

Presencia de *Vibrio furnissii* en peces de ornato

Presence of *Vibrio furnissii* in ornate fish

P. Negrete Redondo *, J. Romero Jarero **,
J. L. Arredondo Figueroa y *** P. Ramírez García ****

*Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco. Calz. de Guadalupe 1100, Col. Villa Quietud, Delg Coyoacán, México, D.F. ** Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior. Ciudad Universitaria. Delg. Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. *** Universidad Autónoma Metropolitana- Ixtapalapa. Av. San Rafael Atlxco 186. Col. Vicentina, México, D.F. **** Facultad de Estudios Superiores de Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Tlanepantla 54090. Estado de México, México.

RESUMEN

Durante epizootias en los veranos del 1998 y 1999, en granjas piscícolas del estado de Morelos, México, se manifestaron de elevados índices de mortalidad. Con el objetivo de aislar e identificar el agente causal del proceso infeccioso, se tomaron muestras del riñón de los peces de ornato de las especies *Carassius auratus* y *Pterophyllum scalare*, con signos y lesiones de infección; del agua de los estanques y del alimento balanceado. Los signos y lesiones registrados en los individuos observados previa su disección, correspondieron al síndrome miódermonecrosis ulcerativa, con septicemia, característica de vibriosis. De todas las muestras analizadas se aislaron e identificaron géneros bacterianos de importancia para la ictiopatología, pertenecientes a las familias Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae, Vibrionaceae y Pseudomonadaceae. En las muestras se identificó la presencia de bacterias de la especie: *Vibrio furnissii*, además de otras especies patógenas para organismos acuáticos y para el humano, como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio fluvialis* entre otras. Diferentes autores han reportado la bacteria *Vibrio furnissii* de muestras clínicas de pacientes humanos con diarreas en Asia, aunque su relación etiológica con el hospedero humano no se ha comprobado. El origen de *V. furnissii* en las muestras analizadas, se puede establecer como parte de la flora bacteriana de peces de ornato que son importados a México desde Asia. La identificación de esta bacteria, es particularmente difícil debido a su semejanza con *Aeromonas hydrophila* y con *Vibrio fluvialis*. Fue a partir de la definición de su halotolerancia, su capacidad de producir gas a partir de glucosa, y la forma de crecimiento de las colonias en agar de tiosulfato-citrato sales biliares-sucrosa, que se pudo diferenciar de las cepas anteriormente mencionadas. Aunque, aún no se han llevado a cabo los experimentos pertinentes para reconocerla como patógeno de organismos acuáticos, la capacidad de esta bacteria de hemolizar sangre en el medio agar sangre, demuestra que posee características que la capacitan para provocar infección en su hospedero. Debido a la presencia de especies bacterianas, patógena de peces y al daño que ocasionan en los cultivos acuáticos, es que es necesario establecer una estrategia rápida para su identificación y tratamiento adecuado. La confusión en la identificación entre las especies antes mencionadas, seleccionando tratamientos químicos erróneos como sería la administración de antibióticos, además de provocar contaminación ambiental, propiciará el desarrollo de mecanismos de resistencia a dichos antibióticos en estas bacterias.

Palabras clave: *Vibrio furnissii*, Acuicultura, Peces de ornato, Bacteria, Patógeno.

ABSTRACT

During the epizootics of the summer of 1998 and 1999, high mortality indices were registered in fish farms located in the state of Morelos, Mexico. Samples were taken from the kidney of ornamental fish of *Carassius auratus* and *Pterophyllum scalare* species that showed signs of infection and lesions, as well as from the water of the ponds and aquaria, and from balanced fish feed. Important bacterial genera were isolated pertaining to Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae, Vibrionaceae and Pseudomonadaceae families. In the three samples *Vibrio furnissii* was identified as well as other species pathogenic for aquatic organisms and humans, such as *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio fluvialis*, among others. The signs and lesions recorded in the observed individuals corresponded to an ulcerative myodermonecrosis with septicemia, characteristic of vibriosis. On the other hand, *Vibrio furnissii* has been isolated from human patients with diarrhea in Asia, although their etiologic relation with the human host has not been proven yet. To the present, this

bacterium has not yet been associated with ornamental fish, therefore the present report is considered the first on its presence in water samples of aquaculture ponds, balanced fish feed and kidney samples of ornate fish. The origin of *V. furnissii* in the analyzed samples could be due to its presence as part of the bacterial flora of ornate fish imported from Asia. Identification of this bacterium is particularly difficult because of its similarity to *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis*. Based on the definition of its halotolerance, its ability to produce gas from glucose, and the type of colony growth in thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar, its differential identification could be established. Although the corresponding experiments to classify it as pathogenic for ornate fish have not been made, the capacity of this bacterium to hemolyze blood in a blood agar medium suggests its capacity to induce infection in its host. Due to its presence and the potential damage caused in aquaculture, it is necessary to establish a strategy for its fast identification and adequate treatment. The prevailing confusion among the mentioned species has given rise to the use of erroneous chemical treatments, such as the indiscriminate administration of antibiotics, which in turn lead to resistance, as well as to environmental contamination.

Key words: *Vibrio furnissii*, Aquaculture, Ornamental fish, Bacteria Pathogen.

INTRODUCCIÓN

Una de las principales características de la acuicultura intensiva es el manejo de altas densidades de organismos cultivados en un reducido volumen de agua, con el objeto de: obtener proteína de origen animal para consumo humano, harina de pescado para la elaboración de alimento de animales y reproducción de peces de ornato. En tales condiciones las enfermedades infecciosas representan una continua amenaza para la obtención de una producción exitosa (Pillay, 1982).

Tradicionalmente en nuestro país se ha desarrollado la acuicultura con fines de consumo humano, deportivo y esparcimiento, sin embargo, últimamente el acuarismo a cobrado fuerte interés como estrategia importante de ingreso de divisas.

El valor total del comercio de peces de ornato al mayoreo está estimado en 900 millones de dólares. El valor estimado de la reventa (menudeo) del pez de acuario, es del orden de 3000 dólares, mientras que el costo de pescado para consumo humano es de tres dólares por kg aproximadamente el precio de pez de ornato es de 300 dólares/kg. Los principales proveedores se localizan en los países asiáticos como: Singapur, Tailandia, Hong Kong, Japón y Malasia (Barnabe, 1989). Esto además de la movilización de grandes cantidades de peces de diferentes especies en manos de personal no calificado, sin conocimiento de la calidad sanitaria del producto, en diferentes condiciones de producción y en diferentes ambientes está implicando alto riesgo para la salud del personal que esta involucrada en la larga cadena de comercialización, sobre todo al ser manejada como mascota personal y la movilización conjunta de la carga bacteriana de los peces (Negrete y Romero 1999).

Una granja acuícola es un sistema abierto con tres tipos de ingresos importantes: el agua, el alimento para los organismos cultivados y los mismos organismos para cultivar. Desde el punto de vista sanitario, estos tres elementos son de suma importancia ya que junto con ellos pueden ingresar al sistema, elementos como contaminantes y microorganismos, que pueden llegar a perturbar las condiciones sanitarias de manejo y alterar el equilibrio salud- enfermedad a las poblaciones en el sistema y como consecuencia la enfermedad infecciosa puede instalarse.

Las enfermedades infecciosas en estos sistemas pueden ser causados por un desorden genético, una herida física, un desequilibrio en la nutrición y, o por factores abióticos tales como la contaminación, bioagresores o la combinación de estos (Kinkelin *et al.*, 1980).

Los vibrios son bacterias causantes de las infecciones que han ocasionado pérdidas económicas más severas en cultivos acuáticos de diferentes especies (Egudius, 1987). La vibriosis esta definida por una serie de signos externos como lesiones hemorrágicas sobre la piel de los peces infectados presentándose en la mayoría de los casos septicemia (Austin y Austin, 1987).

Monitoreos de las condiciones sanitarias de manejo de la producción de granjas acuícola del estado de Morelos, México (Negrete y Romero, 1998b), han llevado a aislar bacterias de ictiopatología comprobada, como puede ser el caso de diferentes géneros de *Aeromonas* y *Vibrio*, pero también se han aislado cepas bacterianas de identificación confusa entre *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio fluvialis*, por tal motivo el objetivo del presente estudio es determinar la presencia de *Vibrio furnissii* en: muestras de riñón de peces

cultivados de las especies pez dorado *Carassius auratus* y pez ángel *Pterophyllum scalare*; así como determinar su posible vía de ingreso al sistema de cultivo a través del análisis microbiológico de muestras del agua de los estanques en donde se cultivaban estos peces y del alimento que se les suministró.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el análisis de las condiciones sanitarias de producción en granjas piscícola en el estado de Morelos, México, en donde se reportó la manifestación de epizootias, se tomaron muestras de: agua de los estanques, del alimento balanceado y de peces de ornato (*Carassius auratus* y *Pterophylla scalare*) con manifestación de lesiones y signos de infección (Austin y Austin 1987; Michel, 1982 y Munro, 1982).

Las muestras de agua se tomaron a 50 cm de profundidad de cada uno de los cinco estanques de cultivo, con frascos lecheros de 250 ml con tapón de rosca de bakelita, con 1 ml de tiosulfato de sodio, esterilizados (APHA, 1992). Estas muestras se transportaron refrigeradas al laboratorio de Microbiología de la UAM-Xochimilco, Se efectuaron diluciones a la décima, se sembró .1ml de cada una de las diluciones, en placas de agar de Infusión Cerebro Corazón (ABHI) y agar de triptisoy-a caseína (ATS), este procedimiento se efectuó por triplicado (APHA, 1992).

Los pellets de alimento fueron extraídos de los empaques comerciales, con una cuchara estéril y se introdujeron a bolsas estériles Millipore, en donde fueron trasladadas al laboratorio. Se disolvió 1gr del alimento en 9 ml de agua destilada estéril, se efectuaron igualmente diluciones a la décima tres veces y se sembró .1 ml en placas de agar de BHI y TSA (APHA, 1992).

Diez peces en estadio juvenil entre 12 a 17 cm de cada una de las especies mencionadas, se extrajeron de los estanques de cultivo mediante una red de cuchara, todos aún vivos y manifestando signos y lesiones generales de infección, como nado irregular, boqueo en la superficie de los estanques de cultivo, aletas deshinchadas y sanguinolentas, sin escamas o con escamas erizadas y puntos hemorrágicos sobre la superficie del cuerpo. Se colocaron en una tina con agua y se anestesiaron durante 3 min con sulfometano de tricaina (0.1 g/L). Posteriormente se secó la superficie del cuerpo de cada uno de los peces con una gasa estéril y se desinfectó con alcohol. Después de

ser practicada la eutanasia, se efectuaron las disecciones haciendo un corte por arriba de la línea lateral y a lo largo del cuerpo, desde el opérculo y hasta el ano exponiendo de tal manera el riñón (Munro, 1982; Michael, 1982), con una asa bacteriológica estéril se tomó una muestra de riñón de los peces, se sembró por estría en placas de agar de BHI y TSA (Austin y Austin, 1987; Michel 1982 y Munro, 1982). Todas las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente fueron purificadas por resiembras sucesivas hasta obtener homogeneidad en la morfología del crecimiento de las colonias en caja, la pureza de las cepas se comprobó mediante la observación de homogeneidad de morfología celular a través microscopía óptica y se efectuó la tinción de Gram (APHA, 1992). Las cepas que tiñeron negativo, fueron identificadas presuntivamente usando: las técnicas de API-20E, API-20NE (Analítica Profile Index, 1997 y 1989). Las cepas silvestres aisladas de las muestras tomadas de la granja, de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio* que presentaron doble identificación, fueron identificadas nuevamente aplicando pruebas bioquímicas complementarias siguiendo los criterios de Dalsgaard *et al.*, (1988), Altewegg *et al.*, (1990), Colwell (1984), Lee *et al.*, (1981), Brenner *et al.*, (1984), Cowan (1974) y Hot *et al.*, (1994). De las 61 pruebas bioquímicas aplicadas (Tabla 2) para la identificación confirmativa se seleccionaron aquellas en las que las reacciones, para las especies *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, debían dar 100 % o 0% de probabilidades de reacción positiva o negativo, siendo: producción de gas a partir de glucosa, halotolerancia, tiosulfato citrato sales biliares-sucrosa y la reacción al vibriostático (Lee *et al.*, 1981, Brenner *et al.*, 1984) (Tabla 2). Todas las técnicas de identificación fueron igualmente aplicadas usando como control positivo cepas de colección de la American Type Culture Collection (ATCC): *Aeromonas hydrophila* (ATCC 356554), *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) y *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749). El perfil de *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii* se comparó con el perfil descrito por Lee *et al.*, (1981) y Brenner *et al.*, (1984) (Tabla 2).

RESULTADOS

Se aislaron un total de 149 muestras; 47 muestras de agua de los estanques de la granja visitada, 31 muestras de alimento balanceado y 71 muestras se

ESPECIES IDENTIFICADAS		
AEROMONADACEAE	API-20E	API 20NE
<i>Aeromonas hydrophila</i> 1-2	57	66
<i>Aeromonas salmonicida</i>	66	
<i>Aeromonas sal. salmonicida</i>		33
<i>Aeromonas sal. Achromogenes/masoucida</i>		30
<i>Aeromonas sobria</i>		6
<i>Aeromonas hydrophila/Vibrio fluvialis</i>	123	126
VIBRIONACEAE		
<i>Vibrio damsella</i>	3	3
<i>Vibrio cholerae</i>	9	9
<i>Vibrio fluvialis</i>	3	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	6	6
PSEUDOMONADACEA		
<i>Pseudomonas spp</i>	126	42
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0	36
<i>Pseudomonas diminuta</i>	0	9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12	30
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	3	6
<i>Psudomonas stutzeri</i>	0	3
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	0	6
ENTEROBACTERIACEAE		
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3	3
<i>Salmonella</i>	9	9
<i>Serratia plymuthica</i>	3	0
<i>Moraxella lacunata</i>	0	3
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	3
Not identified	24	9
TOTAL	444	444

Tabla 1. Bacterias aisladas de muestras del riñón de peces de ornato, alimento balanceado y de agua de estanques de cultivo de granjas piscícolas del estado de Morelos, México.

aislaron del riñón de 20 peces de especies de ornato de: 10 de *Carassius auratus* y 10 de *Pterophylla scalare*. Todos los peces que se extrajeron para obtener las muestras de riñón presentaron signos y lesiones externas de infección, así como comportamiento anormal, los signos y lesiones aparentes fueron: puntos hemorrágicos en la superficie del cuerpo, aletas sanguinolentas y rotas, falta de escamas, exoftalmia, boqueo en la superficie de los estanques, nado errático, desequilibrio, anorexia, y comportamiento nervioso y huido. Después de sacrificar a los individuos, previamente anestesiados, y antes de tomar la muestra bacteriológica, se observaron las siguientes lesiones: hemorragia interna generalizada a todos los órganos, líquido en el interior de toda la

cavidad, tejido de todos los órganos internos destruido, las branquias en general se presentaron pálidas.

De la identificación presuntiva, empleando los sistemas de identificación: API-20E y API-20NE, se lograron identificar en todas las muestras de los tres diferentes ambientes bacterias pertenecientes a cuatro familias bacterianas: Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae (Tabla 1)

Dentro del grupo de las *Aeromonas* se identificaron siete especies diferentes: *A. hydrophila* 1, *A. hydrophila* grupo 2, *A. salmonicida*, *A. sal. achromogrenes*, *A. sal. masoucida*, *A. sobria*. De un total de 126 cepas de *Aeromonas* identificadas hasta especie, 41 de ellas registraron perfil bioquímico correspondiente a *Aeromonas hydrophila* pero con posibilidades de ser *Vibrio fluvialis*. (Analytical Profile Index 1989) (Tabla 1). De la familia Vibrionaceae, se identificaron con ambos sistemas seis cepas las cuales corresponden a tres especies diferentes de vibrios: *V. cholerae* no toxigénico, *V. vulnificus* y *V. fluvialis*, ésta última especie fue identificada únicamente con el API-20E.

Se aislaron e identificaron con el API- 20NE, seis especies diferentes, de 47 cepas de *Pseudomonas*: *Ps. cepaciae*, *Ps. diminuta*, *Ps. fluorescens*, *Ps. malthophilia*, *Ps. stutzerii* y *Ps. vesicularis*; sin embargo, 42 de estas cepas solo lograron ser identificadas hasta género *Pseudomonas spp.*, con el API-20E.

Las seis especies de Enterobacterias que se identificaron por medio de ambos sistemas fueron: *Enterobacter agglomerans*, *Salmonella spp.*, *Listonella damsella*, *Serrathia plymuthica*, *Moraxella lacunata*, y *Shewanella putrefasciens*.

Como resultado de las pruebas de bioquímicas complementarias aplicadas a, 76 cepas con identificación confusa o imprecisa se identificaron como: *Aeromonas hydrophila* 30 cepas; *Vibrio fluvialis*: 15 cepas; y un tercer grupo de bacterias, 31 cepas, con un perfil diferente a las anteriormente mencionadas, correspondió a *Vibrio furnissii* (tabla 2).

DISCUSIÓN

El hecho de haber aislado e identificado en todas las muestras de los tres ambientes los mismos grupos bacterianos está indicando un proceso de contaminación

Prueba Complementaria	Reacción para <i>V. furnissii</i>		Reacción para <i>V. fluvialis</i>		Reacción para <i>A. hydrophila</i>	
	ATCC *	Silvestres %	ATCC *	Silvestres %	ATCC *	Silvestres %
Indol	(-) 11	(-)	(-) 13	(-)	(+) 85	(+)
Rojo de metilo	(+) 100	(+)	(+) 96	(+)	(+)	(+)
Voges-Proskauer	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(+) 80	V
Citrato-Simmons	(+) 100	(+)	(+) 93	(+)	(+) 85	(+)
H ₂ S en agar de Hierro Triple azúcar	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 80	(-)
Urea hidrolisis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fenilalanina	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lisina (Moller)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) v	(-)
Arginina (Moller)	(+) 100	(+)	(+) 93	(+)	(+) 97	(+)
Omitina (Moller)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Movilidad	(+) 89	(+)	(+) 70	(+)	(+) 100	(+)
Hidrólisis de gelatina	(+) 86	(+)	(+) 85	(+)	(+) 97	(+)
Malonato utilization	(-) 11	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Cas a partir de glucosa	(+) 100	(+) 33%	(-) 0	(-) 43%	(+) 100	(+) 24%
Producción de gas a partir de:						
D-Adonitol	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
L-Arabinosa	(+) 100	(+)	(+) 93	(+)	V	(+)
D-Arabitól	(+) 100	(+)	(+) 67	(+)	(+)	(+)
Cellobiosa	(-) 14	(-) 61%	(+) 30	(+) 38.5%	(-) 11	(-) 38.5%
Dulcitol	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-)	(-)
Glicerol	(+) 55	(+)	(-) 33	(+)	(+)	(+)
Inositol	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Maltosa	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)
D-Mannitol	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)
D-Mannosa	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)	(+) v	(+)
Melibiosa	(-) 11	(-) 0	(-) 3	(-) 0	(-) 3	(-) 0
α-CH ₃ -glucosido	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Rhamosa	(-) 45	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Salicin	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
D-Sorbitol	(-) 22	(-)	(-) 31	(-)	(-) 7	(-)
Escualina	(-) 0	(-)	(-) 23	(-)	(-) 7	(-)
Almidón	(+) 20	(+)	(+) 31	(+)	(+) 100	(+)
Crecimiento en NaCl %						
0%	(-) 0	(+)	(-) 0	(+)	(+) 100	(+)
1%	(+) 99	(+)	(+) 99	(+)	(+) 100	(+)
3%	(+) 99	(+) 80%	(+) 99	(+) 80%	(+) 7	(-) 20%
7%	(+) 78	(+) 80%	(-) 71	(+) 80%	(-) 0	(-) 10%
Crecimiento a °C						
4 °C	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 7	(-)
20 °C	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100
35 °C	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Caseina	(+) 31	(+)	(+) 26	(+)	(+) 100	(+)
DNAasa	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100
Luminisencia	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0
Quitina	(+) 0	(+)	(+) 31	(+)	(+) 100	(+)
Hæmollisis	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Eanol	(-) 5	(-)	(-) 22	(-)	(-) 5	(-)
Sucrosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Putrescina	(+) 100	(+) 93%	(+) 31	(-) 7%	(-) 0	(-) 7%
Citrullina	(-) 0	(-) 10%	(+) 31	(+) 90%	(-) 0	(-) 10%

Tabla 2. Reacciones bioquímicas de *V. furnissii* (ATCC 35016), *V. fluvialis* (NCTC11327), *A. hydrophila* (ATCC 35654) y cepas silvestres (+) 90-100% reaction positiva (-) 0-10% reaction negativa * ATCC: American Type Cultive Colection

cultivados de las especies pez dorado *Carassius auratus* y pez ángel *Pterophyllum scalare*; así como determinar su posible vía de ingreso al sistema de cultivo a través del análisis microbiológico de muestras del agua de los estanques en donde se cultivaban estos peces y del alimento que se les suministroo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el análisis de las condiciones sanitarias de producción en granjas piscícola en el estado de Morelos, México, en donde se reportó la manifestación de epizootias, se tomaron muestras de: agua de los estanques, del alimento balanceado y de peces de ornato (*Carassius auratus* y *Pterophylla scalare*) con manifestación de lesiones y signos de infección (Austin y Austin 1987; Michel, 1982 y Munro, 1982).

Las muestras de agua se tomaron a 50 cm de profundidad de cada uno de los cinco estanques de cultivo, con frascos lecheros de 250 ml con tapón de rosca de bakelita, con 1 ml de tiosulfato de sodio, esterilizados (APHA, 1992). Estas muestras se transportaron refrigeradas al laboratorio de Microbiología de la UAM-Xochimilco, Se efectuaron diluciones a la décima, se sembró .1ml de cada una de las diluciones, en placas de agar de Infusión Cerebro Corazón (ABHI) y agar de triptisoya caseína (ATS), este procedimiento se efectuó por triplicado (APHA, 1992).

Los pellets de alimento fueron extraídos de los empaques comerciales, con una cuchara estéril y se introdujeron a bolsas estériles Millipore, en donde fueron trasladadas al laboratorio. Se disolvió 1gr del alimento en 9 ml de agua destilada estéril, se efectuaron igualmente diluciones a la décima tres veces y se sembró .1 ml en placas de agar de BHI y TSA (APHA, 1992).

Diez peces en estadio juvenil entre 12 a 17 cm de cada una de las especies mencionadas, se extrajeron de los estanques de cultivo mediante una red de cuchara, todos aún vivos y manifestando signos y lesiones generales de infección, como nado irregular, boqueo en la superficie de los estanques de cultivo, aletas deshinchadas y sanguinolentas, sin escamas o con escamas erizadas y puntos hemorrágicos sobre la superficie del cuerpo. Se colocaron en una tina con agua y se anestesiaron durante 3 min con sulfometano de triclaína (0.1 g/L). Posteriormente se secó la superficie del cuerpo de cada uno de los peces con una gasa estéril y se desinfectó con alcohol. Después de

ser practicada la eutanasia, se efectuaron las disecciones haciendo un corte por arriba de la línea lateral y a lo largo del cuerpo, desde el opérculo y hasta el ano exponiendo de tal manera el riñón (Munro, 1982; Michael, 1982), con una asa bacteriológica estéril se tomó una muestra de riñón de los peces, se sembró por estría en placas de agar de BHI y TSA (Austin y Austin, 1987; Michel 1982 y Munro, 1982). Todas las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente fueron purificadas por resiembra sucesivas hasta obtener homogeneidad en la morfología del crecimiento de las colonias en caja, la pureza de las cepas se comprobó mediante la observación de homogeneidad de morfología celular a través microscopia óptica y se efectuó la tinción de Gram (APHA, 1992). Las cepas que tiñeron negativo, fueron identificadas presuntivamente usando: las técnicas de API-20E, API-20NE (Analítica Profile Index, 1997 y 1989). Las cepas silvestres aisladas de las muestras tomadas de la granja, de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio* que presentaron doble identificación, fueron identificadas nuevamente aplicando pruebas bioquímicas complementarias siguiendo los criterios de Dalsgaard *et al.*, (1988), Altewegg *et al.*, (1990), Colwell (1984), Lee *et al.*, (1981), Brenner *et al.*, (1984), Cowan (1974) y Hot *et al.*, (1994). De las 61 pruebas bioquímicas aplicadas (Tabla 2) para la identificación confirmativa se seleccionaron aquellas en las que las reacciones, para las especies *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii*, debían dar 100 % o 0% de probabilidades de reacción positiva o negativo, siendo: producción de gas a partir de glucosa, halotolerancia, tiosulfato citrato sales biliares-sucrosa y la reacción al vibriostático (Lee *et al.*, 1981, Brenner *et al.*, 1984) (Tabla 2). Todas las técnicas de identificación fueron igualmente aplicadas usando como control positivo cepas de colección de la American Type Cultive Colection (ATCC): *Aeromonas hydrophila* (ATCC 356554), *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) y *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749). El perfil de *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii* se comparo con el perfil descrito por Lee *et al.*, (1981) y Brenner *et al.*, (1984) (Tabla 2).

RESULTADOS

Se aislaron un total de 149 muestras; 47 muestras de agua de los estanques de la granja visitada, 31 muestras de alimento balanceado y 71 muestras se

ESPECIES IDENTIFICADAS		
AEROMONADACEAE	API-20E	API 20NE
<i>Aeromonas hydrophila</i> 1-2	57	66
<i>Aeromonas salmonicida</i>	66	
<i>Aeromonas sal. salmonicida</i>		33
<i>Aeromonas sal. Achromogenes/masoucida</i>		30
<i>Aeromonas sobria</i>		6
<i>Aeromonas hydrophila/Vibrio fluvialis</i>	123	126
VIBRIONACEAE		
<i>Vibrio damsella</i>	3	3
<i>Vibrio cholerae</i>	9	9
<i>Vibrio fluvialis</i>	3	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	6	6
PSEUDOMONADACEA		
<i>Pseudomonas spp</i>	126	42
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0	36
<i>Pseudomonas diminuta</i>	0	9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12	30
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	3	6
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0	3
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	0	6
ENTEROBACTERIACEAE		
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3	3
<i>Salmonella</i>	9	9
<i>Serratia plymuthica</i>	3	0
<i>Moraxella lacunata</i>	0	3
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	3
Not identified	24	9
TOTAL	444	444

Tabla 1. Bacterias aisladas de muestras del riñón de peces de ornato, alimento balanceado y de agua de estanques de cultivo de granjas piscícolas del estado de Morelos, México.

aislaron del riñón de 20 peces de especies de ornato de: 10 de *Carassius auratus* y 10 de *Pterophylla scalare*. Todos los peces que se extrajeron para obtener las muestras de riñón presentaron signos y lesiones externos de infección, así como comportamiento anormal, los signos y lesiones aparentes fueron: puntos hemorrágicos en la superficie del cuerpo, aletas sanguinolentas y rotas, falta de escamas, exoftalmia, boqueo en la superficie de los estanques, nado errático, desequilibrio, anorexia, y comportamiento nervioso y huidizo. Después de sacrificar a los individuos, previamente anestesiados, y antes de tomar la muestra bacteriológica, se observaron las siguientes lesiones: hemorragia interna generalizada a todos los órganos, líquido en el interior de toda la

cavidad, tejido de todos los órganos internos destruido, las branquias en general se presentaron pálidas.

De la identificación presuntiva, empleando los sistemas de identificación: API-20E y API-20NE, se lograron identificar en todas las muestras de los tres diferentes ambientes bacterias pertenecientes a cuatro familias bacterianas: Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae (Tabla 1)

Dentro del grupo de las *Aeromonas* se identificaron siete especies diferentes: *A. hydrophila* 1, *A. hydrophila* grupo 2, *A. salmonicida*, *A. sal. achromogenes*, *A. sal. masoucida*, *A. sobria*. De un total de 126 cepas de *Aeromonas* identificadas hasta especie, 41 de ellas registraron perfil bioquímico correspondiente a *Aeromonas hydrophila* pero con posibilidades de ser *Vibrio fluvialis*. (Analytical Profile Index 1989) (Tabla 1). De la familia Vibrionaceae, se identificaron con ambos sistemas seis cepas las cuales corresponden a tres especies diferentes de vibrios: *V. cholerae* no toxigénico, *V. vulnificus* y *V. fluvialis*, ésta última especie fue identificada únicamente con el API-20E.

Se aislaron e identificaron con el API- 20NE, seis especies diferentes, de 47 cepas de *Pseudomonas*: *Ps. cepaciae*, *Ps. diminuta*, *Ps. fluorescens*, *Ps. malthophilia*, *Ps. stutzerii* y *Ps. vesicularis*; sin embargo, 42 de estas cepas solo lograron ser identificadas hasta género *Pseudomonas spp.*, con el API-20E.

Las seis especies de Enterobacterias que se identificaron por medio de ambos sistemas fueron: *Enterobacter agglomerans*, *Salmonella spp.*, *Listonella damsella*, *Serratia plymuthica*, *Moraxella lacunata*, y *Shewanella putrefaciens*.

Como resultado de las pruebas de bioquímicas complementarias aplicadas a, 76 cepas con identificación confusa o imprecisa se identificaron como: *Aeromonas hydrophila* 30 cepas; *Vibrio fluvialis*: 15 cepas; y un tercer grupo de bacterias, 31 cepas, con un perfil diferente a las anteriormente mencionadas, correspondió a *Vibrio furnissii* (tabla 2).

DISCUSIÓN

El hecho de haber aislado e identificado en todas las muestras de los tres ambientes los mismos grupos bacterianos está indicando un proceso de contaminación

Prueba Complementaria	Reacción para <i>V.furnissii</i>		Reacción para <i>V.fluviatilis</i>		Reacción para <i>A. hydrophila</i>	
	ATCC *	Silvestres %	ATCC *	Silvestres %	ATCC *	Silvestres %
Indol	(-) 11	(-)	(-) 13	(-)	(+) 85	(+)
Rojo de metilo	(+) 100	(+)	(+) 96	(+)	(+)	(+)
Voges-Proskauer	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(+) 80	V
Citrato-Simmons	(+) 100	(+)	(+) 93	(+)	(+) 85	(+)
H ₂ S en agar de Hierro Triple azúcar	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 80	(-)
Urea hidrolisis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fenilalanina	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lisina (Moller)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) v	(-)
Arginina (Moller)	(+) 100	(+)	(+) 93	(+)	(+) 97	(+)
Omitina (Moller)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Movilidad	(+) 89	(+)	(+) 70	(+)	(+) 100	(+)
Hidrólisis de gelatina	(+) 86	(+)	(+) 85	(+)	(+) 97	(+)
Malonato utilization	(-) 11	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Cas a partir de glucosa	(+) 100	(+) 33%	(-) 0	(-) 43%	(+) 100	(+) 24%
Producción de gas a partir de:						
D-Adonitol	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
L-Arabinosa	(+) 100	(+)	(+) 93	(+)	V	(+)
D-Arabitól	(+) 100	(+)	(+) 67	(+)	(+)	(+)
Cellobiosa	(-) 14	(-) 61%	(+) 30	(+) 38.5%	(-) 11	(-) 38.5%
Dulcitol	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-)	(-)
Glicerol	(+) 55	(+)	(-) 33	(+)	(+)	(+)
Inositol	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Maltosa	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)
D-Mannitol	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)
D-Mannosa	(+) 100	(+)	(+) 100	(+)	(+) v	(+)
Melibiosa	(-) 11	(-) 0	(-) 3	(-) 0	(-) 3	(-) 0
α-CH ₂ -glucosido	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Rhamosa	(-) 45	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
Salicin	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)
D-Sorbitol	(-) 22	(-)	(-) 31	(-)	(-) 7	(-)
Escualina	(-) 0	(-)	(-) 23	(-)	(-) 7	(-)
Almidón	(+) 20	(+)	(+) 31	(+)	(+) 100	(+)
Crecimiento en NaCl %						
0%	(-) 0	(+)	(-) 0	(+)	(+) 100	(+)
1%	(+) 99	(+)	(+) 99	(+)	(+) 100	(+)
3%	(+) 99	(+) 80%	(+) 99	(+) 80%	(+) 7	(-) 20%
7%	(+) 78	(+) 80%	(-) 71	(+) 80%	(-) 0	(-) 10%
Crecimiento a °C						
4 °C	(-) 0	(-)	(-) 0	(-)	(-) 7	(-)
20 °C	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100
35 °C	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Caseina	(+) 31	(+)	(+) 26	(+)	(+) 100	(+)
DNAasa	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100	(+) 100
Luminiscencia	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0
Quitina	(+) 0	(+)	(+) 31	(+)	(+) 100	(+)
Hæmollisis	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Eanol	(-) 5	(-)	(-) 22	(-)	(-) 5	(-)
Sucrosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Putrescina	(+) 100	(+) 93%	(+) 31	(-) 7%	(-) 0	(-) 7%
Citrullina	(-) 0	(-) 10%	(+) 31	(+) 90%	(-) 0	(-) 10%

Tabla 2. Reacciones bioquímicas de *V. furnissii* (ATCC 35016), *V. fluviatilis* (NCTC11327), *A. hydrophila* (ATCC 35654) y cepas silvestres (+) 90-100% reaction positiva (-) 0-10% reaction negativa * ATCC: American Type Cultive Colection

a-NH ₂ - valerato	(-) v 63	(-)	(-) 17	(-)	(-) 0	(-)
Propionato	(+) 0	(+)	(-) 27	(-)	(-) 0	(-)
Thiosulphate citrate bile sales sucrose	(+)Amarillo	(+)Amarillo	(+)Amarillo	(+)Amarillo	(+)Verde	(+)Verde
Aeromonas agar	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Pseudomonas agar	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NO ³⁻ - NO ²⁻	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Oxidasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Vibriostatico 0/129 sensibilidad 10ugr	(-) 0	(-)	(-) 31	(-)	(+)	(+)
Glucoronato	(-) 7	(+)	(+) 94	(+)	(-) 10	(-)
o-nitrophenyl-b- galactopyranoside	(-) 35	(-)	(-) 40	(-)	(-)	(-)
Tween 80	(+) 26	(+)	(+) 31	(+)	(+)	(+)

Continuación de la Tabla 2. Reacciones bioquímicas de *V. furnissii* (ATCC 35016), *V. fluvialis* (NCTC11327), *A. hydrophila* (ATCC 35654) y cepas silvestres (+) 90-100% reacción positiva (-) 0-10% reacción negativa * ATCC: American Type Culture Collection

cruzada. La presencia de las especies identificadas tanto presuntiva como confirmativamente en el riñón de los peces refleja la microflora bacteriana presente también en el ambiente acuático (Austin y Austin, 1987). La carga bacteriana aislada del alimento balanceado lo señala como una vía de ingreso de contaminación bacteriana al sistema de cultivo, ya que al ser preparado con harina de pescado, le infiere una carga de patógenos de peces de origen marino como son las especies de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio* (Negrete y Romero, 1998b).

El cuadro clínico que manifestaron los peces correspondió a una respuesta arquetípica septicémica, establecida por Roberts y Bromage (1993), la cual es particularmente asociada con bacterias Gram (-) muy agresivas, reconocidas principalmente por presencia extendida a todos los órganos del individuo infectado, exoftalmia con edema periorbital y manchas hemorrágicas.

Las bacterias aisladas en el presente estudio que se asocian tradicionalmente con el cuadro clínico anteriormente descrito son en principio: *Aeromonas* y *Vibrio*.

De este primer grupo se aislaron e identificaron *Aeromonas* no-móviles y móviles las cuales se encuentran genéticamente relacionadas según McInnes *et al.*, (1979); dentro de las primeras se identificaron: *A. sal. salmonicida*, y *A. sal. mausocida* / *achromogenes*, dado que en la base de datos del API-20NE aparece esta agrupación de las *Aeromonas* no-móviles, coincidiendo con la propuesta de McCarthy y Roberts (1980), pero sin incluir el tercer grupo: *A. salmonicida nova*. Aunque McInnes *et al.*, (1979)

consideran que el grupo de *Aeromonas* no-móviles es un grupo muy homogéneo por lo que la división entre estos tres grupos no es necesaria dada la alta homología (95%-100%), entre el DNA de los tres subespecies propuesta, coincidiendo con las conclusiones de Popoff y Lallier (1984) respecto a la relación serológica entre los miembros de este grupo.

Las especies de *Aeromonas* móviles identificadas en el presente trabajo, e incluidas en la base de datos del API-20E, fueron: *Aeromonas hydrophila* grupo 1, *Aeromonas hydrophila* grupo 2, en el API-20NE se incluyen únicamente *Aeromonas hydrophila /caviae* y *Aeromonas sobria*, las cuales corresponden respectivamente. Esta división de las *Aeromonas* móviles corresponde a la propuesta por Popoff (1984) quien reconoce dos especies de *Aeromonas*: *A. caviae* (referida como *A. hydrophila* biotipo anaerogenes) y *A. sobria*.

Aunque Fanning *et al.*, (1985) después de una hibridación adicional que realiza con representantes de todos los grupos hibridados de DNA, definidos por Poppof *et al.*, (1981); confirma que todas las cepas de *Aeromonas* están relacionadas muy cercanamente y que las *Aeromonas* móviles podrían estar divididas dentro de por lo menos 10 diferentes grupos de DNA hibridado, coincidiendo con la clasificación del grupo de *Aeromonas* que registran Holt *et al.*, (1994): como aeromonas no-móviles; *A. sal salmonicida*, *A. sal. achromogenes* y *A. sal. masoucida*, *A. sal. smithia* y *A. media* y como aeromonas móviles; *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. sobria*, *A. eucrophila* y *A. veronii*

Aeromonas salmonicida ha sido asociada con enfermedades infecciosas en organismos acuáticos

reconocida como: furunculosis y con infecciones intestinales en pacientes humanos (Roberts, 1993).

Aeromonas sobria, *A. hydrophila* y *A. caviae* han sido aisladas de diferentes especies de organismos acuáticos: langostino de agua dulce, ranas, caracoles y caimanes; con signos de septicemia bacterial (De Figuereido y Plumb 1971; Gibbs 1963; Head 1969 y Shotts *et al.*, 1972), y se les ubica como patógenos oportunistas (Popoff y Veron, 1976). En conclusión, este género ha sido tradicionalmente ubicado dentro de la familias Vibrionaceae Sin embargo, como resultado de estudios de genética molecular y dada su importancia como grupo de especies patógenas de organismos acuáticos, Colwell *et al.*, (1986), proponen fuera removido de esta posición para ubicarlo como una familia: Aeromonadaceae. Sin embargo, según Farmer III *et al.*, (2001) especies de esta familia como *A. hydrophila* pueden ser confundidas con especies de la familia Vibrionaceae como: *Vibrio cholerae* y *Vibrio fluvialis*. De esta manera en el presente estudio 41 y 37 de las cepas identificadas con el API-20E y con el API-20NE respectivamente, presentaron la posibilidad de ser *V. fluvialis*, especie incluida dentro de la base del primero de los sistemas de identificación, mas no así en el segundo de ellos.

Por tal motivo se decidió aplicar la segunda fase de identificación con pruebas complementarias, diseñadas principalmente con base a Lee *et al.* (1981), quienes reportan haber aislado bacterias las cuales excepto por su halotolerancia, son parecidas a las *Aeromonas*. Estas bacterias eran referidas tradicionalmente como *Aeromonas*- marinas por haber sido aisladas de ambientes estuarinos, y conformaban el nombrado grupo F (Furniss *et al.*, 1977). Al conformar dos biovariedades I y II presentes en ambientes acuáticos, particularmente la segunda biovariedad, son denominadas *V. fluvialis*. La biovariedad I fue aislada por Lee *et al.*, (1981) de muestras clínicas de pacientes con diarrea, Negrete y Romero (1998 a y b) la reportan como patógena de peces *Cyprinus carpio* y comprueban experimentalmente su capacidad de provocar infección en la misma especie.

Como consecuencia de la segunda fase de identificación, se comprueba la presencia de *V. fluvialis* biovariedad I, en 15 cepas procedentes de muestras de riñón de los peces *Carassius auratus* y *Pterophylla sclare*, con los signos y lesiones de infección en un principio descritos.

El grupo de 31 cepas que presentaron crecimiento diferente a *A. hydrophila* por su crecimiento en: TCBS de colonias amarillas de 2-3 mm, con viraje del medio a amarillo; en las diferentes concentraciones salinas (0%, 1%, 3%, 5% y 8%) probadas; y diferentes a *Vibrio fluvialis* por producción de gas en rojo fenol con glucosa; criterios de Brenner *et al.*, (1983) (Tabla 2), fueron identificadas como *Vibrio furnissii*. Los caracteres escualina, citrulina, celobiosa, glucoronato y putrecina, propuestos por Lee *et al.*, (1981) para distinguir entre las biovariedades I y II de *V. fluvialis*, no poseen un 100% de pruebas (+), por lo que en el presente estudio se utilizaron únicamente como criterio para sustentar la identificación de *V. furnissii* (Tabla 2).

Esta bacteria al haber sido aislada originalmente junto con *Vibrio cholerae* de las misma muestras clínicas de pacientes humanos con diarrea, no puede ser asociada todavía con infecciones intestinales en humanos (Farmer *et al.*, 2001). Sin embargo, el 84% de las cepas identificadas en el presente estudio como *V. furnissii*, resultaron crecimiento (+) en agar sangre, lo que indica la capacidad de estas bacterias de hemolizar sangre, comprobándose de esta manera su capacidad como patógenos (Tabla 2).

Se puede considerar que el presente estudio es el primer reporte de *V. furnissii*, como patógeno de peces de ornato, al haber sido aislado de muestras de riñón de individuos con signos, lesiones y comportamiento característicos de vibriosis, sin embargo, al no ser el único patógeno de peces aislado en las muestras, se debe comprobar experimentalmente la relación etiológica de esta bacteria con su hospedero, con inóculos elaborados a partir de cultivos puros, para describir específicamente el cuadro clínico.

Las especies de *Pseudomonas* aisladas en el presente trabajo e implicadas con infecciones de organismos acuáticos son *Pseudomonas fluorescens* asociada a *Oncorhynchus rhodurus* en Japón (Hatai *et al.*, 1975), y *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas cepacia*, han sido reportadas como patógenos importantes y de alto riesgo para cultivos acuáticos (Negrete y Romero 1998 a ; Wakabayashi y Egusa, 1972). El agente casual de epizootias en enfermedades en el pez conejo (*Sigamurus rivulatus*) ha sido identificado como *Ps. putrefasciens* (Saeed *et al.*, 1990), ésta bacteria fue nombrada anteriormente *Shewanella putrefasciens* (Lee *et al.*, 1977;

McDonnell y Colwell,1985). La mayoría de las *Pseudomonas* son usualmente asociadas con condiciones de estrés ambiental e inapropiado manejo de la producción (Bullock y McLauhlin ,1970).

Una de las enterobacterias más importantes desde el punto de vista de salud pública es *Salmonella*, causante de graves infecciones intestinales en el ser humano. La especie de esta bacteria dependerá de la especie que infecte y de esto dependerá los serotipos así puede encontrarse serotipos de humanos, aves y puercos (Le Minor, 1981). El serotipo de la *Salmonella* aislada en el presente estudio no fue posible especificar, aunque bien podría corresponder a cualquiera de los anteriores, ya que se encontraron animales como vacas, caballos y puercos dentro de los estanques en donde se llevaron a cabo los muestreos y bien pudieron contaminar los estanques por fecalismo. El paso de aguas negras por las inmediaciones de estas granjas, bien pudo ser otra de las fuentes de contaminación por estos patógenos.

Serrathia plymuthica aislada también en las muestras, fue reportada por Nieto *et al.*, (1990) en cultivos de trucha arco iris, en España. Negrete y Romero(1998 a y b) la aíslan de cultivos de *Cyprinidos* y *Salmonidos* y la confirman como patógeno oportunista en condiciones inadecuadas de cultivo

Consideramos que este estudio constituye el primer reporte de *Vibrio furnissii* asociado con polibacteriosis en peces de ornato, debido a que fue aislado del riñón de individuos con signos y lesiones de infección características de vibriosis. Sin embargo, y dado que se aisló junto con otras bacterias de riesgo ictiopatógenico, la relación etiológica de esta patógeno con su hospedero se debe probar y establecer experimentalmente a través del uso de inóculos preparados de cultivos puros, y de esta manera definir específicamente tanto el cuadro clínico que genera como su $D_{50}L$.

LITERATURA CITADA

- Analytical Profile Index, 1997. API-20 E Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria, 4th. Edition BioMerioux, France, 130 p.
- APHA, 1992. Standard Methods for examination of water and wastewater, 17th De. American Public Health Association, Washington, D.C. pp. 583-589.
- Altewegg, M., Steigerwalt, A.G., Altewegg-Bissig, A., Luth, J., Y-Hottenstein y Brenner D.J. 1990 Biochemical Identification of Aeromonas Genospecies Isolated from Humans. American Society for Microbiology. Vol. 28 (2):258-264.
- Austin, B y Austin, D.A. 1987. Bacterial fish pathogen diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood Ltd. England. London. England, 364 pp
- Bernabe, G., 1989. Acuaculture. Ed. Omega, Vol. I. Barcelona, 675p.
- Brenner, D.J., Hickman-Brenner, F.W., Lee, J.V., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Hollis, G.G., Farmer III, J.J., Weaver, R.E. y Seidler, R. J., 1983. *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. J. Clin. Microbiol. 18: 816-824.
- Bullock, G. L., y Mc Laughlin, J.J.A., 1970. Advances in the knowledge concerning bacteria pathogenic to fishes (1954-1986 pp). En: S.F. Sniezko (Comps.). *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfish*. American Fisheries Society Special Publication, 5. Washington . D.C.
- Colwell, R.R. y Grimes D.J., 1984. *Vibrio* diseases of marine populations. Helgol. Meeresunters., 73: 73-76.
- Colwell, R.R., McDonnell, M.T. y De Ley, J. 1986 Proposal to recognize the family Aeromonadaceae. Fam. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 36:473-477.
- Colwell, R.R., 1984 *Vibrios in the environment*. John Wiley and Sons, New York
- Cowan, S.T. 1974 Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.

- Dalsgaard, I., Gudmundsdottir, B.K., Helgason, S., Hoie, S., Thoresen, O.F., Wichardt y Wiklund T., 1998 Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: inter-laboratory evaluation and harmonization of methods. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 999-1006.
- De Figueredo, J. y Plumb, J.A., 1971. Virulence of different isolated of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture*, 11: 349-354.
- Egudius, E., 1987. Vibriosis: Pathogenicity and Pathology. A Review. *Aquaculture*, 67, 15-28.
- Fanning, G.R., Hickman-Brenner, F.W., Farmer III, J.J. y Brenner D.J., 1985. DNA relatedness and phenotypic analysis of the genus *Aeromonas*. Abstract C116, p. 319. In: Abstract in the Manual Meeting of the American Society for Microbiology. ASM, Washington.
- Farmer III, J.J., Arduino, M.J. y Hickman-Brenner F.W., 1999. The Genus *Aeromonas* and *Pleisomonas*. Cap 158. 3012-3045 pp. En *Prokariotes*
- Furniss, A.L., Lee, J.V. y Donovan, T.S. 1977. Group F, a new vibrio?. *Lancet* ii, 565-566.
- Gibbs, E.L., 1963. An effective treatment for red-legs diseases in *Rana pipiens*. *Laboratory Animal, Care* 13: 781-783.
- Hatai, K., Egusa, S., Nakajami, M y Chikajata, K., 1975. *Pseudomonas* as a fish pathogen. *Bulletin of the Japanese of Scientific Fisheries* 41: 1203-1207.
- Head, A.R., 1969. *Aeromonas hydrophila* in leukoderma syndrome of *A. chatina fulica*. *Malacologia*. 9: 43.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Dtalley J.T., y Williams S.T., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Lee, J.V., Shread, P., Furniss, A.I. y Bryant, T.N., 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov. (Synonym. Group F. *Vibriosis* EF6) *Journal Applied Bacteriology*. 50: 73-94.
- Le Minor, L., 1981. The genus *Salmonella*. pp1259. En Starr, P.M., Stop, H., Tupper, H., Balows, G.H. y Scheler H.G. (Comps.). *The Prokaryotes. A Handbook Isolation and Identification of Bacteria*. Vol.II, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York.
- Mc Donnell, H.T. y Colwell, R.R., 1985. Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendation for two new genera *Listonella* and *shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology* 6: 171-182.
- Mc Innes, J.H., Trust, T.J. y Crosa, J.M., 1979. Deoxyribonucleic acid relationship among the genus *Aeromonas*. *Canadian Journal of Microbiology* 25: 579-586.
- McCarthy, D.H. y Roberts, J.R., 1980. Furunculosis in fish. The present state of our knowledges. pp. 293-291. In M.R. Droop y H.W. Jannasch (Comps.). *Advances in aquatic Microbiology*. Academic Press. London.
- Michel, C., 1980. A standardized of experimental furunculosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Canadian Journal Fish Aquatic Sciences* 37, 746-750.
- Michel, C., 1982. Development of bacteria in fish and in water during a standardized experimental infection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with *Aeromonas salmonicida*. En Roberts R-J, *Microbiological diseases of fish*. Academic Press. London, pp. 375-329.
- Munro, A.L.S., 1982. The pathogenesis of bacterial diseases of fishes. En Robles R-J. *Microbiol diseases of fishes*. Academic Press, London, pp. 131-149.
- Negrete, R.P. y Romero, J.J., 1999. Presencia de bacterias patógenas en peces de ornato. *Rev Hidrobiológica*. 9(2): 85-94.
- Negrete, R.P. y Romero, J.J., 1998 a. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuicolas en los estados de México y Morelos. *Rev. Hidrobiológica*, 8(1): 43-54.
- Negrete, R.P. y Romero, J.J., 1998 b. Inducción de bacteriosis en *Cyprinus carpio*. Con bacterias aisladas de organismos enfermos cultivados en granjas piscícolas. *Revs. Hidrobiológica*, 8(2): 1-10.

- Nieto, T.P., López L.R., Santos, Y., Núñez, S y Toranzo A.E., 1990. Isolation of *Serratia plymuthica* as a an oportunistic pathoogen in rainbow troust, *salmo gairdneri* . Richardson Journal of Fish Diseases 13: 175-177.
- Pillay , T.V.R., 1982. Planning of Aquaculture Development an Introductory Guide. Fishing News Book, Oxford. 681 p.
- Popoff, M., 1984. Genus III. *Aeromonas* pp. 345-348. En : N.R. Krieg(Comp). Bergey ´s Manual of Sistematic Bacteriology, Vol. I. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Popoff, M. y Lallier R., 1981. Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas* . Methods in Microbiol, 16: 127-145.
- Popoff, M., Coynauly, C., Kiredjian, M. y Lemelin, M., 1981. Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. Curr. Microbiol. 5:109-114.
- Popoff, M. y Veron, M., 1976. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrphila* , *Aeromonas punctata*, group. Journal of General Microbiology 94: 11-22
- Roberts, R.J, 1993. Introduction fish. En: Inglis. W. Roberts R.J. y Bromage R.N. Bacterial diseases of fish. Academic Press. London. pp. 1-20.
- Saeed, M.D., Alamondi, M.M.M. y Al- Harbi, A.H., 1990. Hithopathology of *Pseudomonas putrefasciens* associated with diseases in cultures rabbit fish *Sigmus rivulatus* (Forkai). Journal of Fish Diseases 13: 417-422.
- Shotts, E.B., Games J.L., Martin, L. y Prestwood A.K., 1972. *Aeromonas* induced death among fish in a eutrophic inland lake. Journal of the American Medical Associated 162: 603-607.
- Wakabayashi, H. y Egusa, S., 1972. Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from a epizootic of pound-cultured eels (*Anguilla japonica*). Bulletin Japanese Society Sciences Fish., 38: 577-587.