

Evaluación de *Escherichia coli* y *Salmonella arizona* como patógenos oportunistas en el cultivo de pez ángel (*Pterophyllum scalare*, Lichtenstein 1823)

¹Monroy-Dosta MC, *, ¹Negrete-Redondo MP, ²Romero-Jarer JM, ¹Torres-Lima P.

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Laboratorio de Producción de Alimento Vivo. Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, C. P. 04960 Del. Coyoacán. Tel. (55) 4065-6136

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

Email: monroydosta@hotmail.com

RESUMEN

En centros de producción de pez ángel (*Pterophyllum scalare*) de Xochimilco, Ciudad de México, se presentaron procesos de mortalidad masiva (90% de la producción). Los peces muertos manifestaron cuadros clínicos atípicos con ojos hemorrágicos, branquias pálidas, cuerpo muy delgado, anorexia y nerviosismo. Al efectuarse la necropsia no se observó hemorragia interna ni sangrado en los órganos internos; signos diferentes a los provocados por las bacterias tradicionalmente reconocidas como ictiopatógenas. Al ser desconocida la relación etiológica que podría estar comprometida entre los peces analizados y los patógenos involucrados, se tomaron muestras de riñón de los peces que manifestaron los signos de infección anteriormente mencionados. Las muestras fueron sembradas en agares selectivos. Las bacterias fueron identificadas usando los sistemas API-20E y API-20NE. Se identificaron diferentes géneros de la familia Enterobacteriaceae como *Escherichia*, *Salmonella*. Se procedió a probar la capacidad de *Escherichia coli* y *Salmonella arizona* de provocar infección en peces ángel, clínicamente sanos. Para tal efecto se desarrolló una secuencia de eventos experimentales que definirían la relación etiológica entre éstas bacterias aisladas y su hospedero. Con ese objetivo se mantuvieron cuatro lotes de peces en las mismas condiciones que en los tanques de cultivo de los centros de producción de pez ángel, es decir: 28°C, pH 7, OD a 5 mg/ml y 0.3 ppm de nitratos y nitritos. Se les inoculó vía intramuscular dosis infectivas (106 y 105 ufc/ml) de las bacterias problema. Para establecer la existencia de variables influyentes se efectuó un análisis multivariado aplicando la prueba de Jackknifed y el análisis discriminante para definir que órganos se vieron afectados dependiendo del patógeno y la dosis o bien, que signos se manifestaron con mayor frecuencia, para lo cual se utilizó el paquete estadístico SYSTAT 9.0. Se comprobó que las bacterias *E. coli* y *S. arizona* son patógenos oportunistas asociadas con diferentes bacteriosis, que cuando cambian las condiciones ambientales se manifiestan como virulentas y ocasionaran graves pérdidas en la producción de especies susceptibles al estrés ambiental.

Palabras clave: acuicultura de peces de ornato, infección experimental, patología atípica

INTRODUCCIÓN

Una de las principales ramas de la acuicultura es la producción de una gran variedad de organismos acuáticos de valor comercial, entre los cuales se incluyen a los peces de ornato de agua dulce, los cuales poseen interés intrínseco al estar por un lado generando una importante fuente de ingresos para grupos rurales que se dedican a su cultivo (Arredondo y Ponce 1998) y por otro, impulsando el desarrollo de líneas de investigación dedicadas al estudio de estos organismos (SEMARNAT 2003). Entre los peces cultivados con fines de ornato los cíclidos representan probablemente el grupo más importante. El cultivo de pez ángel (*Pterophyllum scalare*) es el de mayor predilección por los aficionados al cultivo de peces de ornato (APPOEM 2001).

Uno de los principales problemas que enfrenta la acuicultura de ornato son las enfermedades. Las patologías de los peces se reconocen cada vez más como un problema en la producción y comercialización que afecta el desarrollo económico y social de productores de peces de ornato en varios países del mundo (FAO 2001). Según reportes de productores de estos peces en la Ciudad de México, las pérdidas por infección relacionadas con estrés ambiental ascienden a 90% de la producción total, de ahí la importancia de la prevención, diagnóstico y control de las enfermedades (OIE 2003). La epidemiología de casi todas las enfermedades

bacterianas y virales de peces está asociada con factores que inducen estrés, tales como los cambios bruscos de temperatura, la salinidad, el pH, disminución de los niveles de oxígeno disuelto, manipulación excesiva o incremento en los niveles de materia particulada en el agua (Quintana 2001).

La salud de organismos acuáticos cultivados puede concebirse como un estado de bienestar fisiológico. La ausencia de enfermedad es un elemento esencial en el bienestar físico. Los tres factores de mayor importancia para que se desencadene una epizootia son: la susceptibilidad de la especie al patógeno presente, la virulencia de este y las condiciones ambientales adversas que induzcan estrés en los peces en cultivo. Asimismo, es el equilibrio de estos factores lo que determina el estado de salud, por lo que una alteración en cualquiera de ellos puede desencadenar la infección (Snieszko 1973).

Es importante tener en cuenta que el éxito de la producción en los sistemas de cultivo depende en gran medida de la disponibilidad de alimento, sobre todo alimento vivo que es esencial en la fase larvaria de los peces porque solo pueden alimentarse de organismos muy pequeños que contengan los nutrimentos necesarios que les permitan alcanzar las tallas comerciales en poco tiempo (Lim 2003). Además de que un organismo mal alimentado es más susceptible a las variaciones ambientales y, por ende, a las enfermedades (Padrós y Furones 2002, Auró y Ocampo 1999, Dehasque et al. 1989, Negrete y Romero 1998).

En centros productores de peces de ornato en la Ciudad de México se han detectado brotes infecciosos atípicos, tal es el caso de tres centros productores de pez ángel ubicados en Xochimilco, los cuales presentaron fallas en el suministro de energía eléctrica, lo que alteró durante ocho horas las condiciones fisicoquímicas (primero la temperatura bajo a 18°C para posteriormente subir a 32°C y como consecuencia los niveles de oxígeno disueltos se vieron alterados) de los estanques de cultivo, simultáneamente se registró mortalidad masiva de peces ángel (*P. scalare*), los cuales presentaron signos diversos de infección, que no se habían registrado hasta el momento, como ojos

hemorrágicos, nado lento, adelgazamiento y branquias muy pálidas.

Al efectuar la necropsia a los peces, los órganos internos no presentaron hemorragias, únicamente se observaron pálidos. Asimismo, se aislaron enterobacterias directamente de riñón de estos peces, entre ellas, *Escherichia coli* y *Salmonella arizona*, que son reportadas como patógenos de humanos pero hasta la fecha no se ha registrado ningún informe científico de estas especies como patógenas de peces de ornato, por lo que la relación etiológica entre éstas bacterias y su hospedero, el pez ángel, es aún desconocida.

Ante la presencia de enterobacterias en brotes infecciosos con cuadros clínicos diferentes a los ya estudiados y provocados por bacterias patógenas de peces, el objetivo del presente trabajo es establecer la relación etiológica entre *Escherichia coli* y *Salmonella arizona* y el pez ángel *P. scalare*

MATERIAL Y METODOS

De un centro productor de pez ángel ubicado en Xochimilco, Distrito Federal, en donde se manifestó mortalidad de la producción con signos y lesiones de enfermedad atípica, se obtuvieron muestras de peces que fueron sustraídos de los estanques de cultivo con una red de cuchara, se anestesiaron con sulfometano de tricaina (0.1 g/L) durante un minuto. Se efectuó la disección, haciendo un corte desde el opérculo hasta la base de la aleta caudal con un bisturí estéril, se tomó con una asa bacteriológica estéril una muestra del riñón de cada uno de los peces muertos, y se sembraron en placas de agar de tiosulfato-citrato-sales biliares sucrosa (TCBS) y agar infusión cerebro-corazón (BHI), incubándose durante 24 horas a 35°C (APHA 1992).

Las colonias se purificaron a través de resiembras sucesivas en placas con agar BHI. Se efectuó la tinción de Gram, se observó la morfología celular en un microscopio óptico, finalmente las cepas puras aisladas fueron identificadas usando los sistemas comerciales de identificación API-20E y API- 20NE, siguiendo las indicaciones del productor (Analytical Profile Index 1992, Analytical Profile Index 1997).

Se introdujeron 50 peces (*P. scalare*), en estadio juvenil, en una tina de cultivo, equipada previamente en el laboratorio, para mantenerlos en periodo de aclimatación bajo las mismas condiciones de cultivo que en los centros de producción, esto es 28°C, pH, OD 5 mgmL⁻¹ y 0.3 ppm de nitratos y nitritos y se observó su comportamiento durante ocho días, sustituyendo aquellos peces que presentaron algún signo de infección o comportamiento “anormal” (boqueo, anorexia, exoftalmia, nado errático, descamación, ojos hemorrágicos).

Con el objeto de establecer si los peces habían tenido contacto previo con los patógenos a inocular, *E. coli* y *S. arizona*, se efectuó la titulación de inmunoglobulinas a partir de una submuestra de los peces en observación, se extrajeron 0.2 mL de suero sanguíneo a cuatro peces y se efectuó la reacción de aglutinación contra las bacterias antes mencionadas por el método de dilución paralela (Bradshaw 1973).

Simultáneamente, se prepararon los inóculos, para lo cual se sembró con una asa calibrada de 3 mm, tres asadas de cada uno de los cultivos puros de *E. coli* y *S. arizona*, en frascos viales con 50 ml de caldo de BHI. Se dejó incubar a baño maría con agitación durante 24 horas a 35 °C (Michel 1980). Después de 24 horas se efectuaron diluciones 1:10 (10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴), para lo cual se extrajeron 5 mL del inóculo original y se adicionaron a un vial con 45 ml del mismo medio para obtener una dilución 10⁷ y así consecutivamente hasta llegar a la dilución 10⁴. De cada dilución se extrajo con una pipeta automática 0.1 mL y se sembró de forma homogénea sobre placas de agar BHI utilizando una varilla de vidrio acodada; posteriormente las placas se incubaron a 35 °C, durante 24 horas (Michel 1980), después de las cuales se efectuó el conteo de unidades formadoras de colonias (ufcmL⁻¹), para comprobar la viabilidad de las cepas y determinar el número de ufc/ mL inoculadas a cada individuo (Arévalo et al. 2003).

Se distribuyeron diez peces (*P. scalare*) en cada uno de los cinco acuarios dispuestos de la siguiente forma: el acuario 1 quedó como testigo, en éste los peces fueron inoculados con solución salina estéril al 0.8% para observar el efecto del estrés

experimental, los acuarios 2 y 3 se utilizaron para los peces inoculados con *E. coli* con dosis infectivas 10⁶ y 10⁷ ufc/mL⁻¹, los acuarios 4 y 5, se destinaron para los peces inoculados con *S. arizona* con dosis infectivas 10⁶ y 10⁵ ufc/mL⁻¹ respectivamente. Los peces fueron inoculados vía intramuscular, por debajo de la aleta dorsal y por encima de la línea lateral, con una aguja estéril de insulina. El inóculo se dosificó previamente según la talla del organismo, considerando 1 mL por cada 100 g de pez (Michel 1980).

A partir de este momento y hasta que los organismos murieron, se registraron cada hora los cambios de comportamiento, signos y lesiones causados por la infección. A los peces que murieron se les practicó la necropsia para determinar existencia o ausencia de lesiones en los órganos internos y a su vez tomar una muestra directamente de riñón, que se sembró en placas de agar BHI las cuales se incubaron a 35 °C durante 24 horas. Las colonias obtenidas se purificaron, se efectuó la tinción de Gram y se identificaron con los sistemas antes mencionados (Dehasque et al. 1989, Analytical Profile Index 1992).

Para establecer si los peces que superaron la infección formaron defensas contra *E. coli* y *S. arizona*, se efectuó nuevamente la reacción de aglutinación de inmunoglobulinas de la forma antes citada (Bradshaw 1973).

Para analizar los datos obtenidos en cuanto al cuadro clínico presentado por los peces, con respecto a los patógenos y dosis inoculada, se aplicó la prueba de Jackknifed y un análisis discriminante, con el fin de establecer la existencia de variables influyentes, es decir qué órganos se vieron afectados (Ruiz y Deturnewlle 2000). Para tal efecto se utilizó el paquete estadístico SYSTAT 9.0, por medio del cual se analizó la existencia de diferencias significativas entre los grupos de las variables medidas y se definieron las variables influyentes, esto es, que órganos se ven más afectados dependiendo del patógeno y la dosis o que signos se presentaron con mayor fuerza entre los siguientes: coloración, piel, escamas, aletas y cola, boca, branquias, ojos, cuerpo, apetito, comportamiento, nado, tubo digestivo, riñón, hígado, vejiga natatoria, vesícula biliar, corazón y gónadas, de acuerdo con

el grado de lesión: 0 cuando no se observó daño o lesión, 1 cuando se detectó daño ligero, 2 en daño grave y 3 en daño severo.

RESULTADOS

Los peces (*P. scalare*) cultivados en el centro de producción en donde se llevó a cabo el presente estudio presentaron signos y lesiones de infección como ojos hemorrágicos, anorexia, adelgazamiento, aletas erosionadas, branquias pálidas y nado lento. Durante la necropsia se observó ausencia de sangrado en los diferentes órganos internos de los peces. Estos organismos murieron dentro de las primeras 48 horas a partir de la manifestación de los primeros signos de infección. De las diferentes muestras de riñón tomadas de estos peces, se aislaron bacterias de las familias *Vibrionaceae*, *Aeromonaceae*, *Pseudomonaceae*, predominando las bacterias *E. coli* y *S. arizona* pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Tabla 1).

Tabla 1. Carga bacteriana (ufcmL⁻¹) diferentes especies bacterianas aisladas del riñón de peces *P. scalare* infectados.

Muestra	UfcmL ⁻¹	Especies identificadas
1	135	<i>Salmonella arizona</i>
2	77	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	35	<i>Pseudomonas cepacea</i>
4	60	<i>Aeromonas salmonicida</i>
5	45	<i>Vibrio fluvialis</i>
6	43	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
7	170	<i>Escherichia coli</i>
8	56	<i>Vibrio vulnificus</i>
9	85	<i>Pseudomonas</i> sp.
10	74	<i>Samonella</i> sp.

La muestra de sangre extraída de dos individuos seleccionados al azar del lote de peces *P. scalare* que se mantenían en periodo de aclimatación en el laboratorio, antes del experimento, mostró títulos de 1:60 µL y 1:80 µL.

Los peces del lote testigo que se inocularon con solución salina estéril manifestaron signos y lesiones generales de infección: edema, descamación, anorexia, se mostraron nerviosos, sin embargo; después de 30 horas de la inoculación los

signos desaparecieron y los organismos se recuperaron (Tabla 2).

En el grupo de peces inoculados con 10⁶ ufcml⁻¹ de *E. coli*, los primeros signos aparecieron 24 horas después de la inoculación. Los signos que presentaron los peces fueron: decoloración de la piel, hemorragia en los ojos, anorexia, comportamiento nervioso, branquias pálidas, escamas erizadas, nado lento y errático. De la necropsia practicada sobre los dos organismos que murieron dentro de las 24 horas siguientes a la inoculación, el dato de mayor importancia fue la ausencia de sangrado en los órganos internos, sin embargo, se observó tubo digestivo lacerado, mal olor y líquido diseminado en el abdomen. Los peces que sobrevivieron a la infección recuperaron su estado inicial de salud después de 48 horas de haber sido inoculados (Tabla 2).

El lote experimental inoculado con 10⁵ ufcml⁻¹ del mismo patógeno, inició el proceso infeccioso 24 horas después de la inoculación con decoloración de la piel, escamas erizadas, anorexia, adelgazamiento corporal, comportamiento pasivo, nado lento y branquias pálidas. Inmediatamente después de que los dos peces murieron se efectuó la necropsia, en la que se observó tubo digestivo lacerado, pero no se observó hemorragia en los órganos internos ni branquias. Después de 5 días, los peces empezaron a recuperar la normalidad, hasta lograr su estado de salud inicial (Tabla 2).

El cuadro clínico iniciado por los peces 24 horas después de la infección provocada con 10⁶ ufcml⁻¹ de *S. arizona*, se caracterizó por decoloración de la piel, aletas erizadas, hemorragia en los ojos, adelgazamiento, pérdida de apetito, branquias pálidas, nado lento e irregular y comportamiento pasivo. Sin embargo, los peces fueron recuperando su estado inicial de salud. Todos superaron la infección (Tabla 2).

Los peces inoculados con 10⁵ ufcml⁻¹ de *S. arizona* presentaron signos leves de infección tres días después de ser inoculados, con cambios como decoloración, branquias pálidas, ojos hemorrágicos, adelgazamiento, anorexia, nado lento e irregular y comportamiento nervioso. Después de cuatro días, el comportamiento y salud de los organismos se

Tabla 2. Caracterización diagnóstica de peces *P. scalare* inoculados con solución salina estéril al 0.8% y diferentes dosis de *E. coli*, *S. arizona* y *A. hydrophila*.

Inóculo ufc/mL ⁻¹	Sol. salina	<i>E. coli</i> 10 ⁶	<i>E. coli</i> 10 ⁵	<i>S. arizona</i> 10 ⁶	<i>S. arizona</i> 10 ⁵	<i>A. hydrophila</i> 10 ⁶
Signos						
Piel	Edema	Decoloración	Decoloración	Decoloración	Decoloración	Presencia de moco
Escamas	Erizadas	*	*	Erizadas	*	Descamación
Aletas y cola	*	*	*	Erizadas	*	Hemorrágicas
Boca	*	*	*	*	*	Boqueo constante
Branquias	*	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Pálidas	Hemorrágicas
Ojos	Exoftalmia	Hemorrágicos	Hemorrágicos	Hemorrágicos	Hemorrágicos	Exoftalmia
Cuerpo	*	Adelgazamiento	Adelgazamiento	Adelgazamiento	Adelgazamiento	Hinchado
Apetito	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia	Anorexia
Comportamiento	Nerviosos	Nerviosos	Nerviosos	Nervioso	Nervioso	Nervioso
Nado	Normal	Lento y errático	Lento e irregular	Lento e irregular.	Lento e irregular	Espasmódico
Necropsia						
Tubo digestivo	*	Lacerado	Lacerado	*	*	Hemorrágico
Riñón	*	*	*	*	*	Desecho
Hígado	*	*	*	*	*	Hemorrágico
Vesícula biliar	*	*	*	*	*	Desecho
Vejiga natatoria	*	*	*	*	*	Roto
Corazón	*	*	*	*	*	*
Gónadas	*	*	*	*	*	*
Otros	*	Sin hemorragia interna. Dos peces muertos	Sin hemorragia interna. Dos peces muertos	*	*	Hemorragia interna Todos los peces muertos

• Nota: no se manifestaron signos.

restableció. Todos los peces sobrevivieron (Tabla 2).

La titulación de las inmunoglobulinas obtenida de los peces que sobrevivieron a la infección experimental registró en todos los casos, un aumento en el nivel de títulos: 1:2 280 µL y 1:2 560 µL.

Al efectuar el análisis estadístico con base en la función discriminante canónica (estandarizada con la varianza), se consideró que las cuatro variables más importantes son los signos y lesiones presentados en las branquias, piel, ojos y el nado de los peces, como se puede observar en el Tabla 3.

El análisis discriminante muestra que toda la información se explica con dos factores de discriminación: el factor 1 indica que el tratamiento con *E. coli*, sin importar la concentración, es discriminado por la palidez de las branquias; mientras que para *S. arizona*, sin importar la concentración de la dosis, es discriminado por los ojos hemorrágicos. En el caso del testigo, es discriminado por las lesiones en la piel. Con respecto a *Aeromonas hydrophila* 10⁶ ufc/mL⁻¹, se observó que es discriminada por la hemorragia observada en las branquias de los peces (Fig. 1).

Considerando el factor 2 de discriminación, *S. arizona*, sin importar la dosis, es discriminada por la decoloración de la piel y el nado errático de los peces; *E. coli*, por la decoloración de la piel y la

presencia de ojos hemorrágicos, mientras que el lote testigo es discriminado por la presencia de exoftalmia. *A. hydrophila* 10^6 ufc/mL⁻¹, fue discriminada por el edema presentado en la piel y exoftalmia (Fig. 1).

Tabla 3. Valores de correlación canónica estandarizada con la varianza de la función discriminada de los signos y lesiones observados en los peces inoculados con 10^6 y 10^5 ufc/mL⁻¹ de *E. coli* y *S. arizona*.

Signos y Lesiones	Factor 1	Factor 2
Valores	13.661	1.631
Correlación canónica	0.965	0.787
Proporción acumulada	0.790	0.884
Función canónica discriminante		
Coloración	4.734	2.174
Aletas y cola	0.167	1.039
Boca	0.088	0.340
Branquias	8.471	5.497
Ojos	7.117	6.447
Cuerpo	-0.429	-1.725
Apetito	-0.368	-0.205
Comportamiento	0.169	0.459
Nado	4.163	2.324
Tubo digestivo	0.188	0.500
Hígado	-0.533	-1.222
Vesícula biliar	-1.090	-4.191
Vejiga natatoria	0.123	-1.581
Corazón	SVD	SVD
Gónadas	-0.757	-0.359

Nota: SVD = Sin Valor en la Discriminación

DISCUSIÓN

La carga bacteriana identificada de las muestras tomadas del riñón de los peces, es el reflejo de la contaminación bacteriana en el sistema de cultivo, sobre todo en el caso de *E. coli* y *S. arizona*, bacterias asociadas con lugares contaminados por asentamientos humanos y desechos agropecuarios (Austin y Austin 2003, Negrete y Romero 1998).

La titulación de inmunoglobulinas efectuadas previamente al experimento revela que los peces tuvieron contacto previo con los patógenos

inoculados, aunque los títulos se consideran bajos (Negrete et al. 2004).

La manifestación de signos generales de infección en los peces del grupo testigo fue consecuencia del choque mecánico que implicó la inyección con solución salina estéril. Se considera que la manifestación de estos signos que desaparecieron en un lapso muy corto, fue a consecuencia de la disminución de defensas en los peces por el estrés experimental en presencia de bacterias que forman parte de la flora normal de los peces (Michel 1980).

Hasta ahora las bacterias *E. coli* y *S. arizona* no se han registrado como patógenas de peces *P. scalare* en la bibliografía, sin embargo, en este estudio se observó que al inocular dosis infectivas 10^6 y 10^5 ufc/mL⁻¹ de estas bacterias a peces *P. scalare* sanos, se cumplieron los postulados de Koch, dado que al aislar estas bacterias de los peces enfermos del centro de producción, proliferaron en cultivos puros por varias generaciones, asimismo, al inocular estas bacterias en peces *P. scalare* se reprodujo la enfermedad típica. De los individuos

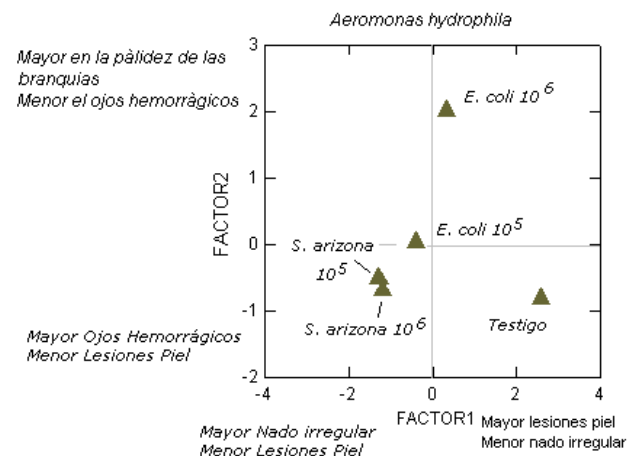


Fig. 1. Análisis discriminante del cuadro clínico presentado por *P. scalare*, inoculado con 10^6 y 10^5 cfu/ml de *E. coli*; *S. arizona*; grupo control y tratamiento con 10^6 cfu/ml de *A. hydrophila*.

que murieron se pudo recuperar a los patógenos inoculados al tomar muestras de riñón y sembrarlas en placas de agar de BHI. Finalmente, los peces que sobrevivieron a la infección generaron anticuerpos

contra el patógeno, esto fue comprobado al elevarse el nivel de títulos contra *E. coli* y *S. arizona*. Lo anterior demuestra que dichas bacterias tienen la capacidad de provocar infección. En ambos casos se presentó ausencia de hemorragia en los órganos internos y signos y lesiones como adelgazamiento, branquias pálidas, hemorragias en la base de los ojos, aletas deshinchadas y nado lento. Solo 20% de los peces inoculados con *E. coli* murieron, lo que indica que la bacteria no es patógeno estricto para los peces *P. scalare*. Se ha registrado (Souza et al. 2000), que la bacteria *E. coli* posee un alto nivel de evolución debido a su capacidad de transferencia de genes o plásmidos a través de la “transferencia lateral;” además, una misma cepa de esta bacteria puede alcanzar diferentes niveles en los órganos del hospedero. Con esto se define que en esta bacteria se puede encontrar diversas formas de infección dependiendo del grado de penetración que tenga en el organismo hospedero (Munro 1982).

Las dosis infectivas de los patógenos inoculados es equivalente a $50,000 \text{ ufc/mL}^{-1}$ y $60,000 \text{ ufc/mL}$ que en comparación con las dosis infectivas utilizadas por otros autores en bacterias como *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio fluvialis* en *Carassius auratus*, es una dosis alta por, lo que se determinó que los patógenos estudiados poseen baja virulencia, ya que está guarda una relación inversa con respecto a la cantidad de ufc/mL del inóculo (Walter y Plumb 1990).

La caracterización diagnóstica no concuerda con la reportada en estudios realizados por otros autores (Cottral 1986, Walter y Plumb 1990), con bacterias patógenas de peces como *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida*, que son bacterias de interés ictiopatógeno que producen enfermedades en una gran variedad de peces, en los que los signos de infección se caracterizan por septicemia hemorrágica generalizada a todos los órganos internos, además de la presencia de furúnculos sobre el cuerpo, asociado con dermionecrosis ulcerativas hemorragia en las branquias, nado espasmódico, nerviosismo y ojos exoftálmico, que no se observaron en los peces experimentales (Negrete et al. 2002). Esto se debe a que las bacterias inoculadas no son patógenos estrictos de peces de ornato, sino que son patógenos

oportunistas que sólo actúan cuando las condiciones ambientales son adversas, como se comprueba en estudios anteriores (Walter y Plumb 1990), en los que se expresa el evidente efecto estresante de la temperatura del agua sobre el hospedero, en cuya fisiología hay fuertes cambios que pueden causar cuadros clínicos más severos o diferentes, de acuerdo con el número y diversidad de bacterias presentes en ese momento (Cottral 1986).

La temperatura del agua constituye un muy importante factor en el desarrollo de muchas enfermedades de peces, debido a que estos son poiquiloterms y su temperatura corporal es siempre cercana a su ambiente acuático. Las respuestas fisiológicas de los peces, incluyendo los mecanismos de defensa dependen de su temperatura corporal. Por ello, el resultado de una infección por un patógeno en los peces es afectado significativamente por la temperatura del agua (Walter y Plumb 1990). De tal forma que al cambiar bruscamente la temperatura ambiental, se imprime un fuerte choque térmico que somete a los peces a un fuerte estrés ambiental agudo, lo que favorece a las bacterias oportunistas que se encuentran en el sistema.

Las fallas continuas en el suministro eléctrico que se presentaron en el centro acuícola estudiado alteró las condiciones ambientales de cultivo, cambiando la temperatura del agua y como consecuencia el pH, concentración de nitritos y nitratos y niveles de OD, lo que propició un desequilibrio en la relación patógeno-hospedero-ambiente, como lo plantea también Sniezko (1973), esta situación alteró la relación salud-enfermedad al presentarse patógenos oportunistas como *E. coli* y *S. arizona*, junto con un hospedero susceptible, en un ambiente que no cumple con las condiciones de manejo y explotación adecuados (Negrete y Romero 1998).

El análisis estadístico que se aplicó demostró diferencias entre los cuadros clínicos presentados por los peces a partir de la inoculación de 10^6 y 10^5 ufc/mL^{-1} de *E. coli* y *S. arizona* con respecto al lote testigo inoculado con solución salina y el cuadro presentado por los peces *P. scalare* con 10^6 ufc/mL^{-1} de *Aeromonas hydrophila*. El análisis discriminante

indicó que, en el caso de *E. coli*, la concentración de la dosis inoculada es importante, ya que al utilizarla en la dosis 10^5 ufc/mL⁻¹, los peces presentaron nado errático, pero a una mayor concentración (10^6 ufc/mL⁻¹) la afección se manifiesta por palidez en las branquias. Sin embargo, la afección por *S. arizona*, se refleja en mayor grado por ojos hemorrágicos y la decoloración de la piel, sin importar la dosis inoculada. En el lote testigo se afecta en mayor grado la piel y los ojos; en este caso se presentó edema en la piel y exoftalmia pero no hubo decoloración de la piel ni hemorragia en la base de los ojos como se presentó en los lotes experimentales. Al comparar los lotes experimentales con los peces inoculados con 10^6 ufc/mL⁻¹ de *A. hydrophila*, se observó que es totalmente discriminada por las lesiones presentadas en las branquias. Sin embargo, estas lesiones son totalmente diferentes a las observadas en los lotes experimentales en los cuales las branquias presentan palidez, mientras que con *A. hydrophila* se manifestó hemorragia: en cuanto a las lesiones observadas en los lotes experimentales se registró hemorragia, mientras que con *A. hydrophila* se produjo exoftalmia. Lo anterior indica las diferencias entre el cuadro clínico presentado por los peces inoculados con diferentes dosis de *E. coli*, *S. arizona* a 10^6 ufc/mL⁻¹ y de *A. hydrophila*, debido a que esta es una bacteria causante de cuadros agudos asociados con dermonecrosis ulcerativas y furunculosis (Austin y Austin 2003).

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados se puede concluir que las enterobacterias *E. coli* y *S. arizona* son bacterias patógenas oportunistas de pez ángel (*P. scalare*), por lo que las condiciones ambientales deben mantenerse en estricta vigilancia, para evitar que se presenten brotes infecciosos de patógenos oportunistas que al encontrar condiciones ambientales favorables puedan manifestarse virulentas y poner en riesgo a los organismos en cultivo (Austin y Austin 1987).

BIBLIOGRAFÍA

- Analytical Profile Index. 1992. *Enterobacteriaceae* and other Gram negative Bacteria, 9th. Edition Bioumerieux, Francia.
- Analytical Profile Index. 1997. *Enterobacteriaceae* and other Gram negative Bacteria, 9th. Edition Bioumerieux, Francia.
- APHA. 1992. Standard methods for examination of water and waste water. 17th. Ed. Washington, American Public Health Association. Washington D. C. pp 583-598.
- APPOEM A. C. 2001. Asociación de Productores de Peces de Ornato del Estado de Morelos. Diagnóstico de la Producción en las granjas asociadas a la APPOEM. A. C. Secretaria de Desarrollo Agropecuario de Morelos. SAGARPA.
- Arévalo Z, AM Clavijo, DM Rolo, M Alvarez, D Conroy y D Infante. 2003. Isolation of *Vibrio cholerae* from lisas and tilapias in Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2.
- Arredondo J y J Ponce. 1998. Calidad del agua en acuicultura conceptos y aplicaciones. México, D. F. AGT. Editor, S. A.
- Auró A y CL Ocampo. 1999. Diagnóstico del estrés en peces. Revista Veterinaria México. 337-344.
- Austin B y DA Austin. 1987. Bacterial fish pathogen diseases in formes and wild Fish. Ellis Horwood Ltd. London. 364
- Austin B y DA Austin. 2003. The pathogenicity of *Vibrio* tipe strains to salmonids. Department of Biological Sciences. Herriott-Walt University of Richartown. Edinburgh, EH144AS. UK International Symposium of Aquatic Animal Health.
- Bradshaw LJ. 1973. Laboratory Microbiology. Second edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Cottral GE. 1986. Microbiología Veterinaria. Ediciones científicas de la prensa mexicana, México.
- Dehasque M, T Wolf, P Candevra, P Coutteau y P Sorgeloos. 1989. Control of bacterial input through the live feed in marine fish hatcheries. Aquaculture. 249-256.
- FAO, 2001. Estadísticas de la producción de acuicultura. FAO, Circular de pesca N° 815.
- Lim LC. 2003. Recent development in the application of live feeds in the Freshwater ornamental fish cultura. Aquaculture. 246.
- Michel C. 1980. A standardized of experimental furunculosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Fisheries Aquaculture Scienses. 746-750.

- Munro ALS. 1982. The pathogenesis of bacterial diseases of fish. En Robles R-Journal of Microbial Diseases of Fish. Academia Press, London, pp 131-149.
- Negrete RP y JJ Romero. 1998. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícolas en los estados de México y Morelos. Revista Hidrobiológica. 43- 54.
- Negrete RP, JJ Romero y FJL Arredondo. 2004. Capacidad de *Vibrio fluvialis* (Lee, 1981) para producir infección en pez dorado (*Carassius auratus*,L.) Revista Veterinaria México. 35.
- Negrete RP, JJ Romero, JD Valencia y LG Villegas. 2002. Bacteriosis por estrés ambiental en granjas acuícola rurales del Estado de México. Sociedades Rurales. Producción y Medio Ambiente. 49-58.
- OIE. 2003. Código Sanitario para los animales acuáticos. Organización Mundial de Sanidad Animal. Capítulo 1.5.1.
- Padrós F y MD Furones. 2002. Patología bacteriana en piscicultura. Annual Review of Fish Diseases. 34:13.
- Quintana A. 2001. Riesgo sanitario asociado al comercio de animales acuáticos. Revista Acuatic.14: 34-59.
- Ruiz RT y CY Deturnewlle. 2000. El análisis discriminante en estudios biológicos. Revista Biología, Facultad de Biología. Universidad de la Habana Cuba
- SEMARNAT. 2003. Estado actual de la acuicultura. SECRETARIA GOBIERNO DE MORELOS. Boletín informativo. Cuernavaca Morelos. Ed. SEMARNAT.
- Souza V, A Castillo y A Eguiarte. 2000. The evolutionary ecology of *Escherichia coli*. American Science. 90.
- Snieszko SF. 1973. Recents advances in scientific knowledge and development pertaining to diseases of fish. C. A. Bradly and C.E. Cornelius, ed.
- Walter G y R Plumb. 1990. Environmental stress and bacterial infection in channel cats fish *Ictalurus punctatus*. Reviews Journal of Fish Biology. 177-185.