

Aislamiento de bacterias asociadas con infecciones en el cultivo de ajolote: *Ambystoma mexicanus*

Pilar Negrete Redondo¹
y Jorge M. Romero Jarero²

¹Universidad Autónoma Metropolitana. Canal Nacional 1100, Col. Villa Quietud. Fax: 723-5469

²Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria. Fax: 616-0748

Negrete Redondo, P. y J. M. Romero Jarero, 1999. Aislamiento de bacterias asociadas con infecciones en el cultivo de ajolote: *Ambystoma mexicanus*. *Hidrobiológica* 9 (1): 9-14.

RESUMEN

Se efectuó el aislamiento, purificación e identificación de bacterias a partir de abscesos (con aspectos de tumor) desarrollados sobre diferentes zonas del cuerpo de ajolotes (*Ambystoma mexicanus*), cultivados en el Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Xochimilco. Al mismo tiempo se analizó la calidad bacteriológica: del agua de las tinajas en donde se crían estos organismos, del agua del canal de donde se surten (Pista de Canotaje Virgilio Uribe) y de la dieta viva que se les suministra a los ajolotes. Se identificaron bacterias de alto riesgo para la Acuicultura y la salud pública como: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas cepaciae* y *Pseudomonas fluorescens*, entre otras. Estas bacterias se consideran oportunistas, dadas las condiciones sanitarias en el manejo de éste cultivo, mismas que se establecen y analizan en el presente estudio, y probables agentes etiológicos del cuadro infeccioso que manifestaron los ajolotes, caracterizado como dermatonecrosis focal con ulceraciones.

Palabras clave: Ictiopatología, salud pública, *Ambystoma mexicanus*, bacterias.

ABSTRACT

Was isolated, purified and identified bacteria from tumor in some localized zones of the body of *Ambystoma mexicanus*, (Ajolote mexican amphibian). Hatched in «CIBAC» of Xochimilco and the same time was analyzed the water quality from the bacteriological point of view in the hatcheries, the water supply and in the live feed. Were characterized and identified the follow bacteria *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas cepaciae* and *Pseudomonas fluorescens* all of them implicate a high risk in the aquaculture and public health.

Key Words: Ictiopatology, public healthy, *Ambystoma mexicanus*, bacterias.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas son el principal problema al que se enfrentan las colonias de ajolote; *Ambystoma mexicanus*, tanto de vida libre como en cultivo. Un brote severo puede destruir en pocas semanas una colonia, menos severo puede impedir su crianza (Duhon, 1989).

El ajolote vive en ambientes líquidos de aguas fangosas, estancadas y extremadamente bajas en oxígeno.

Son organismos que deben mantenerse alejados unos de otros ya que existe la posibilidad de que se muerdan y lleguen a lastimarse de ésta forma las patas y las branquias, o bien, arrancarse trozos de cola. Esto no implica desde el punto de vista anatomofisiológico una pérdida debido a la capacidad de regeneración de tejidos que tienen estos individuos, sin embargo, desde el punto de vista zoonosanitario implica la alteración de la integridad de el epitelio y de la capa muscular que al romperse como primeras barreras de defensas que presenta el hospedero contra la invasión de

microorganismos patógenos presentes en el ambiente, se propicia el inicio de un proceso infeccioso (Roberts y Bromage, 1993).

Al ser los ajolotes fuente alimenticia para el ser humano, específicamente en zonas endémicas como es la meseta central de México, y estar infectados de bacterias como: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* y Enterobacterias implica también un problema de salud pública.

El crecimiento urbano en éstas zonas ha ocasionado la disminución y desaparición de hábitats que albergan a esta especie (Armstrong y Malacinski, 1989), o bien, su contaminación principalmente con aguas de desecho agropecuario, industrial y urbano. Como consecuencia la aparición de nuevas enfermedades en el *A. mexicanus*, hace temer procesos infecciosos desconocidos que lo lleven a su extinción.

Debido a la aparición de abscesos en diferentes partes del cuerpo de *A. mexicanus*, junto con la manifestación de signos de infección en el cultivo de estos organismos en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Xochimilco; se efectuó la caracterización diagnóstica del cuadro clínico manifiesto, con el objetivo de establecer su etiología. Al mismo tiempo, se analizó la calidad bacteriológica del agua y de la dieta que se les suministra a los ajolotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se efectuó un muestreo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Xochimilco (CIBAC). Se obtuvieron diez organismos que presentaron abscesos en diferentes zonas del cuerpo de individuos adultos de ajolote *Ambystoma mexicanus*, de ambos sexos; de agua de las tinas en donde se cultivaban los ajolotes, de la cisterna, de la pista de canotaje Virgilio Uribe de donde se surte el CIBAC y del alimento vivo, lombriz de tierra y corazón de res, que se les proporciona a los ajolotes.

Diez ajolotes se mantuvieron en observación durante ocho días, para el registro de los cambios en el comportamiento de los individuos así como signos y lesiones que se manifestaron. Posteriormente se les sacrificó, colocándolos en un cristizador con algodón empapado de cloroformo, se desinfectó con fenol al 10% la zona del absceso, se introdujo en éste una jeringa estéril de 3 ml y se extrajo el líquido contenido en su interior.

Se efectuó la necropsia en campo estéril, con una asa bacteriológica estéril se tomó una muestra de riñón y de sangre de cada uno de los individuos (Michel 1980), se

sembró en placas de agar cerebro-corazón (BHI) y de agar Triptisoya caseína (TSA) y se dejó crecer por una semana a temperatura ambiente. Una vez que se obtuvo crecimiento de colonias, se procedió a purificar las cepas a través de las resiembras sucesivas a partir de una sola colonia aislada en placas de BHI y TSA, hasta lograr obtener crecimiento puro, lo que se comprobó por crecimiento homogéneo de la forma de las colonias y por la homogeneidad celular en frotis, para esto último se usó microscopio de contraste de fases, se efectuó tinción de Gram y se identificaron por la técnica API 20E y API 20 NE (Analytical Profile Index, 1989).

Las muestras de agua de tina, cisterna y pista de canotaje, se tomaron en frascos lechero de vidrio de 250 ml con tapa de rosca de baquelita estériles con 1 ml de tiosulfato de sodio. Los frascos se introdujeron cerrados, destapándose a una profundidad de 50 cm: de las tinas de cultivos, de la cisterna y de la pista de canotaje, se llenaron completamente sin dejar burbujas de aire, se cerraron dentro del agua. Se guardaron en hielo para su traslado al laboratorio en donde se procesaron inmediatamente (APHA, 1992).

De los frascos se tomó 0.1 ml de cada uno, se esparció con una varilla de vidrio acodada en placas de agar de BHI y TSA, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 24 horas, se purificaron, se efectuó tinción de Gram y se identificó las cepas aisladas siguiendo el mismo procedimiento indicado para las colonias aisladas del riñón, sangre y abscesos.

Las muestras de alimento vivo se tomaron directamente de la composta en donde crían las lombrices de tierra. Con guantes y pinzas estériles se guardaron en bolsas de plástico estériles Millipore. Se procedió igual con las muestras de corazón de res, de esa forma se trasladaron al laboratorio para ser procesadas.

Se pesó 1 gr de lombriz de tierra o de corazón de res, se colocó en tubos de ensayo con 9 ml de infusión de BHI y se licuó en un homogenizador marca Virtiz a 1000 r.p.m., hasta su completa homogeneización. En campo estéril y con una pipeta estéril se extrajo 1 ml del homogeneizado, se sembró esparciéndolo con una varilla de vidrio acodada estéril en placas de BHI y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez obtenido crecimiento de colonias se procedió a su purificación siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad, se efectuó tinción de Gram y de igual forma se identificaron las cepas.

Para establecer las condiciones sanitarias de manejo de cultivos de este organismo se diseñó una guía de observaciones contemplando los factores que definen las condiciones del manejo del centro, desde la perspectiva de

la Sanidad Acuícola, para lo cual se siguieron los criterios de Negrete y Romero (1997); Piper *et al.*, (1992) y Contreras (1988)

RESULTADOS

Los diez ajolotes, *A. mexicanus*, manifestaron durante el periodo de observación, indistintamente del sexo, los siguientes signos y alteraciones del comportamiento: oscurecimiento de la piel, falta de apetito, pérdida de peso, excesiva formación de moco, irritabilidad, aislamiento, marcada preferencias de permanecer en los rincones y zonas oscuras de las tinas, presencia de abscesos en diferentes zonas del cuerpo de consistencia suave al tacto, al ser presionadas se hundían con facilidad, de la punción se obtuvo una secreción viscosa, espesa de color gris.

Las necropsias efectuadas a los diez individuos manifestaron inflamación generalizada a todos los órganos y hemorragia interna.

Del análisis bacteriológico efectuado a las muestras extraídas del líquido del absceso, de sangre y riñón de los

ajolotes, así como de las muestras de agua y de alimento vivo (tabla 1) se identificaron 19 especies diferentes de bacterias, siete reconocidas como patógenas de organismos acuáticos asociadas con procesos infecciosos y doce patógenas de humanos y otros animales mamíferos, de origen entérico.

En todas las muestras se aisló *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida*.

Citrobacter freundii únicamente se aisló del líquido del absceso, las enterobacterias: *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Escherichia intermedium*, *Klebsiella ozoenae*, *Salmonella sp.* y *Serratia plymuthica*, se aislaron de las muestras de agua principalmente de la cisterna y de la pista de canotaje.

Las tres especies de *Pseudomonas* que se identificaron *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. cepaciae*, se aislaron de las tres diferentes muestras de los cuerpos de todos los ajolotes y de las tinas en donde se cultivaron estos organismos.

Se aislaron diferentes especies de *Vibrios*: *V. cholerae* (no toxigénico y No 01-), *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. hollisae*, todas ellas en el agua y en el alimento.

Tabla 1. Análisis bacteriológico de muestras de: *Ambystoma mexicanus* (abscesos, riñón y sangre), agua (tinas, cisterna y pista Virgilio Uribe) y alimento (lombriz de tierra y vísceras de res)

Bacterias identificadas	<i>Ambystoma mexicanus</i>			Agua			Alimento	
	abscesos	riñón	sangre	tina	cisterna	canal	lombriz de tierra	vísceras
<i>Aeromonas hydrophila</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Aeromonas salmonicida</i>	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Citrobacter freundii</i>	x							
<i>Chrysonoma luteola</i>							x	
<i>Enterobacter agglomerans</i>				x	x		x	
<i>Enterobacter cloacae</i>				x	x	x	x	
<i>Escherichia coli</i>						x	x	
<i>Escherichia intermedium</i>						x		x
<i>Klebsiella ozoenae</i>					x			
<i>Salmonella</i>					x	x	x	x
<i>Serratia plymuthica</i>					x	x	x	x
<i>Pseudomonas putida</i>					x	x		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	x	x	x	x	x			
<i>Pseudomonas cepacia</i>	x	x	x	x	x			
<i>Vibrio cholerae</i> (no toxigenico)					x	x	x	x
<i>Vibrio cholerae</i> "presumpt" 01-					x	x	x	x
<i>Vibrio fluvialis</i>		x	x	x	x	x		
<i>Vibrio mimicus</i>					x	x		x
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>								x
<i>Vibrio hollisae</i>				x	x	x		x

Únicamente *V. fluvialis* se aisló además de las muestras de ajolotes.

El manejo del centro en donde se cultivan los ajolotes desde las perspectivas de la Sanidad Acuícola no cumple con los requisitos necesarios para poder prevenir una epizootia.

DISCUSIÓN

Las bacterias aisladas de abscesos, sangre y riñón de *A. mexicanus*, pertenecen a las cuatro familias con representantes de patógenos de alto riesgo para la acuicultura. Aeromonaceae, Vibrionaceae, Pseudomonaceae y Enterobacteriaceae. Las especies *A. hydrophila* y *A. salmonicida* son patógenas oportunista y estricta respectivamente, asociada con septicemia hemorrágica la una y con forunculosis la otra (De Figueiredo y Plumb, 1977, Mc Carthy, 1975 y Mc Graw, 1952). Éstas bacterias se han aislado invariablemente en muestras obtenidas de granjas acuícolas de los estados de México y Morelos (Negrete y Romero, 1998), por lo que bien podrían considerarse cosmopolitas de estos ambientes y de organismos acuáticos en condiciones de cultivo.

Las diferentes especies de *Vibrio* aisladas en el presente trabajo, de las muestras de agua y alimento: *V. cholerae* (no toxigénico y No 01-), *V. mimicus* y *V. parahaemolyticus* están asociados a diferentes vibriosis y septicemias hemorrágicas en peces (Cisar y Fryer, 1969), y a infecciones gastrointestinales en el humano.

V. fluvialis fue aislado además de abscesos, sangre y riñón de *A. mexicanus*, se ha podido comprobar experimentalmente ser importante patógeno de carpas (*Cyprinus carpio*), (Negrete y Romero, 1998). *C. freundii* aislado de abscesos, en todas las muestras, se reporta asociado con *Enterobacter agglomerans* en infecciones de organismos acuáticos en cultivos como la tortuga de carey y tortuga verde (Romero *et al.*, 1983). Las tres diferentes especies aisladas de la familia Pseudomonadaceae: *P. fluorescens*, *P. cepaciae* y *P. putida*, se encontraron en abscesos, sangre y riñón de los diez organismos estudiados, siendo patógenos dominantes. Han sido reportados como patógenos importantes y de alto riesgo para los cultivos acuícolas (Wakabayashi y Egusa, 1972).

P. putida y *P. fluorescens* son similares en cuanto a su morfología en el crecimiento de las colonias en placa, son saprofitas, de baja virulencia, aerobios estrictos, móviles, se encuentran en la flora bacteriana normal del intestino, boca y piel de los humanos y de animales mamíferos, se

aislan en condiciones nosocomiales (Blazevic *et al.*, 1973). Hasta el momento no se han reportado en la literatura, aisladas ni asociadas a infecciones de ajolotes. *Serratia plymuthica* se aisló únicamente de las muestras de agua y de alimento vivo, en el presente trabajo, sin embargo, representantes de éste género se han reportado como patógenos de una gran variedad de hospederos.

Serratia, ha sido asociada en infecciones crónicas en vertebrados de sangre fría; la infección nodular en *Anolis esquistri* (Duran - Reynalds y Claussen, 1937), en abscesos subcutáneos en iguanas y lagartijas (Boam *et al.*, 1970), artritis en *Tupinambis tequixin* (Ackerman, *et al.*, 1971), enfermedad ulcerativa en tortugas *Chrysemys pieta* (Jackson y Fulton, 1976) y en pequeñas tortugas verdes *Pseudemys scripta elegans* (Mc Coy y Seilder, 1973).

También en potros ha provocado septicemia (Deon y Morterlmans, 1953) cabras (Wijcawanta y Fernando, 1970); puercos (Brisen y Cadieilan, 1959) e implicada en conjuntivos de caballos (Carter, 1973) mastitis en vacas (Barnum *et al.*, 1958) y en embriones de pollos (Isawa *et al.*, 1971).

Clínicamente las infecciones de *Serratia* no son diferentes de las provocadas por otros patógenos oportunistas (Vou Graevenitz, 1997).

Esta bacteria como patógeno de los ajolotes podía tener su origen en miembros de la misma especie o cercanas taxonómicamente y provocar un contagio horizontal, o bien, por contaminación: a través del fecalismo de aves y mamíferos incluyendo al humano, del agua y de los alimentos empleados en el cultivo.

Las enterobacterias, aisladas en agua y alimento, *E. cloacae*, *Klebsiella ozoenae*, *Salmonella sp.*, *E. coli* y *E. intermedium*, son patógenos del hombre y de mamíferos; de origen fecal no reportadas en la literatura como patógenos de organismos acuícolas. Sin embargo, al entrar directamente en contacto con el cultivo de *A. mexicanus* por medio de contaminación de los ingresos al Centro del agua y del alimento, en condiciones deficientes de manejo del cultivo y no siendo flora bacteriana normal de los ajolotes, se disminuyen las defensas de estos y se manifiestan procesos infecciosos (Siniesko, 1972).

El conjunto de signos y lesiones, así como el comportamiento que los ajolotes, *A. mexicanus*, manifestaron durante el tiempo que se sometieron a observación, corresponden a un cuadro infeccioso caracterizado como dermonecrosis focal con ulceraciones (Roberts y Bromage, 1993), ocasionado por invasión múltiple de bacterias como: *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. cepaciae*, principalmente.

Además de otras bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Vibrio*, y Enterobacterias, que actuaron como oportunistas dadas las condiciones sanitarias en el manejo de cultivos del *A. mexicanus* y de la calidad bacteriológica: del agua usada en las tinas para el cultivo; de la cisterna, de la pista de canotaje y del alimento vivo empleado. Se encontró una importante contaminación con enterobacterias de origen fecal humano y otros mamíferos entre ellas los géneros: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *E. intermedium*, *Klebsiella ozoenae*, *Enterobacter cloacae* y *E. agglomerans*.

BIBLIOGRAFÍA

- ACKREMAN, L. J., R. A. KSHIMOTO y J. S. EMERSON, 1971. Nopigmented *Serratia marcescens* arthristis in Teju (*Tupinambis Tequixin*). *American Journal of Veterinary Research* 32: 823 - 826 .
- ANALYTICAL PROFILE INDEX, 1989. *Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria*, 9th Edition, 13 p.
- APHA, 1992, *Standart Methods for examination of water and wastewater*. 17th Ed. American Public Health Assosiation, Washington D.C. 1011 p.
- ARMSTRONG, J. B. y G. MALACINSKI, 1989, *Developmental biology of the Axolotl*, Oxford University Press. New York, Oxfod. 379 p.
- BARNUM, D. A., E. L. THACERAG y N. A. FISH, 1958. An outbreak of mastitis caused by *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Comparative and Medical Veterinary Sciences* 22: 392 -395.
- BLACEVIZ, D. J., H. K. KOCPOCKE y J. K. MASTEN, 1973. Incidence and Identification of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in the clinical laboratory. *Applied Microbiology* 25: 107-110.
- BRISON, J. y J. CADEILLAN, 1959. Etude sur le Serratie . A propoce de quatre souche isoleé en medecine veterinarie. *Bulletin de L'Association des Diplomes de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy* 75: 34 -39 .
- BOAM, G. W., L. V. SANGER, D. T. COWAN y D. P. VAUGHAM, 1970. Subcutaneous abscesses in iguanid lizard. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 157: 617 -619 .
- CARTER, G. R., 1973. *Diagnostic procedures in veterinary microbiology*, 2nd Edition Springfield, Illinois. U.S.A. 575 p.
- CISAR, J. O. y J. L. FRYER, 1969. An epizootic of vibriosis in chinook salmon. *Bulletin Wildlife Diseases Association* 5: 73 -76 .
- CONTRERAS, F. L. E., 1988. *Manual de prevención de enfermedades que afectan a los organismos en cultivos*. Secretaría de Pesca, 1ª Edición, México, D. F. 365 p.
- DEON, J. y J. MORTELMANS, 1953. Etude d'une souche pathogene de *Serratia marcescens*. *Inmonologie Revue d'Inmonologie* 17: 398-439.
- DUHDON, S. T., 1989. *Diseases of Axolots. Developmental Biology of the Axolotl*. Oxford University Press. New York, Oxford 275 p.
- DURAN-REYNOLDS, F. y H. J. CLAUSEN, 1937. A contagious tumor-like condition in the lizard (*Anolis equestris*) as induced by a new bacterial species, *Serratia anolium* (sp. nov.) *Journal of Bacteriology* 33: 369-379.
- DE FIGUEIDO, J. y J. A. PLUMB, 1977. Virulence of different isolated of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture* 11: 349-354.
- IZAWA, H. T., NAGABAYASHI, Y. KAZUNO y M. SOEKAWA, 1971. Ocurrance of death of Chick embryos by *Serratia marcescens* infection. *Japanese Journal of Bacteriology* 26: 200-204.
- JACKSON, C. G. y M. FULTON, 1976. A turtle colony epizootic apparently of microbial origin. *Journal of Wildlife* 6: 466-468.
- MC CARTHY, D. H., 1975. Fish furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* var. achromogenes. *Journal of Wildlife Diseases* 11: 489-493.
- MC CRAW, B. W., 1952. Furunculosis of fish U.S. Fish and Wild Serv. Spec Rep. Fish N pp. 84-87.
- MC COY, R. H. y R. J. SEIDLER, 1973. Potential pathogens in the enviroment : Aisolation in enumeration and identification of seven genera of intestinal bacteria assosiated with small green pet turtles. *Applied Microbiology* 25: 534-538.
- MICHEL, C., 1980. A standardize of experimental furunculosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal Fish Aquativ Science* 37: 746 -760.
- NEGRETE, R. P. y J. ROMERO J., 1998. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícolas en los estados de México y Morelos. *Hidrobiológica* 8 (1): 43-54.
- PIPER, G. R., 1992. Fish hatchery managment Department of interior U.S. Fish and Wildlife Service 264-368.
- ROBERTS, R. J., 1993. Introduction fish. pp. 1-20 En: INGLIS, W., R. J. ROBERTS y R. N. BROMAGE (Comps.). *Bacterial diseases of Fish*. Academic Press. London, 311 p.
- ROMERO J., J., A. MONTERO, M. J. FERRARA y L. M. LIZÁRRAGA, 1983. Estudio de las enfermedades cutáneas bajo condiciones de cautiverio. Memorias del VII Simposio Latinoamericano sobre Oceanografía Biológica. Acapulco, Gro. México. 757 p.
- SINIESKO, S. F., 1972. Recent advances in scientific knowledge and developments pertaining to diseases of fishes. *Advances in Veterinary Sciences and Comparative Medicine* 17: 291-314.

WAKABAYASHI, H. y S. EGUSA, 1972. Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pondcultured eels (*Anguila japonica*). *Bulletin Japanese Society Sciences Fish* 38: 577-587.

WIJEWANTA, E. A. y M. FERNANDO, 1970. Infection in goats owing to *Serratia marcescens*. *Veterinary Record* 57: 282-284.

VON GRAEVENITZ, A., 1977. The role of opportunistic bacteria in human disease. *Annual Review of Microbiology* 3 : 447-471.

Recibido: 27 de febrero de 1997.

Aceptado: 20 de octubre de 1998.