencia adquirida. La diseminación de betalactamasas de espectro extendido es la principal causa de su resistencia a los antibióticos (Pliego *et al.*, 2005).

## 2.11 Depuración del gusano tubifex

El gusano *Tubifex* contiene bacterias debido al agua residual donde habita, exponiendo a los ajolotes a enfermedades y ocasionando altas mortalidades. *T. tubifex* sería un alimento ideal en este anfibio, si no contara con una microbiota que incluyera enterobacterias patógenas. Para tal caso, existen sustancias que controlan el crecimiento de patógenos como la plata iónica (Rodríguez *et al.*, 2016), los extractos obtenidos de diferentes géneros de algas han mostrado potente efecto sobre el crecimiento y sobrevivencia, también propiedades antimicrobianas contra patógenos de organismos acuáticos como el alga *Oedogonium capillare* (Negrete *et al.*, 2010). En condiciones de cultivo controlado se pueden obtener poblaciones limpias. Las estrategias de purificación del gusano, hasta el momento, estaban restringidas a baños con antibióticos o de agua potable, en el mejor de los casos. El desarrollo de nuevos antibióticos durante los últimos 20 años se ha incrementado como consecuencia de múltiples factores, como la necesidad de disponer de antibacterianos más eficaces y de amplio espectro. En este sentido, los antibióticos más frecuentemente utilizados en la acuicultura son la tetraciclina, el ácido oxolínico, la flumequina y las penicilinas. (Negrete *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso indiscriminado de los mismos ha facilitado la aparición de cepas de bacterias multirresistentes, con graves consecuencias ambientales y para la salud animal y humana (Parrado *et al.*, 2014). Múltiples alternativas biotecnológicas, preventivas y curativas, tales como el uso de probióticos, bacteriófagos e inmunoestimulantes y aceites esenciales se han desarrollado como estrategias para reducir el uso de antibióticos en los cultivos, ya sea para eliminar patógenos o para fortalecer el sistema inmune de los organismos cultivados (Díaz *et al.*, 2012).

## 2.12 Aceites esenciales como alternativa para la inhibición del efecto bacteriano

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles lipofílicas producidas como metabolitos secundarios, responsables del aroma de las plantas; que contienen sustancias responsables de su resistencia a una amplia variedad de patógenos; de ahí que pueden ser considerados como posibles agentes antibacterianos. Estas cualidades son atribuidas a sus principios activos como alcaloides, terpenoides, taninos, saponinas y flavonoides.

Pueden ser obtenidos a partir de flores, semillas, hojas, corteza, frutos y raíces, como, por ejemplo, de orégano (*Origanum vulgare*), laurel (*Laurus nobilis*); cítricos como la naranja (*Citrus sinensis*), limón (*Citrus limón*), toronja (*Citrus grandis* L.); otros como ajo (*Allium sativum*), cebolla (*Allium cepa* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), pimienta (*Piper nigrum*) por varios métodos de extracción como la fermentación, enfloración o por presión (Martínez *et al.*, 2015).

La capacidad antimicrobiana que tienen los diferentes aceites esenciales depende de la composición de sus principios activos. Usualmente la actividad antimicrobiana es derivada no solo de un único mecanismo de acción, sino de una cascada de reacciones involucradas en la fisiología de la célula bacteriana, promovida por las diferentes estructuras químicas que poseen los aceites esenciales en su composición y grupos funcionales. Estos componentes de bajo peso molecular, hidrofóbicos y lipolíticos, pueden destruir la pared celular y membrana citoplasmática de las bacterias, modificar la estructura de la pared celular afectando la permeabilidad, bloquear la síntesis de proteínas, ATP y DNA, inhibir la secreción de enzimas e interferir con la comunicación bacteriana vía *quorum sensing* (Molina y Mora, 2021). Este último, consiste en un proceso de comunicación intercelular que se produce cuando se alcanzan elevadas concentraciones en la población, con el objetivo de iniciar acciones cooperativas. Ello implica la producción

y liberación al medio de pequeñas moléculas señalizadoras, también denominadas autoinductores, por parte de las células bacterianas (Ribas, 2017).

A pesar de tener resultados prometedores, son necesarios más estudios para conocer mejor los mecanismos de acción, mejorar la estabilidad de los compuestos en el momento de la administración, sus efectos al ambiente y en la microbiota del animal tratado (Molina y Mora, 2021).

### **2.13 Aceite esencial de naranja**

Los aceites esenciales cítricos pueden extraerse de las cáscaras, flores y hojas, de plantas de la familia *Rutaceae* (naranja, limón, mandarina) su calidad y cantidad depende de muchos factores, como la naturaleza de la fruta, la procedencia, el genotipo, el tipo de suelo y el clima, también del proceso de extracción. Este grupo de aceites puede proporcionar antimicrobianos naturales, se ha mostrado efectividad antimicrobiana al encontrarse inhibidores tanto en forma directa de aceite y vapor contra una variedad de bacilos alcohol-ácido resistente (*Mycobacterium tuberculosis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Vibrio vulnificus*). En el trabajo de Vasudeva y Sharma utilizando aceite esencial aislado por hidrodestilación de la cáscara de frutos completamente maduros de *Citrus limettioides* mostraron actividad antibacteriana en diez cepas (Palazzolo *et al.*, 2013). El trabajo de Öntaş y colaboradores demostró que el aceite esencial de limón cítrico (*Citrus limón*) inhibió el crecimiento de *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Listonella anguillarum* y *Citrobacter freundii* (Mancuso, 2018).

El aceite esencial de naranja se encuentra principalmente en sacos de forma ovalada en el flavedo o en la porción anaranjada de la cascara y actúa como una barrera tóxica natural para muchos microorganismos e insectos (Cerón y Cardona, 2011). La naranja posee un efecto bactericida contra *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *S. aureus* y *Acrobacter butzlei* (Palazzolo *et*

al., 2013); y los aceites esenciales extraídos de las cáscaras de naranja dulce (*Citrus sinensis*) contra *Vibrio parahaemolyticus*, *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. Aureus* (Lin et al., 2010).

Los aceites esenciales de los frutos cítricos se encuentran formados por una mezcla compleja de terpenos, sesquiterpenos, alcoholes superiores, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres y alcanforos o ceras. Dentro de los terpenos podemos citar al limoneno, terpineno, felandreno, pineno y canfeno, de los que solamente algunos se encuentran en el aceite esencial presente en la cáscara de naranja: D-limoneno. Este compuesto es el principal constituyente de los aceites esenciales de los cítricos, su punto de ebullición oscila entre 175°C y 176 °C, su peso específico medido a 15°C es de 0,850 y cuando se encuentra en estado puro posee un agradable aroma a limón. El aceite esencial de naranja constituye aproximadamente el 90% del total de esta (Gutiérrez y Kaune, 2019).

### 3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta del aceite esencial de naranja *Citrus* sp, en la supervivencia del gusano de fango *Tubifex tubifex* y su actividad antibacteriana.

### 4 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la supervivencia del gusano de fango *Tubifex tubifex* con la aplicación del aceite esencial de naranja *Citrus* sp en concentraciones del 0%, 0.02%, 0.04% y 0.06%, a partir de información proveniente de una base de datos.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* en cuatro niveles 0%, 0.02%, 0.04% y 0.06%, del aceite esencial de naranja *Citrus* sp en bacterias heterótrofas totales, enterobacterias y vibrios del gusano de fango *Tubifex tubifex*, a partir de información preexistente de una base de datos.

- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* en cuatro niveles 0%, 0.02%, 0.04% y 0.06%, del aceite esencial de naranja (*Citrus* sp) en las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Salmonella* sp y *Shigella* sp provenientes del gusano de fango *Tubifex tubifex*, a partir de una base de datos.

## 5 METODOLOGÍA

Debido a la pandemia de SARS-CoV-2 el presente trabajo de servicio social se realizó a distancia desde casa, a partir de los ensayos del efecto antimicrobiano del aceite esencial de naranja en bacterias de *Tubifex* sp. que se realizó en el Laboratorio de Limnobiología y Acuicultura de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, la cual se proporcionó por los asesores del presente trabajo y que se fue trabajando de manera virtual.

Las actividades del presente servicio social a distancia comprendieron la integración y análisis de las bases de datos generadas de pruebas *in vivo* con el gusano e *in vitro* de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial, pruebas de sensibilidad en cepas bacterianas como *E. coli*, *Salmonella* sp y *Shigella* sp y pruebas *in vivo* de la actividad bacteriana en *Tubifex tubifex*.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Supervivencia del gusano de fango *Tubifex tubifex*

En el cuadro 1 se observan los resultados correspondientes a la supervivencia del gusano *Tubifex tubifex* con la incorporación de diferentes dosis de aceite esencial de naranja *Citrus* sp (AEN) (0%, 0.02%, 0.04% y 0.06%) en diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs) destacando que a las 24 hrs en la dosis más alta del aceite (0.06%) se presentó la mayor mortalidad del gusano, mientras que las dosis de 0.02% y 0.04% fue similar, siendo el grupo control el que tuvo mayor

supervivencia. Por otra parte, a las 48 hrs se observó que en la dosis de aceite de 0.02%, 0.06% y en el grupo control se presentó una alta mortalidad, por lo que en la dosis de 0.04% la supervivencia fue mayor. Para el caso de las 72 hrs la supervivencia en el grupo control fue mejor ya que en los tratamientos donde se adicionó el aceite se observó una mortalidad del 100% de los gusanos, lo que indica que el tiempo es un factor importante para la supervivencia del gusano ya que su tolerancia ante el AEN disminuye.

**Cuadro 1.** Número de gusanos de fango *Tubifex tubifex* tratados con diferentes dosis de aceite esencial de naranja *Citrus sp* (0, 0.02%,0.04%,0.06%) en diferentes tiempos de exposición.

Dosis AEN	Tiempo de exposición del gusano con aceite (hrs)					
	24	48	72			
	<b>Número Inicial</b>					
0%	29 ± 1	31 ± 1.5	28 ± 1.5			
0.02%	29 ± 2.6	29 ± 1	30 ± 2.5			
0.04%	30 ± 1.5	29 ± 1.5	29 ± 1			
0.06%	30 ± 2.6	31 ± 1.5	31 ± 1.5			
	<b>Número Final</b>					
		%	%	%		
0%	27± 2.08	93.1	27 ± 1.5	87.09	25 ± 0.5	89.28
0.02%	26 ± 1.1	89.65	26 ± 1.7	89.65	-	100
0.04%	27 ± 1.5	90	27 ± 2	93.1	-	100
0.06%	25 ± 1.5	83.33	25 ± 1	80.64	-	100

ANE=Aceite Esencial de Naranja

## 6.2 Biometría del gusano de fango *Tubifex tubifex*

En este experimento se emplearon gusanos con un peso promedio de 0.003 g ± 0.001 y una longitud total de 14.80 mm ± 3.05, una vez transcurrido los diferentes tiempos de exposición con la respectivas dosis del AEN, se observó que el peso del *Tubifex tubifex* en los tratamientos de 0.02% y 0.06% a las 24 hrs fue mayor comparado con los demás tratamientos, en lo que respecta a la talla en la

dosis de 0.06% de AEN fue mayor; mientras que, la menor longitud total fue en el grupo control. Para el caso de los gusanos expuestos en 48 hrs en la dosis 0.06% reportaron un incremento en su peso, el grupo control, en la dosis 0.02 % y 0.04% el peso fue menor, en cuanto a la talla, destaca que fue mayor en la dosis de 0.02%. A las 72 hrs el peso y talla de los gusanos solo se registró del grupo control, ya que en las demás dosis los gusanos no sobrevivieron por lo que no se registraron dichas biometrías (Cuadro 2.).

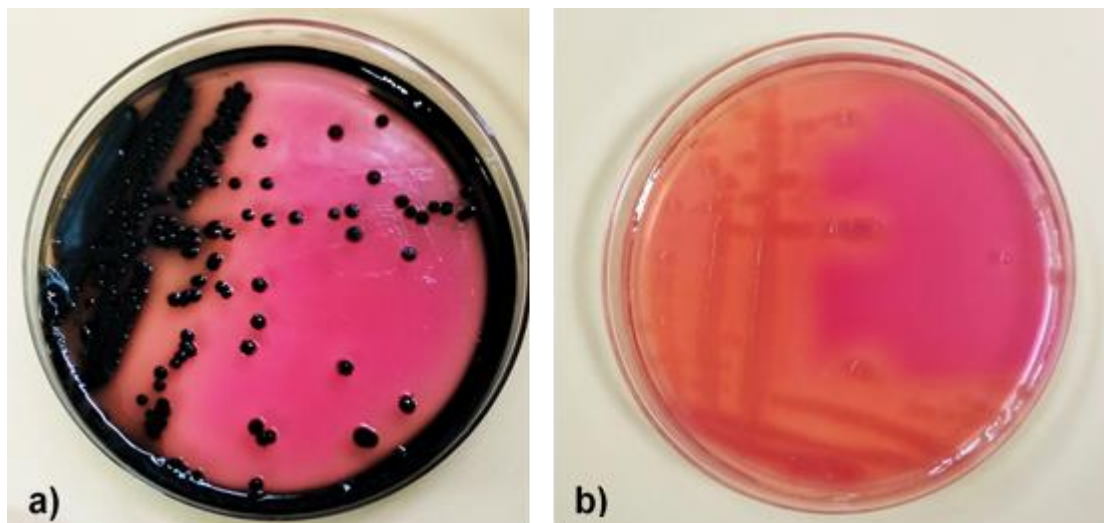
**Cuadro 2.** Peso y Longitud total del gusano *Tubifex tubifex* tratados con diferentes dosis de aceite esencial de naranja *Citrus* sp en tres periodos de exposición.

Dosis	Tiempo de exposición del gusano con aceite (hrs)					
	24		48		72	
AEN	P (g)	LT (mm)	P (g)	LT (mm)	P(g)	LT (mm)
0%	0.004±0.001	17.23±4.06	0.005±0.02	19.39±5.61	0.004±0.01	18.31±3.86
0.02%	0.006±0.049	20.25±6.96	0.005±0.002	20.26±5.25	-	-
0.04%	0.005±0.003	20.85±3.60	0.005±0.002	17.44±3.84	-	-
0.06%	0.006±0.003	22.72±7.15	0.007±0.02	19.34±3.45	-	-

AEN=Aceite Esencial de Naranja, P=Peso; LT=Longitud total

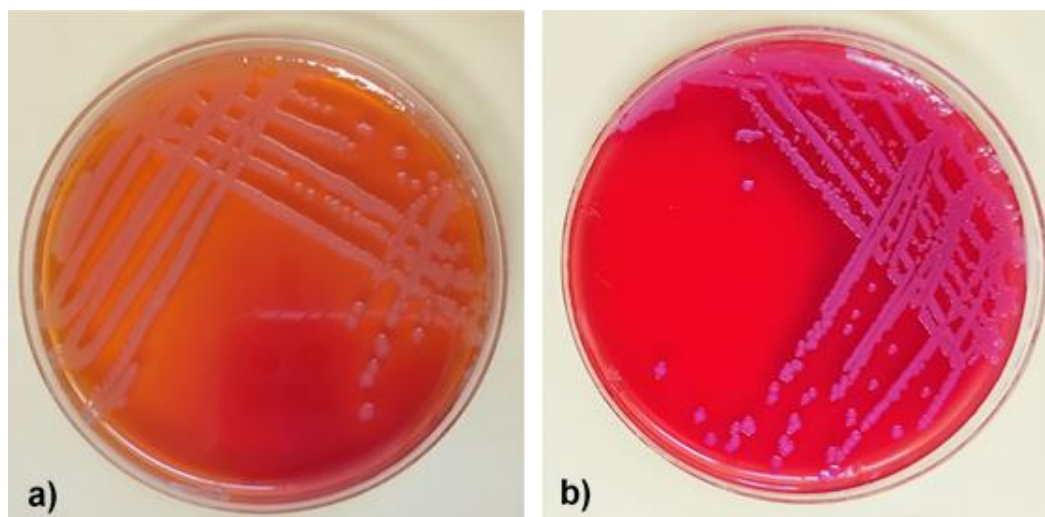
### 6.3 Identificación y aislamiento de cepas presentes en el *Tubifex tubifex*

De acuerdo con los aislados realizados del gusano de fango *Tubifex tubifex* se identificaron presuntivamente tres cepas, que pertenecen a la Familia *Enterobacteriaceae*, una perteneció a *Escherichia coli* cuyas colonias presentaron coloración rosa en el medio de cultivo MacConkey; mientras que, en agar EMB la coloración de las colonias fue verde metálico. En cuanto a las cepas *Salmonella* sp, *Shigella* sp, estas crecieron en el medio específico Salmonella-Shigella, donde la coloración de las colonias fue negra e incolora respectivamente (Figura 1).

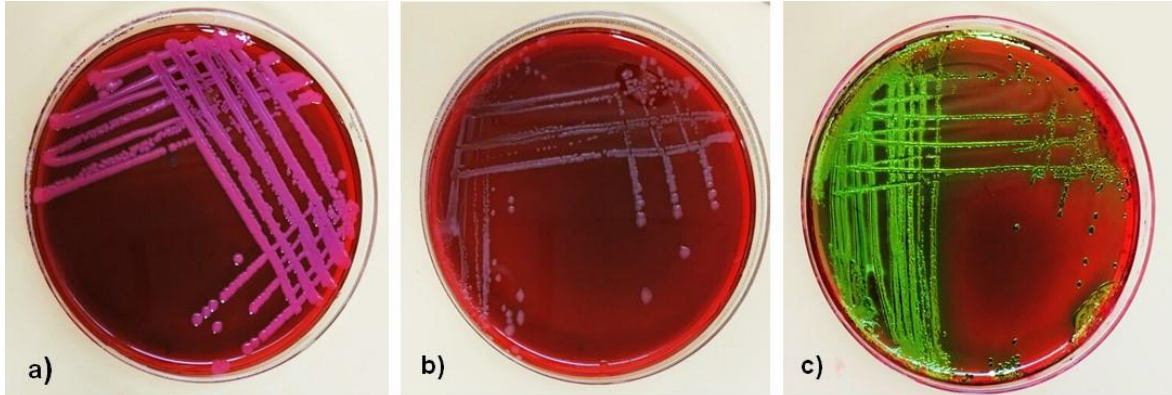


**Figura 1.** Crecimiento de a) *Salmonella sp.* y b) *Shigella sp.*, aisladas del *Tubifex tubifex* en medio de cultivo Salmonella-Shigella 24 hrs a 37°C.

Estas mismas cepas se aislaron en medio MacConkey en donde se observaron colonias transparentes; mientras que, en medio EMB fueron rosas e incoloras (Figura 2 y 3).

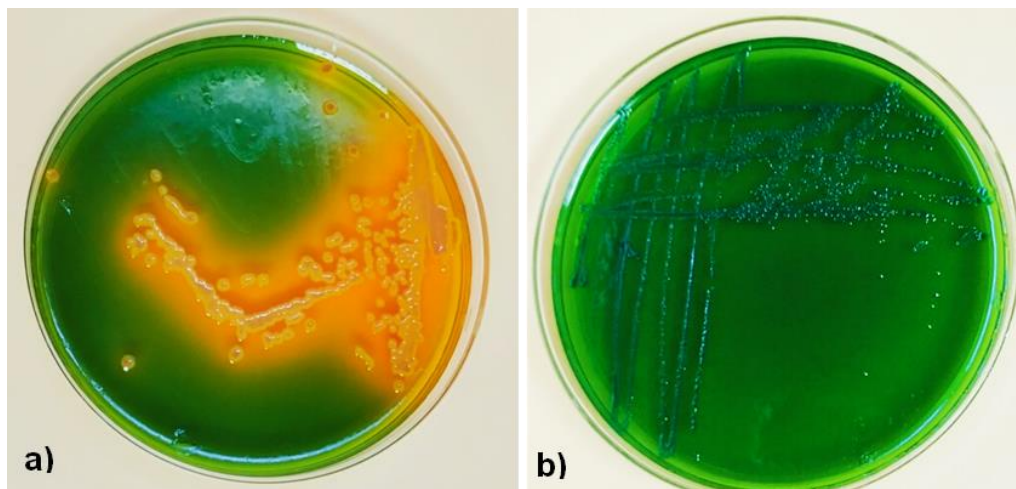


**Figura 2.** Crecimiento de a) *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, b) *Escherichia coli*, aisladas del *Tubifex tubifex* en medio de cultivo MacConkey 24 hrs a 37°C.



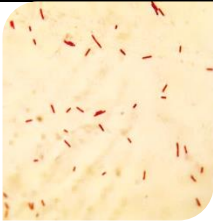
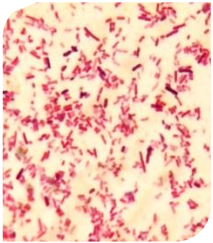
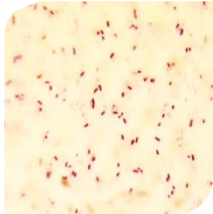

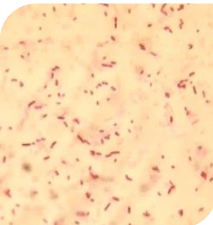
**Figura 3.** Crecimiento de a) *Shigella sp*, b) *Salmonella sp*, c) *Escherichia coli* aisladas del *Tubifex tubifex* en medio de cultivo EMB 24 hrs a 37°C.

Adicionalmente, se aislaron dos cepas en agar TCBS que pertenecen a la Familia *Vibrionaceae*, identificada presuntivamente como *Vibrio cholerae* por la coloración de las colonias amarillas y *Vibrio parahaemolyticus* con colonias verde-azulado (Figura 4). Por otro lado, de cada cepa aislada se obtuvieron las características microscópicas mediante la tinción de Gram (Cuadro 3), esta técnica fue de utilidad para la identificación de los aislados ya que, por el tipo de coloración y forma se puede determinar el tipo de cepa a la que corresponde.



**Figura 4.** Crecimiento de a) *Vibrio cholerae* y b) *Vibrio parahaemolyticus* aisladas del *Tubifex tubifex* en medio de cultivo TCBS 24 hrs a 37°C.

**Cuadro 3.** Características y carga bacteriana presente en cepas aisladas del gusano de fango *Tubifex tubifex*.

Cepa	Tinción de Gram	Características coloniales	Características celulares	UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>		Color: verde metálico Forma: circular Tamaño: grande Elevación: convexa Borde: continuo Superficie: lisa	Gram (-) Bacilos móviles con flagelos no esporulados Color rosado	$1.39 \times 10^5$
<i>Salmonella sp</i>		Color: negra Forma: circular Tamaño: grande Elevación: convexa Borde: continuo Superficie: lisa	Gram (-) Bacilos móviles con flagelo no esporulado Color rosado	$1.48 \times 10^5$
<i>Shigella sp</i>		Color: incolora Forma: circular Tamaño: grande Elevación: convexa Borde: continuo Superficie: lisa	Gram (-) Bacilo inmóvil no esporulado Color rosado	$1.59 \times 10^5$
<i>Vibrio cholerae</i>		Color: amarillo Forma: circular Tamaño: grande Elevación: convexa Borde: continuo Superficie: lisa	Gram (-) Bacilo curvado móvil Color rosado	$1.24 \times 10^5$
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		Color: verde-azulado Forma: circular Tamaño: pequeña Elevación: convexa Borde: continuo Superficie: lisa	Gram (-) Bacilo móvil Color rosado	$1.22 \times 10^5$

Por lo anterior, se puede inferir que las cinco cepas aisladas del *Tubifex tubifex* se encuentran clasificadas en el grupo de las Gram (-), ya que con su tinción fue de un color rosado-rojo que es característico para este grupo. Además de los anterior se tomaron en cuenta las características macroscópicas, como forma, color y elevación colonial de cada cepa para su identificación. Asimismo, en cada cepa se determinó la concentración celular mediante la cuenta viable (UFC/ml) cuyos resultados en conjunto se observan en el Cuadro 3.

#### 6.4 Carga bacteriana en *Tubifex tubifex*

La carga bacteriana presente en el gusano de fango *Tubifex tubifex* fue de  $5.3 \times 10^4$  UFC/ml para enterobacterias,  $1.39 \times 10^5$  UFC/ml para el caso de bacterias heterótrofas totales y en vibrios de  $5.9 \times 10^4$  UFC/ml. Además, se realizó la cuenta viable de la carga bacteriana presente en el *Tubifex tubifex* con la aplicación de diferentes dosis de AEN a las 24 hrs, observándose que hubo una disminución de la UFC/ml con las diferentes dosis de AEN, ya que el grupo control fue el que registró mayor carga bacteriana para los grupos de vibrios y heterótrofas totales presentes en el gusano *Tubifex tubifex* (Cuadro 4).

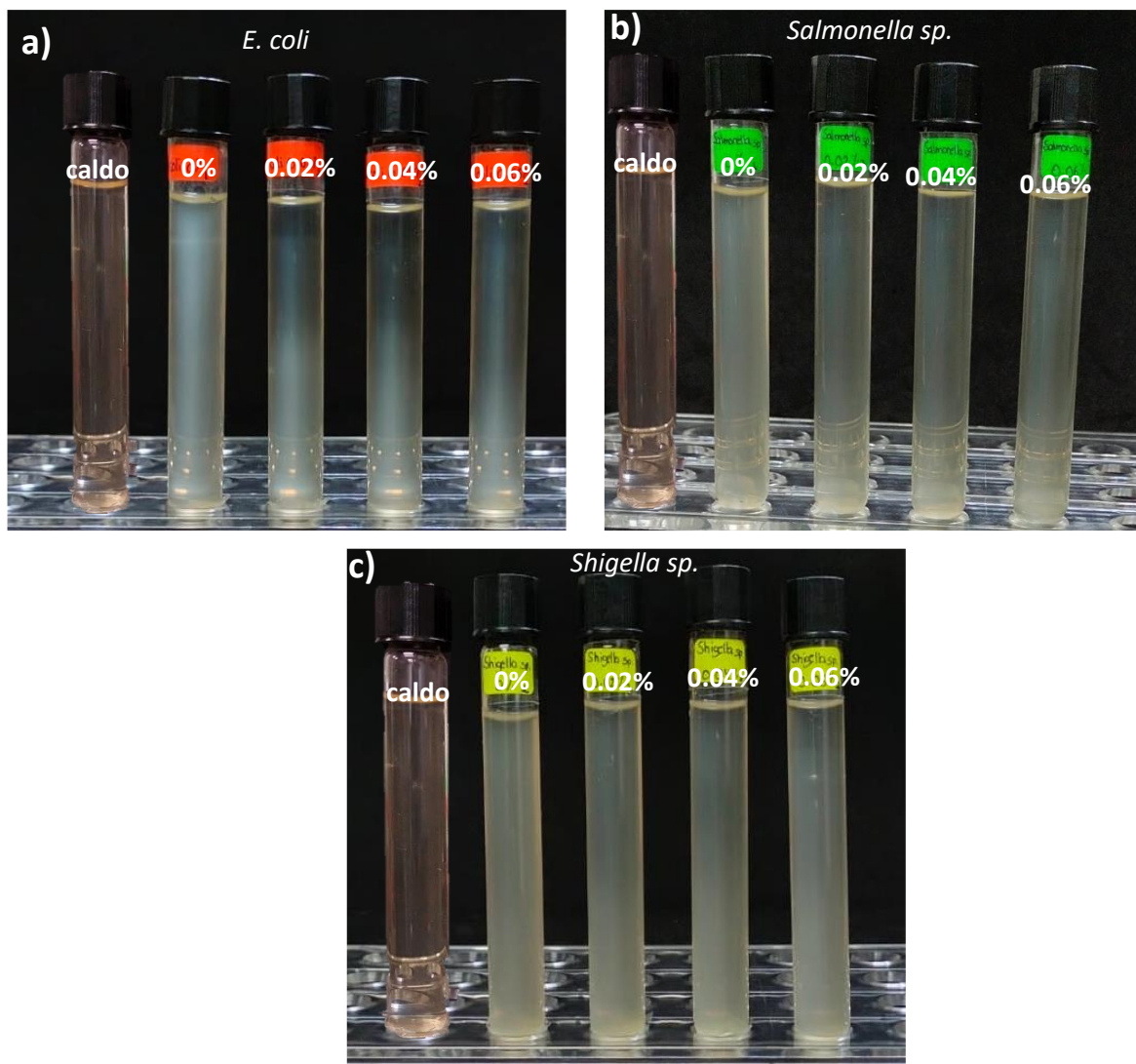
**Cuadro 4.** Carga bacteriana presente en el gusano de fango *Tubifex tubifex* expuesto a diferentes dosis de AEN en un periodo de 24 hrs.

Grupo bacteriano (UFC/ml)	Tratamiento de AEN			
	0%	0.02%	0.04%	0.06%
Enterobacterias	$8.2 \times 10^4$	$4.8 \times 10^4$	$0.8 \times 10^4$	$0.3 \times 10^4$
Vibrios	$1.02 \times 10^5$	$9.7 \times 10^4$	$9.1 \times 10^4$	$8.2 \times 10^4$
Heterótrofas totales	$1.12 \times 10^5$	$7 \times 10^4$	$5.5 \times 10^4$	$9 \times 10^4$

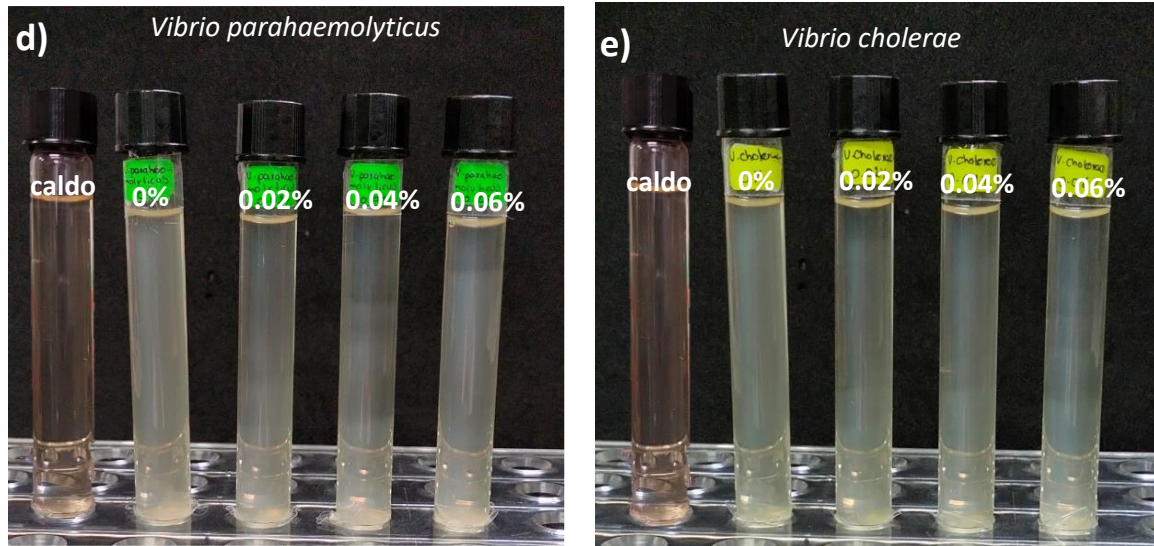
Caso contrario en la dosis de 0.06% AEN fue donde se registró la menor carga para enterobacterias y vibrios. Por último, la carga bacteriana de heterótrofas totales fue menor a partir de la dosis de 0.04% comparado con los demás tratamientos. La concentración de enterobacterias se mantuvo similar en los tratamientos.

## **6.5 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AEN**

La Concentración Mínima Inhibitoria se refiere a la menor cantidad de AEN que se requiere para inhibir el crecimiento de una cepa bacteriana en específico. Para este experimento se probaron cuatro dosis diferentes de AEN (0, 0.02, 0.04, 0.06%) para determinar la CMI en cinco cepas aisladas del *Tubifex tubifex*. De acuerdo con lo anterior, para la cepa de *E. coli*, *Salmonella* sp y *Vibrio cholerae* en un tiempo de exposición de 24 hrs, se observó inhibición del crecimiento bacteriano a partir de la dosis de 0.02% y conforme aumentaba la dosis de AEN el crecimiento siguió disminuyendo hasta la dosis de 0.06%, caso contrario al tratamiento control en donde el crecimiento de la cepa fue notorio, para *Shigella* sp , *Vibrio parahaemolyticus* se observó una ligera disminución del crecimiento de las cepas con las dosis de AEN, esto debido a que se siguió observando una baja turbidez en los tubos (Figura 5 y 6).

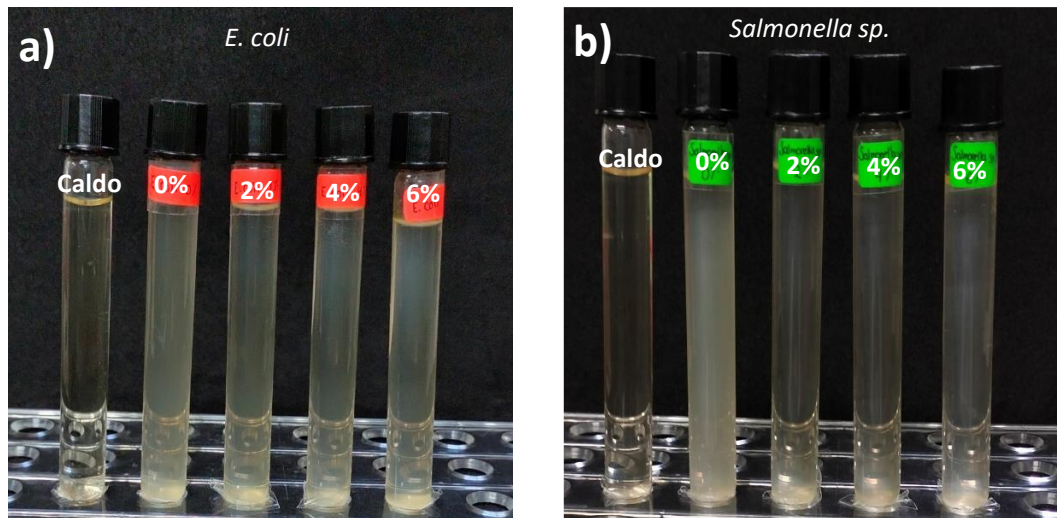


**Figura 5.** Concentración mínima inhibitoria con diferentes dosis de AEN (0, 0.02%, 0.04% y 0.06%) para enterobacterias, **a)** *E. coli*, **b)** *Salmonella sp.*, **c)** *Shigella sp.*, cepas aisladas del *Tubifex tubifex* 24 hrs a 37°C.

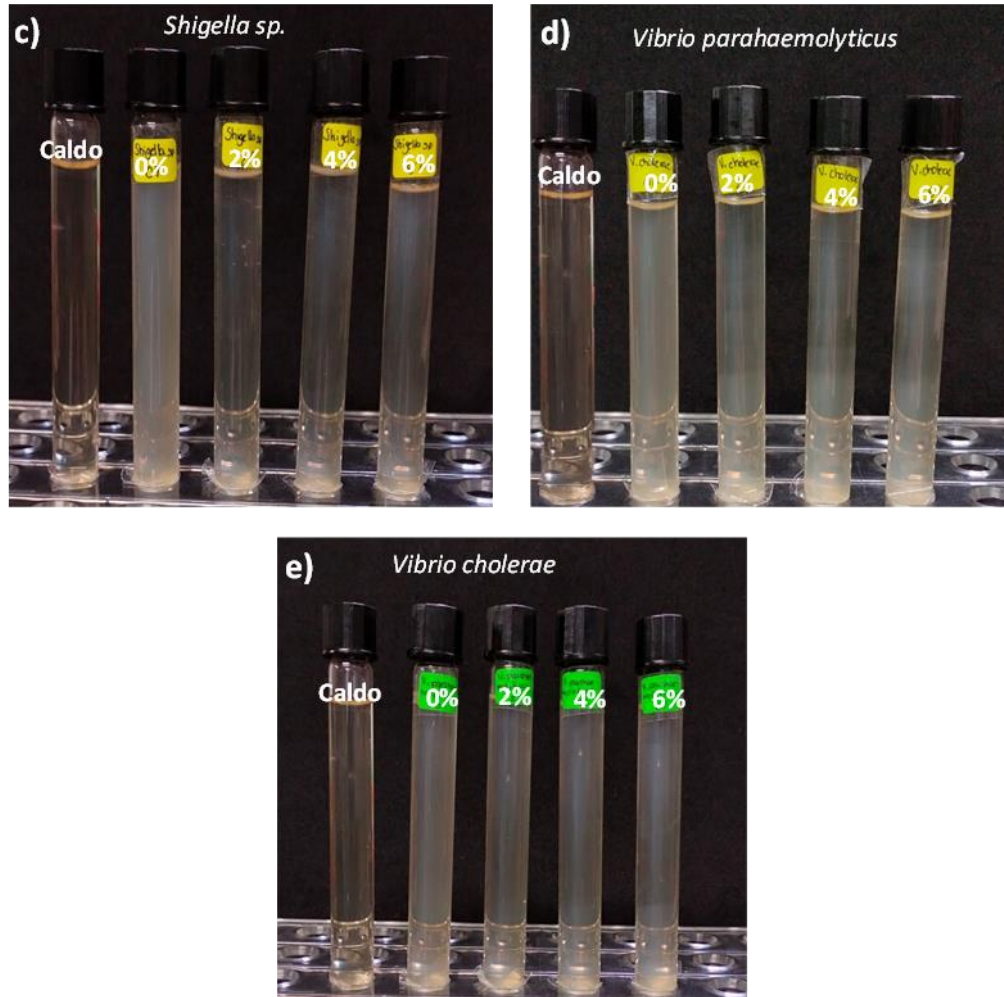


**Figura 6.** Concentración mínima inhibitoria con diferentes dosis de AEN (0, 0.02%,0.04% y 0.06%) para vibrios **d)** *Vibrio parahaemolyticus* y **c)** *Vibrio cholerae* cepas aisladas del *Tubifex tubifex* 24 hrs a 37°C.

Así mismo se probaron dosis más altas del AEN (0,2,4,6%) para la CMI contra las mismas cepas aisladas, por lo que para *E. coli* a las 24 hrs la inhibición fue ligera en las dosis de 2, 4 y 6% comprado con el control, para *Salmonella* sp., fue la cepa donde observo mayor inhibición a partir de la dosis de 2% hasta la más alta, lo mismo para *Shigella* sp. y *Vibrio parahaemolyticus*; mientras que, para la cepa de *Vibrio cholerae* no se observó inhibición (Figura 7 y 8).



**Figura 7.** Concentración mínima inhibitoria con diferentes dosis de AEN (0, 2%,4% y 6%) para las enterobacterias **a)** *E. coli*, **b)** *Salmonella sp.*, cepas aisladas del *Tubifex tubifex* 24 hrs a 37°C.

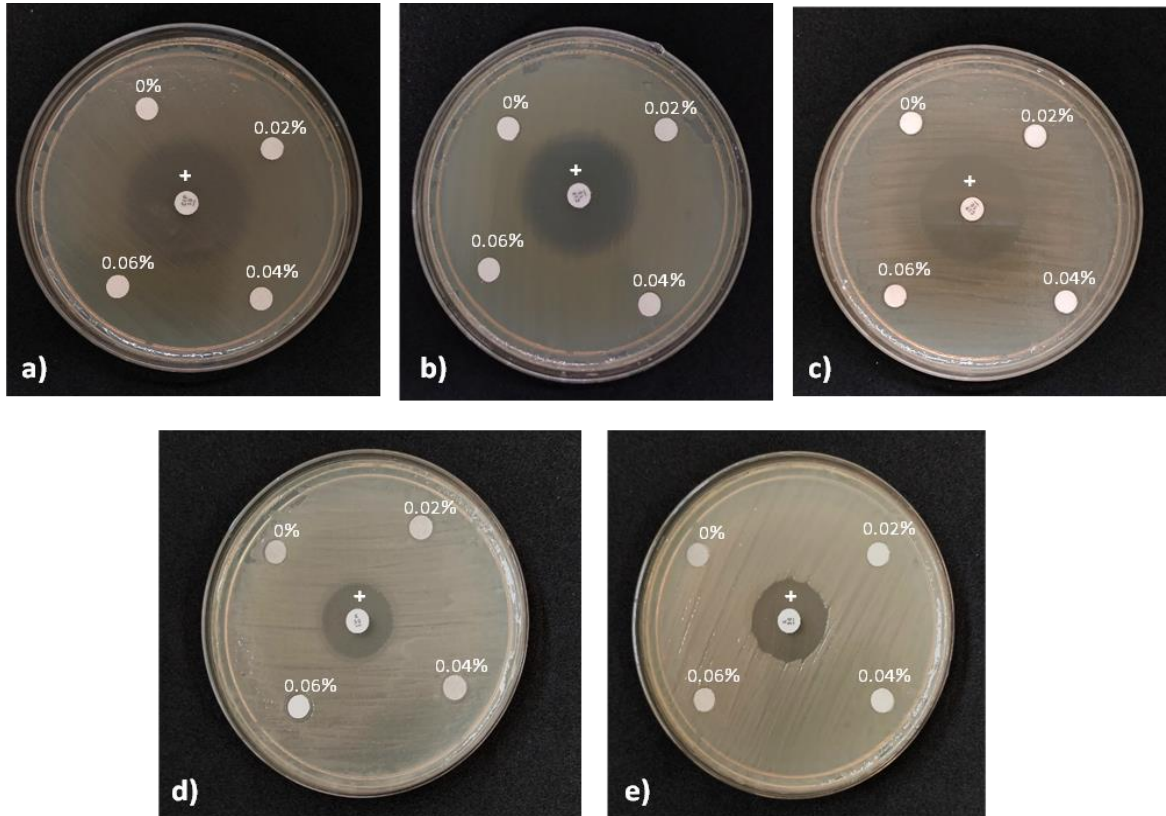


**Figura 8.** Concentración mínima inhibitoria con diferentes dosis de AEN (0, 2%,4% y 6%) para **c) *Shigella sp.***, **d) *Vibrio parahaemolyticus*** y **e) *Vibrio Cholerae*** cepas aisladas del *Tubifex tubifex* 24 hrs a 37°C.

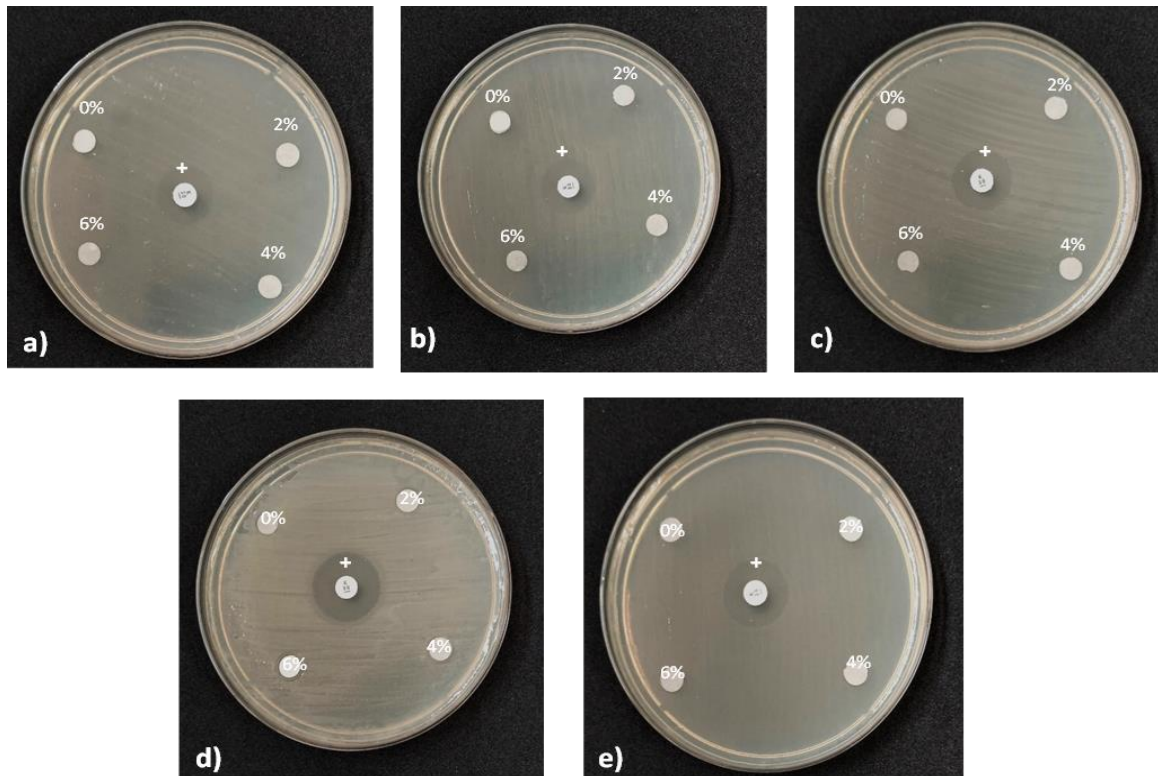
## 6.6 Pruebas de sensibilidad en placa del AEN

Se realizó la prueba de sensibilidad de las diferentes dosis del AEN, la cual se basa en la colocación de discos impregnados con la dosis de AEN en agar Müller-Hinton en donde previamente se inocula una cepa bacteriana, y con lo cual se determina qué tan susceptible son al AEN. Con respecto a la prueba de

sensibilidad se observó que las diferentes dosis del AEN (0, 0.2, 0.04 y 0.06%) (0, 2, 4,6%) no tuvieron un efecto inhibitorio para *E. coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio Cholerae* ya que no se observaron halos de inhibición más que en el control positivo con antibiótico (Figura 9 y 10).



**Figura 9.** Prueba de sensibilidad en placa con Agar Mueller hinton contra a) *E. coli*, b) *Salmonella* sp., c) *Shigella* sp., d) *Vibrio parahaemolyticus* y e) *Vibrio cholerae* cepas aisladas del *Tubifex tubifex* con diferentes dosis de AEN (0, 0.02%,0.04% y 0.06%) más un control (+) (Antibiótico Ciproflaxacina) 24 hrs a 37°C.



**Figura 10.** Prueba de sensibilidad en placa con Agar Mueller-Hinton contra **a) *E. coli***, **b) *Salmonella* sp.**, **c) *Shigella* sp.**, **d) *Vibrio parahaemolyticus*** y **e) *Vibrio cholerae*** cepas aisladas del *Tubifex tubifex* con diferentes dosis de AEN (0, 2%, 4% y 6%) más un control (+) (Antibiótico Ciproflaxacina), 24 hrs a 37°C.

## 7 DISCUSIÓN

Uno de los aspectos más importantes dentro de la acuicultura poco conocidos es el cultivo de especies no convencionales, el cual se refiere al cultivo y mantenimiento de especies silvestres que como tal no tienen un aprovechamiento comercial y que incluso pueden estar clasificadas en alguna categoría riesgo, asimismo de aquellas especies de las que se requiere realizar su conservación *ex situ*. Por mencionar algunas especies de interés se encuentra el cultivo de charales del género *Chirostoma spp*, de godeídos como el mexcalpique *Girardinichthys viviparus*, crustáceos como el acocil *Cambarellus montezumae* y diferentes especies del género *Ambystoma spp* (Vázquez *et al.*, 2016). Dentro de este ámbito de cultivo para la conservación una parte fundamental de los organismos acuáticos es la alimentación siendo los cultivos de apoyo o alimento vivo de los más utilizados en la crianza. Uno de los alimentos que frecuentemente se requieren es el gusano de fango *Tubifex tubifex* (Zhang *et al.*, 2017), debido a las características que presenta ya que estimula el instinto depredador de los organismos; sin embargo, una de las desventajas es la carga bacteriana de especies patógenas potenciales (Negrete *et al.*, 2008), por lo que se han buscado diferentes estrategias para su depuración. En este trabajo se observó que la adición de diferentes dosis de AEN en distintos tiempos (24, 48 y 72hrs) suele disminuir la capacidad de tolerancia del *Tubifex tubifex*, ya que a las 24hrs la mortalidad fue alta con la dosis de 0.06%, mientras que a las 48hrs en todas las dosis se registró mortalidad, a las 72hrs la mortalidad del gusano fue del 100%, excepto en el grupo control. Por lo que las dosis y el tiempo son factores que se deben considerar en la supervivencia del gusano cuando se utilizan aceites esenciales, ya al ser este un invertebrado muestra sensibilidad, como lo demuestra Torres-Fajardo *et al.* (2021) quienes encontraron que el AEN tiene propiedades antihelmínticas por efecto de la concentración de terpenos en este. Ante esta situación, la sensibilidad y mortalidad que se observó en el *Tubifex tubifex* puede atribuirse a que algunos de los componentes del AEN

como fenoles, aldehídos o alcoholes pudieron generar citotoxicidad en el gusano, al ser expuesto por más tiempo (Ponce *et al.*, 2020). De igual forma la letalidad de altas concentraciones de aceites puede presentarse en otro tipo de invertebrados como la mosca *Drosophila melanogaster* (Anaya, 2021). Algunos autores como Velandia *et al.* (2016) y Neira *et al.* (2018), refieren que los aceites esenciales pueden generar citotoxicidad causada por la liberación de especies reactivas de oxígeno que actúan a nivel genético. Cacciatore y Verrengia (2013), mencionan que en los oliguetos como el *Tubifex tubifex*, dadas sus características morfológicas, fisiológicas son muy sensibles a las variaciones ambientales y a los compuestos tóxicos, ya que principalmente se ve afectada la enzima colinesterasa, específicamente, la butilcolinesterasa la cual es la encargada de hidrolizar a algunos grupos funcionales exógenos inhibiendo los procesos metabólicos de los oligoquetos, lo que ocasiona su mortalidad. Más no así en los vertebrados como el caso de los peces donde incluso el AEN es utilizado como sedante en el transporte de la dorada (Flores, 2022).

Autores como Negrete *et al.* (2008), Luna-Figueroa *et al.* (2007) y Reyes *et al.* (2016), mencionan que este anélido contiene una importante carga bacteriana de agentes patógenos como son los géneros de *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Escherichia* sp., *Microbacterium*, *Aeromonas* sp, *Citrobacter* sp y vibrios, la proliferación de estos agentes patógenos es atribuida principalmente al manejo en las granjas de producción, la distribución y los sitios de venta. Estos grupos bacterianos presentes en el gusano *Tubifex tubifex* pueden propiciar enfermedades en los organismos al ser alimentados. En este trabajo la carga bacteriana de enterobacterias, vibrios y heterótrofas totales se redujo ligeramente con la aplicación de las diferentes dosis de AEN, además durante el aislamiento del *Tubifex tubifex* se identificaron cinco cepas de bacterias que presuntivamente corresponden a los géneros *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp y dos cepas de vibrios, todo esto de acuerdo a las características celulares y coloniales que se

observaron. Es importante hipotetizar que la aplicación a dosis mayores de AEN que las empleadas en este trabajo podrían inhibir fuertemente a las bacterias aquí estudiadas; sin embargo, para la depuración del gusano no sería eficaz ya que disminuiría drásticamente la supervivencia como sucedió en las dosis altas. La aplicación de aceites esenciales como agentes depurantes es de gran interés en la acuicultura, ya que al administrarse al alimento vivo como el gusano *Tubifex tubifex* se obtendría una fuente de alimento más inocua y segura para las diferentes especies de ajolotes. Esta alternativa del uso de los aceites esenciales para la depuración bacteriana pretende reducir la aplicación indiscriminada de antibióticos que han impactado negativamente al ambiente y además han propiciado una resistencia bacteriana, lo que genera pérdidas en los cultivos de hasta el 90% de la producción (Reyes *et al.*, 2016).

Argote-Vega *et al.* (2017) refieren que los aceites esenciales a base de cítricos son una alternativa natural y beneficiosa para el ambiente, ya que suelen disminuir la carga bacteriana, debido a que contienen compuestos como el limoneo, fenoles y terpenos, los cuales son componentes principales de los aceites con capacidad antimicrobiana. Principalmente, los aceites esenciales a base de cítricos como la naranja (*Citrus sp.*) han mostrado propiedades antimicrobianas. Callaway *et al.* (2011), menciona que los aceites esenciales derivados de cítricos como limón, naranja, mandarina suelen tener efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, y *Campylobacter*. Con respecto a los resultados obtenidos en este ensayo se observó que las dosis de AEN (0,0.02,0.04 y 0.06%) utilizadas para CMI sólo disminuyeron ligeramente el crecimiento para las cepas de *E. coli*, *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae*: mientras que, para *Shigella sp* y *Vibrio parahaemolyticus* la inhibición fue mínima, caso contrario a las dosis altas (0, 2, 4 y 6%) donde *Salmonella sp*, *Shigella sp* y *Vibrio parahaemolyticus* su inhibición fue notoria en todas las dosis, comparado con *E. coli* y *Vibrio cholerae* en donde la inhibición fue

baja. Con respecto a la prueba de sensibilidad no se observó inhibición del crecimiento bacteriano con las concentraciones utilizadas de AEN. Las diferencias en cuanto a la inhibición de cada una de las cepas con las dosis de AEN se le atribuyen a que no todas las bacterias tienen la misma sensibilidad ante los aceites y a sus componentes antimicrobianos como lo menciona Zekaria y Calier, (2014), donde los aceites esenciales suelen tener mayor capacidad inhibitoria en bacterias Gram positivas que en las bacterias Gram negativas, esto debido a la composición de la pared celular y a la membrana externa, ya que los extremos lipofílicos de los ácidos lipoteicoicos en la membrana celular tienen afinidad por los compuestos hidrofóbicos de los aceites esenciales, por lo que actúan atravesando la pared lipídica modificando la estructura de los lípidos volviendo la membrana más permeable, lo que facilita la salida y entrada de compuestos que ocasionan la muerte celular. Caso contrario a las bacterias Gram negativas, quienes presentan mayor resistencia a los aceites esenciales, por los lipopolisacáridos de la pared celular que limitan la propagación de los compuestos hidrófobos de los aceites. La respuesta la actividad antimicrobiana de los aceites contra bacterias también va a depender de la composición del aceite, así como el origen, la especie, las condiciones climáticas y de crecimiento, la parte de la planta que se utilizó y el método de extracción (Guo *et al.*, 2018; Vignola, *et al.*, 2020; Sin *et al.*, 2021). Por otra parte, Vignola, *et al.*, (2020) realizaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales ante bacterias patógenas, entre ellos el AEN, reportando que éste último tuvo la menor actividad antimicrobiana para el caso de *E. coli* muy similar a los resultados obtenidos en este trabajo, por lo que se podría inferir que el AEN es selectivo contra ciertas bacterias. Por otra parte, Pittman *et al.* (2011) refiere que los aceites esenciales que se extraen específicamente de la cáscara de naranja suelen reducir el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, por lo que es importante considerar el origen del aceite esencial a implementar.

## 8 CONCLUSIÓN

El uso del aceite esencial de naranja mostró una ligera inhibición para algunos grupos bacterianos, conforme se aumentó la dosis y tiempo de exposición la inhibición bacteriana fue más notoria, pero en el gusano de fango la supervivencia disminuyó. Por lo que se debe considerar la dosis a emplear y el tiempo de exposición del gusano al aceite para obtener una inhibición bacteriana conservada sin alterar negativamente la supervivencia del *Tubifex tubifex*. En función a lo anterior, sería conveniente realizar pruebas con otros aceites esenciales para conocer su efecto, de tal forma que se identifique la dosis óptima de inhibición conservando la supervivencia del gusano, a fin de proporcionar un alimento vivo inocuo para las diferentes especies de *Ambystoma* spp.

## 9 REFERENCIAS

Alexander, J. D. (2010). Influence of environmental features on *Tubifex tubifex* and *Myxobolus cerebralis* infected *Tubifex tubifex* in Yellowstone National Park: implications for whirling disease risk. Montana State University.

Anaya Gil, Jorge Luis 2021 Evaluación de la actividad toxicológica de la resina del algarrobo (*Hymenaea courbaril* L.) y del aceite de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre *Drosophila melanogaster*. tesis Doctoral, Universidad de Cartagena, Colombia. 136 p.

Argote, F. E., Montenegro, Z. J. S., Delgado, M. E. T., Alvarez, J. A. P., Hurtado, A., & Ospina, J. D. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA, 15(2), 52-60.

Balbuena, E., y Rios, V. M. (2011). Manual básico de sanidad piscícola. FAO/Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Uruguay.

Blanco, M. D. M., Liébana, P., Gibello, A., Alcalá, C., Fernández-Garayzábal, J. F. y Domínguez, L. (2004). Principales patologías bacterianas en la piscicultura española. Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense, 28040.

Cacciatore L. C. y Verrengia G. N. R. (2013). Toxicocinética del metilanzinfos e inhibición in vitro de la actividad colinestereásica por metilanzinfos-oxón en los invertebrados *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus* Revista Química Viva. 32(12). 261-273.

Callaway, T. R., Carroll, J. A., Arthington, J. D., Edrington, T. S., Anderson, R. C. y Ricke, S. C. (2011). "Citrus Products and Their Use Against Bacteria: Potential Health and Cost Benefits", in Nutrients, Dietary Supplements, and Nutraceuticals, ed. by R.R Watson (United States), pp. 277–86

Castro, B. T., De Lara, A. R., Castro, M. G., Castro, M. J. y Malpica, S. A. (2003). Alimento vivo en la acuicultura. Contactos, 48, 27-33.

Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M. G., Cerezo, S. G., Hernandez-Rodriguez, C. H., Chacón, M. R., Falgás, L. S., y Salvat, M. J. F. (2002). El género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México?. Enfermedades infecciosas y microbiología, 22(4), 206-216.

Cerón-Salazar, I., y Cardona-Alzate, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. Ingeniería y ciencia, 7(13), 65-86.

Cuéllar-Anjel, J. (2013). Vibriosis. Institute for international cooperation in animal biologics. Sitio web: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>

Díaz, L. M. V., Villamil, S. M. I., y Pérez, O. P. L. (2012). Uso de microorganismos benéficos en el alimento vivo para controlar la aparición de enfermedades durante el cultivo de animales acuáticos. Revista Mutis, 2(2), 89-106.

Espinosa de los Monteros, J., & Labarta, U. (1988). Patología en acuicultura. Industrias Gráficas España.

Flores Llano, M. J. (2022). Evaluación de aceites esenciales y sus compuestos activos para la sedación durante el transporte de la dorada (*Sparus aurata*) Tesis de Licenciatura, Biología, Universidad de Cadiz. 27 p.

Gil Quintero, N. M. (2005). Importancia de *Vibrio cholerae* y otros vibrios como causante de ETA'S. Tesis de Licenciatura, Uniandes.

Gutiérrez Escobar, J. A., y Kaune Sarabia, C. (2019). Obtención de Aceites Esenciales a partir de la Cáscara de Naranja por el Método Prensado de Frío [Doctoral dissertation, Universidad Mayor de San Andrés]. Sitio web: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/21603/TES-1129.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Guerra, L., Soto, L., Medina, Z., Ojeda de R y Peña R. (2014). Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos y gram negativos. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2014, 31: 215-232

Guo, J. J., Gao, Z. P., Xia, J. L., Ritenour, M. A., Li, G. Y., & Shan, Y. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. Lwt, 97, 825-839.

Herawati, V. E., Nugroho, R. A., Hutabarat, J., y Karnaradjasa, O. (2016). Profile of amino acids, fatty acids, proximate composition and growth performance of *Tubifex tubifex* culture with different animal wastes and probiotic bacteria. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation, 9(3), 614-622

Kaeser, A. J., y Sharpe, W. E. (2006). Patterns of distribution and abundance of *Tubifex tubifex* and other aquatic oligochaetes in *Myxobolus cerebralis* enzootic areas in Pennsylvania. Journal of Aquatic Animal Health, 18(1), 64- 78.

Latif Eugén, F. L. (2015). *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal. [Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques]. Tesis Doctoral en Xarxa.

León Ramírez, S. (2001). Shigelosis (disentería bacilar). Salud en Tabasco, 7(3), p20.

Lin, C. M., Sheu, S. R., Hsu, S. C., y Tsai, Y. H. (2010). Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. *Food control*, 21(12), 1710-1715.

Llop, A., Valdés-Dapena, V., y Suazo, S. (2001). *Microbiología y parasitología médica*. Tomo I.

Luna-Figueroa J. y Figueroa-Torres J. (2007). Gusano de fango *Tubifex* spp. Una Alternativa de riesgo en la alimentación de peces. *Revista Especies* (107): 32-34.

Mancuso, M. (2018). Citrus Essential Oils a Good Alternatives to Antibiotics in Aquaculture. *Archives of Animal Husbandry & Dairy Science*, 2019.

Margall, N., Domínguez, À., Prats, G., y Salleras, L. (1997). *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública*, 71, 437-443.

Martínez, R. M., Cerrilla, M. E. O., Haro, J. G. H., Garza, J. R. K., Ramos, J. Z., y Soriano, R. R. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia*, 40(11), 744-750.

Molina, C., y Mora, C. (2021). Acción antibacterial de los aceites esenciales y su efecto sobre el crecimiento en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *AQUACULTURA- Cámara Nacional de Acuicultura*, 139.

Mollah, F. A., y Siddik, M. A. B. (2015). Performance of Chicken Blood for the Production of Tubificid Worms as Live Food for Fish. *World Applied Sciences Journal*, 33(3), 496-502.

Negrete, P., Romero, J., y Villegas, G. (2001). Carga bacteriana en alimentos balanceados y no convencionales usados en el cultivo de organismos acuáticos. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, (2), 41-51.

Negrete Redondo, P., Monroy Dosta, C., y Romero Jarero, J. (2008). Evaluación de la calidad bacteriológica del alimento vivo (*Artemia*, *Daphnia*, *Tenebrio* y *Tubifex*) para peces en los sitios de su recolección, producción y venta. *Veterinaria México*, 39(3), 255-268.

Negrete, R., P., Jarero, J. R., García, S. C., y López, E. G. (2010). *Oedogonium capillare* (Linnaeus) (Kuetzing, 1845) como estrategia para purificar alimento vivo *Tubifex tubifex* (Müller, 1974) para peces. *Veterinaria México*, 41(3), 201-210.

Neira L. F., Mantilla J. C., Stashenko E y Escobar P. (2018). Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-Leishmania de aceites esenciales obtenidos de cuatro quiotipos del género *Lippia*. 17(1). 68-83.

Nenoph, P., & Uhlemann, R. (2006). Mycobacteriosis in mangrove killifish (*Rivulus magdalenae*) caused by living fish food (*Tubifex tubifex*) infected with *Mycobacterium marinum*. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 113(6), 230-232.

Pachés, G.M y Gonzalez, C. J. (2022). Uso de microalgas en depuración de aguas. Departamento Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universitat Politècnica de València.

Palazzolo, E., Laudicina, V. A., y Germanà, M. A. (2013). Current and potential use of citrus essential oils. *Current Organic Chemistry*, 17(24), 3042-3049.

Palleroni, N. J. (2015). *Pseudomonas*. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1-1.

Parra, M., Durango, J., y Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba*, 7(2), 187-200.

Parrado, M., Salas, M. C., Hernández-Arévalo, G., Ortega, J. P., y Yossa, M. I. (2014). Variedad bacteriana en cultivos piscícolas y su resistencia a antibacterianos. *Orinoquia*, 18(2), 237-246.

Pérez-Gutiérrez, R.M.(2005). Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(1), 5-10.

Pittman, C. I., Pendleton, S., Bisha, B., O'Bryan, C. A., Belk, K. E., Goodridge, L., y Ricke, S. C. (2011). Activity of citrus essential oils against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. and effects on beef subprimal cuts under refrigeration. *Journal of food science*, 76(6), M433-M438.

Ponce H., Lannacone J., Alvarino L. y Carhuapoma M. (2020). Toxicidad de los aceites esenciales de *Bursera graveolens*, *Lepechinia meyenii* y *Myrtus communis* sobre *Chrysoperla asoralis*, *Chrysoperla externa* y *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae). *Campus*, 29(5), 41-56.

RENAPRA (Red Nacional de Protección de Alimentos). (2021). Ficha técnica n° 9 - Salmonelosis. Enfermedades transmitidas por alimentos. Sitio web: <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/salmonelosis.pdf>.

Reyes M., Ramírez C., Nancucheo I., Villegas R., Schaffeld G., Krizan L., González J. y Oyarzun. (2016). A novel "in-Fed" delivery platform applied for oral DNA vaccination against IPNV enables high protection in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vaccine*, 35, 626-632

Ribas-Villaverde, C. (2017). Nuevas estrategias antimicrobianas: antagonistas del Quorum Sensing. [Doctoral dissertation, Universidad Complutense]. Sitio web: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CARLOS%20RIBAS%20VILLAVERDE.pdf>

Rivera-Zetina, D. J., Estrada-Hernández, M. R., y Estrada-Hernández, L. O. (2018). Mionecrosis fulminante metastásica por *Aeromonas caviae*. *Medicina interna de México*, 34(1), 142-151.

Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44, 464-475.

Rodríguez-Martínez, D., Arana-Magallón, F.C., Medina-Mejía, G y Vázquez-Silva, G. (2016). Depuración de enterobacterias mediante plata iónica en el alimento vivo (*Tubifex tubifex*) del ajolote mexicano. *UAM Xochimilco*.

Rodríguez, P., Martínez-Madrid, M., Arrate, J. A., y Navarro, E. (2001). Selective feeding by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Tubificidae, Clitellata). *Hydrobiologia*, 463(1), 133-140.

Sin, C., Britos, M., Chamorro, E., Cáceres, M., Fernández, D., & Ortega, S. (2021). Aceites esenciales con actividad antibacteriana: posible aplicación y administración en odontología. *Odontología Vital*, (35), 32-43.

Strack, D. (1997). Chapter 10. Phenolic Metabolism. En: Dey, P. M.; Harborne, J. B (eds.). Plant Biochemistry. London. UK. Academic Press.

Torres-Fajardo, R. A. y Piedrahíta, R. I. H. (2021). Actividad antihelmíntica in vivo de terpenos y aceites esenciales en pequeños rumiantes. Revista MVZ Córdoba, 26(3), 20.

Vázquez S. G., Molina D.K, Medina M G, Orcio A N., y. Arana M F. (2016) Depuración de enterobacterias en *Tubifex tubifex* por efecto de la microalga *Chlorella vulgaris*. Revista Mexicana de Agroecosistemas, Suplemento, 3: 57-64.

Velandia S. A., Flechas M. C., Stashenko E. y Ocazonez R. E. (2016) Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de Colombia para investigación con base en su citotoxicidad. Revista de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. 23(1). 18-29.

Vignola, M. B., Serra, M. A. y Andreatta, A. E. (2020). Actividad antimicrobiana de diversos aceites esenciales en bacterias benéficas, patógenas y alterantes de alimentos.

Zhang P., Selck H., Rosendal T. S., Pang C. y Zhao B. (2017). Bioaccumulation and effects of sediment-associated gold and Graphene oxide nanoparticles on *Tubifex tubifex*. Journal of Environmental Sciences,

Zekaria, D. y Calier, L. (2014). Los aceites esenciales. Una alternativa a los antimicrobianos. Laboratorios Calier. Alexander, J. D. (2010). Influence of environmental features on *Tubifex tubifex* and *Myxobolus cerebralis* infected *Tubifex tubifex* in Yellowstone National Park: implications for whirling disease risk. Montana State University.

## 10 Visto Bueno

---

**Dra. Gabriela Vázquez Silva**

**(No. Eco. 30288)**

Departamento El Hombre y su Ambiente

UAM Xochimilco

---

**Dr. Jesús I. Morales Jiménez**

**(No Eco. 45368)**

Departamento El Hombre y su Ambiente

UAM Xochimilco