

Evaluación de la calidad bacteriológica del alimento vivo (*Artemia*, *Daphnia*, *Tenebrio* y *Tubifex*) para peces en los sitios de su recolección, producción y venta

Bacteriological quality evaluation of live food (*Artemia*, *Daphnia*, *Tenebrio* and *Tubifex*) for fishes in collection, production and selling sites

Pilar Negrete Redondo* Carmen Monroy Dosta* Jorge Romero Jarero**

Abstract

Cichlids constitute the group of fishes of greatest importance for ornamental aquaculture. To increment the production of these species, producers have to satisfy the metabolic necessities that will give to the fish greater tolerance to the variations in the physicochemical factors of their surroundings, as well as resistance to diseases. Aquaculturists include live food as part of their diet for its high protein content, mainly in their first development phases. The organisms of greatest use in aquaculture as live food are: *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* and *Tenebrio*; nevertheless, and in spite of being a probable source of ichthiopathogenic contamination, the bacterial charge they carry is not considered, which is incorporated to the culture system with the food. For this reason, in the present study a diagnosis of the sanitary conditions of live fish food management: *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* and *Tenebrio*, during its collection, production and selling process was done. A qualitative and quantitative analysis on the bacterial charge in each one of these foods was performed. The isolated strains, in different specific microbiological agars, were purified and identified using API-20E and API- 20NE systems. To establish the significant difference between sanitary conditions and defined bacterial charge, per food and per commercial process phase, an analysis of variance and the comparison test of multiple means by the method of Tukey was performed. Significant differences in sanitary management conditions and in the count of ufc/mL different food samples were observed. In different phases of commercialization process three different levels were identified: good, bad and worst, according to the sanitary management and count of cfu/mL of each feed.

Key words: LIVE FOOD, ARTEMIA, DAPHNIA, TUBIFEX, TENEBRIO, ICTHIOPATHOGENS, ENTEROBACTERIA, BACTERIAL CHARGE, ORNAMENTAL AQUACULTURE.

Resumen

Los cíclidos constituyen el grupo de peces de mayor importancia para la acuicultura de ornato. Con el propósito de incrementar la producción de estas especies, los productores deben satisfacer las necesidades metabólicas que proporcionarán a los peces mayor tolerancia a las variaciones en los factores fisicoquímicos del medio ambiente que los rodea, así como más resistencia a las enfermedades. Los acuicultores incluyen alimento vivo, como parte de la dieta de los peces, por su alto contenido en proteína, sobre todo en las primeras etapas de su desarrollo. Los organismos de mayor uso en la acuicultura como alimento vivo son: *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* y *Tenebrio*; sin embargo, y a pesar de ser una probable fuente de contaminación de ictiopatógenos, no se considera la carga bacteriana que portan, la cual es incorporada al sistema de cultivo junto con el alimento. Como consecuencia de lo anterior, en el presente estudio se efectuó el diagnóstico de las condiciones sanitarias de manejo del alimento vivo para peces: *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* y *Tenebrio*, durante su proceso de recolección, producción y venta. Se efectuó el análisis cualitativo y cuantitativo de la carga bacteriana en cada uno de estos alimentos. Las cepas aisladas, en diferentes agares microbiológicos específicos, se purificaron e identificaron utilizando los sistemas API-20E y API-20NE. Para establecer la diferencia significativa entre las condiciones sanitarias y carga bacteriana definida, por alimento y por fase del proceso de comercialización, se aplicó el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias múltiples por el método de Tukey. Se observaron diferencias significativas en las condiciones sanitarias de manejo y en el conteo de ufc/mL de las muestras de los diferentes alimentos. Se identificaron en las diferentes fases del proceso de comercialización tres niveles: bueno, malo y pésimo, de acuerdo con el manejo sanitario y conteo de ufc/mL de cada alimento.

Palabras clave: ALIMENTO VIVO, ARTEMIA, DAPHNIA, TUBIFEX, TENEBRIO, ICTIOPATÓGENOS, ENTEROBACTERIAS, CARGA BACTERIANA, ACUICULTURA ORNATO.

Recibido el 8 de marzo de 2007 y aceptado el 14 de marzo de 2008.

*Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco, Departamento El Hombre y su Ambiente, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, 04950, México, D. F.

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

Introduction

Aquaculture is defined as the culture of aquatic organisms, it includes fishes, mollusks, crustaceans and plants, in which man intervenes in seeding, development, reproduction and collection processes,¹ with the main purpose to produce great quantities of aquatic organisms within limited water volumes, with the following objectives: *a)* obtain low cost animal origin protein for human consumption, *b)* obtain commercial ornament fishes, and *c)* industrialize derived aquaculture products, as fish flour and processed feed.²

The increment of ornamental species' production induce producers to cover the necessities of culture species, among them nutrition, which is important for the benefit of organisms' development, while being in a malnutrition state they become disease susceptible and less tolerant to physicochemical environmental factor variables.² For that motive, interest in producing food to cover culture fishes' metabolic requirements has been raised.

As part of the cultured species' diet, aquaculturists include, above all, live food during the first individual development stages, for its high nutritional content.³ Nowadays, *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* and *Tenebrio*, are the most commonly live food organisms used for fishes, which increase growth and reproduction in them.⁴⁻⁶

Even though live food presents advantages for culture organisms, according to Wheaton,⁷ it could also be a vector for the entrance of pathogen agents; nevertheless, the bacterial charge has not been taken into account.

In the case of *Artemia*, the presence of different species of *Vibrio* and *Pseudomonas*,⁸⁻¹⁴ were recorded. Thompson *et al.*¹⁵ specifically isolated *Vibrio splendidus* in this crustacean.

Tubifex or aquatic worm is considered as a bacterial carrier such as *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli*, since these worms live in environments rich in organic mater, with scarce oxygen, fed mainly on decomposed organic matter.^{8,16,17} In this sense, Nenoph and Uhleman¹⁸ found *Micobacterium marinum* in this worm.

Daphnia or water flea is a natural food with high protein value, since its dry base content is 53.6%; it has been proven that it has favorable effect on *Pterophyllum scalare* fish coloration.⁴ Morse and Duncan¹⁹ registered *Salmonella* in that food.

Tenebrio is a coleopteran known as mealworm in larvae stage that is used as fish and reptile food.²⁰

The chain commercialization of such aquaculture supplies follows different stages of a long process as far as its commercialization refers (selling and consumption): collection, extraction or production, exportation-transport. This type of commerce is practiced,

Introducción

La acuicultura se define como el cultivo de organismos acuáticos, incluye peces, moluscos, crustáceos y plantas, en cuyo proceso de siembra, desarrollo, reproducción y recolección, interviene el hombre,¹ con el principal propósito de producir grandes cantidades de organismos acuáticos dentro de volúmenes limitados de agua, con los siguientes fines: *a)* obtener proteína de origen animal a bajo costo para consumo humano, *b)* conseguir peces de ornato para comercio, y *c)* industrializar productos derivados de la acuicultura, como harina de pescado y alimento procesado.²

El incremento en la producción de especies de ornato induce a los productores a cubrir las necesidades de las especies en cultivo, entre ellas la alimentación, que es importante para el buen desarrollo de los organismos, que al ser mal alimentados son susceptibles a enfermedades y menos tolerantes a las variaciones en los factores fisicoquímicos de su medio.² Por tal motivo se ha suscitado interés en producir alimento para cubrir los requerimientos metabólicos de los peces en cultivo.

Como parte de la dieta de las especies cultivadas, los acuicultores incluyen alimento vivo sobre todo en las primeras fases del desarrollo de los individuos, por el alto contenido nutrimental que poseen.³ En la actualidad los organismos más utilizados como alimento vivo para peces son *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* y *Tenebrio*, que mejoran el crecimiento y reproducción de aquéllos.⁴⁻⁶

A pesar de las bondades que el alimento vivo presenta para los organismos en cultivo, de acuerdo con Wheaton,⁷ también podría ser un vector para la entrada de agentes patógenos; sin embargo, no se ha tomado en cuenta la carga bacteriana que poseen.

En el caso de *Artemia* se registró la presencia de diferentes especies de *Vibrio* y *Pseudomonas*,⁸⁻¹⁴ Específicamente Thompson *et al.*¹⁵ aislaron *Vibrio splendidus* en dicho crustáceo.

Tubifex o lombriz acuática se considera portador de bacterias, como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*, debido a que estos gusanos viven en ambientes ricos en materia orgánica, con poco oxígeno, alimentados principalmente de residuos orgánicos en descomposición.^{8,16,17} En este contexto, Nenoph y Uhleman¹⁸ encontraron *Micobacterium marinum* en ese gusano.

Daphnia o pulga de agua es un alimento natural con alto valor proteínico, ya que su contenido en base seca es de 53.6%; se ha comprobado que tiene efectos ventajosos sobre la coloración en peces *Pterophyllum scalare*;⁴ en este contexto, Morse y Duncan¹⁹ registraron *Salmonella* en ese alimento.

Tenebrio es un coleóptero conocido como escara-

in 99%, by aquarists and amateurs and only 1% is performed in public aquariums or research institutes. This situation allows that important quantities of organisms, used as live food, be handled by non-qualified personnel, without knowledge of the health requirements of the product in the different stages of the process and in different environmental conditions, which implies a high health risk for fish fed with these organisms and for the personnel involved in that long commercialization chain.²¹

Due to the presence of bacteria in the diets administered to culture species, it is of great importance to know the handling health conditions of the organisms used as live food for fishes, as well as identify bacteria of ichthiopathogenic interest and public health risk in this type of food.

Based on the previous, the aim of this research consisted to determine qualitative and quantitatively the bacterial charge in live food for fishes: *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* and *Tenebrio*, during the stages of collection, production and sell.

Material and methods

A handling, production and commercialization diagnosis was performed on handling health conditions of live food for fishes (*Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* and *Tenebrio*). Prospecting was done in different places of collection in Texcoco, State of Mexico; Rio Atoyac, Puebla; production sites in Guadalajara, Jalisco; and San Luis Potosi, San Luis Potosi, as well as in fish markets "Mixuca" and "Emilio Carranza" in Mexico City. With the aim to systematize information, a questionnaire and observation guide were designed which defined the handling conditions from the aquaculture health point of view, based on Piper²² and Negrete and Romero²³ criteria on the center's infrastructure, warehouse condition, services, pond condition, cleanliness and hygiene of facilities, etiological history, human resources, physicochemical parameters of importance for the species cultivated and critical points of sanitary management of aquatic organisms established in the Mexican sanitary norms: NOM 021-PESC, NOM-011-PESC, PROJECT NOM-020-PESC and PROJECT NOM-022-PESC.²⁴⁻²⁷

Each considered aspect was graded for the fulfillment or not of the theoretical expected condition, reaching 100 points as a maximum, grade expressed in percentage for each of the visited sites. Samples of live food were simultaneously taken (*Artemia*, *Daphnia*, *Tenebrio* and *Tubifex*) at the mentioned sites.

The samples of *Artemia* and *Daphnia* were collected manually with fine nylon nets, transferred to cans with four liters of water from the same place and with battery aerators to be transported to the Aquatic Micro-

bajo de la harina de maíz en estado larval se usa como alimento para peces y reptiles.²⁰

La cadena de comercialización de tales insumos para la acuicultura sigue diferentes fases de un proceso largo en cuanto a su comercialización (venta y consumo): recolección, extracción o producción, exportación-transporte. Este tipo de comercio lo desarrollan, en 99%, acuaristas y aficionados y sólo 1% se realiza en acuarios públicos e institutos de investigación. Esta situación permite que cantidades importantes de organismos, utilizados como alimento vivo, sean movilizadas por personal no calificado, sin conocimiento de los requerimientos sanitarios del producto en las diferentes fases del proceso y en diferentes condiciones ambientales, lo que implica alto riesgo para la salud de los peces alimentados con estos organismos, y para el personal involucrado en esa larga cadena de comercialización.²¹

Debido a la presencia de bacterias en las dietas administradas a especies en cultivo, es de gran importancia conocer las condiciones sanitarias de manejo de los organismos utilizados como alimento vivo para peces, así como identificar bacterias de interés ictiopatógeno y de riesgo en salud pública en este tipo de alimento.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo consistió en determinar cualitativa y cuantitativamente la carga bacteriana de los alimentos vivos para peces: *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* y *Tenebrio*, durante sus fases de recolección, producción y venta.

Material y métodos

Se efectuó el diagnóstico de las condiciones sanitarias de manejo, producción y comercialización de alimento vivo para peces (*Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* y *Tenebrio*). Se efectuaron prospecciones en diferentes sitios de recolección en Texcoco, Estado de México; y Río Atoyac, Puebla; sitios de producción en Guadalajara, Jalisco; y San Luis Potosí, San Luis Potosí, así como en los mercados de peces "Mixhuca" y "Emilio Carranza" en la Ciudad de México. Con la finalidad de sistematizar la información se diseñó el cuestionario y guía de observaciones que definieron las condiciones de manejo desde la perspectiva de la sanidad acuícola, con base en los criterios de Piper²² y Negrete y Romero²³ sobre la infraestructura con la que cuenta el centro, condiciones de bodega, servicios, estado de la estanquería, limpieza e higiene de las instalaciones, historial etiológico, recursos humanos, parámetros fisicoquímicos de importancia para la especie que se cultiva y los puntos críticos de manejo sanitario de organismos acuáticos establecidos en las normas sanitarias mexicanas: NOM 021-PESC, NOM-011-PESC,

biology Laboratory, of the Metropolitan Autonomous University-Xochimilco Unit.

Tubifex was collected in sterile plastic bags.* Mealworms were extracted with sterile clamps from the production trays and transported in unicel jars of 250 mL. The samples coming from the fish markets were obtained in the conditions in which they were packed for their sell.

One g of food was weighed and homogenized with 99 mL of sterile distilled water during 5 min in an homogenizer,** dilutions to the tenth were made (from 10^{-2} and up to 10^{-6}) in milk flasks with bakelite screw down cap and with an automatic pipette, 0.1 mL were extracted from each of the dilutions, and were seeded by duplicate in thiosulfate-citrate bile salts (TCBS), eosin methylene blue and brain heart infusion (BHI).

With a glass elbow rod it was homogeneously spread over the surface of the agar plates. From the original homogenized 1 mL was seeded in the middle of the enriched lactose broth, tetrastationate broth to which 1 mL of iodine iodide and peptone water at pH 8, in assay tubes with bakelite threaded cap and were left to incubate for 24 h; later, 0.1 mL of this culture was seeded by duplicate in EMB medium, *Salmonella-Shigella* (S-S) and TCBS,²⁸ respectively. After 24 h of incubation the counting of colony forming units (cfu/mL) was done with a counter,*** likewise, the box morphology was observed (color, shape, size of colonies) for each dilution and culture medium. Gram stain was done after successive re-seeding series in BHI medium and until pure strains were obtained, which was established by homogenous colony growth, confirmed by observation of homogenous cellular morphology of the colonies with a phase contrast microscope.†

After obtaining pure strains, bacterial identification was done by API-20E and API-20NE systems^{29,30} and Merck Manual,³¹ according to the manufacturer instructions. All the process was replicated with strains of the American Type Culture Collection,† (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas cepaciae* (ATCC 9056), *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 35654), *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17802), *Vibrio fluvialis* (NCTCC 35654) and *Vibrio furnissii* (ATCC 35016).

The analysis of variance was applied to establish significant differences between health conditions per organism and per commercialization process phase, and between the bacteriological quality of each type of food; afterwards the multiple comparison test was applied by Tukey method.^{32,33}

PROYECTO NOM-020-PESC y PROYECTO NO-022-PESC.²⁴⁻²⁷

Cada aspecto considerado se calificó por el cumplimiento o no de la condición teórica esperada, llegando a sumar 100 puntos máximos, calificación expresada en porcentaje para cada uno de los sitios visitados. Simultáneamente se tomaron muestras de alimento vivo (*Artemia*, *Daphnia*, *Tenebrio* y *Tubifex*) en los sitios mencionados.

Las muestras de *Artemia* y *Daphnia* se recolectaron con redes manuales de malla fina de nailon, se trasladaron en botes con cuatro litros de agua del mismo lugar y con aireadores de pilas para su traslado al Laboratorio de Microbiología Acuática, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco.

Tubifex se recolectó en bolsas de plástico estériles.* Los tenebrios se extrajeron con pinzas estériles desde las charolas de producción y se transportaron en botes de unicel de 250 mL. Las muestras procedentes de los mercados de peces se obtuvieron en las condiciones en que se encuentran empacadas para su venta.

Se pesó 1 g de alimento y se homogeneizó con 99 mL de agua destilada estéril durante 5 min en un homogeneizador,** se efectuaron diluciones a la décima (desde 10^{-2} y hasta 10^{-6}) en frascos lecheros con tapa de rosca de baquelita y con una pipeta automática se extrajo, de cada una de las diluciones, 0.1 mL y se sembró por duplicado en cajas de agar de tiosulfato-citrato-sales biliares (TCBS), eosina azul de metileno (EMB) e infusión cerebro corazón (BHI).

Con una varilla de vidrio acodada se esparció homogéneamente sobre cada una de las superficies de las placas de agar. Del homogeneizado original se sembró 1 mL en medio de enriquecimiento de caldo lactosado, caldo de tetrastionato al que se le agregó 1 mL de yodo yoduro y agua peptonada a pH 8, en tubos de ensaye con tapón de rosca de baquelita y se dejaron incubar durante 24 h; posteriormente, 0.1 mL de este cultivo se sembró por duplicado en medios de EMB, *Salmonella-Shigella* (S-S) y TCBS,²⁸ respectivamente. Transcurridas 24 h de incubación se efectuó el conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc/mL) con un contador;*** asimismo, se observó la morfología de caja (color, forma, tamaño de las colonias) para cada dilución y medio de cultivo. La tinción de Gram se efectuó después de una serie sucesiva de resiembras en medio BHI y hasta que se obtuvieron cepas puras, lo cual se estableció por crecimiento homogéneo de las colonias, confirmado por observación de la morfología celular homogénea de las colonias con un microscopio de contraste de fase.†

*Millipore, Estados Unidos de América.

**Virtis. Virtis Company, Estados Unidos de América.

***Québec, Fisher, Estados Unidos de América.

†Zeiss, Alemania.

Results

From questionnaires and observation guide implemented in this work, the following results were obtained: in the collection sites in Texcoco, State of Mexico; and Rio Atoyac, Puebla, the diagnosis on the sanitary handling conditions of live food was deficient since there is no necessary infrastructure to count on. The collectors, nearby town habitants who know nothing about the correct handling of these organisms, have no other alternative to obtain an income; therefore, they are dedicated to this activity and they perform it without any hygiene of their utensils during collection, neither applying any preventive or prophylactic treatment to the organisms before selling them in fish markets. Food is transported in plastic jars of 16 L, without any label indicating the characteristics of the product. Neither do infrastructure, hygienic facilities, qualified personnel, services and disease control items. These sites obtained 29% and 36%, respectively, of the total points previously established to qualify the health handling of the aquatic organisms (Table 1).

The *Tenebrio* production farm, in Guadalajara, Jalisco, Mexico, from the aquaculture point of view, satisfactorily fulfills quality aspects of water quality, physicochemical control parameters, organism nutrition, general cleanliness and fiber glass containers with adequate characteristics for the species cultivated: they are equipped with quarantine containers and population density and their diseases are observed. In relation to the warehouse, it is well ventilated, clean and isolated from harmful fauna. Also counts with qualified personnel for the organisms handling. The food is packed and labeled with handling instructions, use and date of package. This production center complies with 92% of the criteria (Table 1).

In the *Artemia* production center, in Salinas Hidalgo, San Luis Potosi, Mexico, where the cyst of this organism is collected and processed, it was observed that the culture ponds are daily checked to keep the adequate culture conditions, as well as counting with qualified personnel for culture activities. The center has a laboratory where food is produced to supplied the organisms they cultivate. Population density is controlled, separation of the organisms according to their stage is carried out; tools, nets and containers are systematically disinfected. The warehouse conditions, storage and distribution of the product comply with the indications of the species being cultivated. With this, the quality and harmlessness of the product is assured, according to the standards established in the research; therefore, covers 90% of the total evaluation points (Table 1).

Luego que se obtuvieron cepas puras, se procedió a la identificación bacteriana mediante los sistemas API-20E y API-20NE^{29,30} y Manual de Merck,³¹ según las instrucciones del productor. Todo el proceso se replicó con cepas de la American Type Culture Collection,** (ATCC); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas cepaciae* (ATCC 9056), *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 35654), *Vibrio alginolyticus* (17802 ATCC), *Vibrio fluvialis* (NCTCC 35654) y *Vibrio furnissii* (ATCC 35016).

Se aplicó el análisis de varianza para establecer diferencias significativas entre las condiciones sanitarias por organismo y por fase del proceso de comercialización, y entre la calidad bacteriológica de cada tipo de alimento; después se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias por el método de Tukey.^{32,33}

Resultados

A partir de cuestionarios y guía de observación implementado en este trabajo, se obtuvieron los siguientes resultados: en los sitios de recolección en Texcoco, Estado de México; y en Río Atoyac, Puebla, el diagnóstico de las condiciones sanitarias de manejo de alimento vivo fue deficiente debido a que no se cuenta con la infraestructura necesaria. Los recolectores, habitantes de poblaciones cercanas que no conocen nada sobre el manejo de estos organismos, no tienen otra alternativa para obtener ingresos económicos, por lo que se han dedicado a esta actividad, y la llevan a cabo sin aplicar medidas de higiene a los utensilios utilizados en la recolección, tampoco aplican tratamiento preventivo o profiláctico a los organismos antes de venderlos en los mercados de peces. El alimento es transportado en botes de plástico de 16 L, sin etiquetado que indique las características del producto. Tampoco se cumple con los rubros de infraestructura, higiene de instalaciones, personal calificado, servicios y control de enfermedades. Estos sitios obtuvieron 29% y 36 %, respectivamente, del total de puntos previamente establecidos para calificar el manejo sanitario de los organismos acuáticos (Cuadro 1).

La granja productora de *Tenebrio*, en Guadalajara, Jalisco, México, desde la perspectiva de la sanidad acuícola, cumple satisfactoriamente con los aspectos de calidad del agua, control de parámetros fisicoquímicos, alimentación de organismos, limpieza general de la granja y contenedores de fibra de vidrio con características adecuadas para las especies que se cultivan: poseen contenedores de cuarentena, y se observan la densidad de población de los organismos y sus enfermedades. En cuanto a la bodega, se encuentra bien ventilada, limpia y aislada de fauna nociva. Cuentan

**Rockville, MD, Estados Unidos de América.

In the market of “Mixhuca” and “Emilio Carranza”, none of the previously established criteria is fulfilled. There are services as drainage, light, water and sufficient personnel. Nevertheless, in both places hygienic activities are not being done, the containers where organisms are stocked are dirty; no prophylactic or preventive treatment is applied to the organisms before being sold; sick individuals are not separated and the product that is not sold or dies is discarded in the same trash dump of the market; they neither count with a warehouse. Fishes are not fed according to the requirements of the species. Other animals like birds, rodents and reptiles are sold in the same space, among others, which causes cross contamination. The packed product carries no label which indicates the nutrimental characteristics, way of handling and administration of the product. These places recorded a grade of 48% and 24%, respectively, based on the established norms (Table 1).

The analysis of variance of the sanitary handling conditions, per organism and phases of the productive process, shows significant differences ($P < 0.001$), $F = 71.315$, $GI = 11.48$. When performing the comparison test of multiple means by the method of Tukey, significant differences were observed in the food handling conditions and three levels of conditions were identified (Figure 1): *a*) very bad conditions, the phases of *Artemia* commercialization; collection and commercialization of *Daphnia*, and the phase of collection, production and commercialization of *Tubifex*; *b*) in bad conditions, the *Artemia* collection stages, *Daphnia* production and commercialization of *Tenebrio*; *c*) in good conditions, the stages of: *Artemia*, *Tenebrio* production; and collection and production of *Tenebrio*.

In the four types of food: *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* and *Tenebrio*, *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Enterobacteriaceae* bacteria families were isolated. Seventeen different species of genera: *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pasteurella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* and *Providencia* were identified (Table 2).

From *Aeromonas* genus: *A. hydrophila* and *A. salmonicida*; from *Vibrio* genus; three species from *Vibrio* genus, *V. fluvialis*, *V. cholerae* El Tor and *V. alginolyticus* were identified. A greater number of enterobacteria from *Salmonella* Arizona, *Salmonella* spp, *Proteus rettgeri*, *Pantoea* spp, *Enterobacter agglomerance*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Pasteurella peumotropica*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca* and *Providencia* spp were identified (Table 2).

Commercialization phase presented greater bacterial contamination in relation to cfu/mL and number of unidentified species. In this phase, 15, 12, 17 and 7 different bacteria species were identified in *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* and *Tenebrio*, respectively. During col-

también con el personal calificado para el manejo de los organismos. El alimento es envasado y etiquetado con las instrucciones de manejo, uso y fecha de empaque. Este centro de producción cumple con 92% de los criterios (Cuadro 1).

En el centro de producción de *Artemia*, localizado en Las Salinas Hidalgo, San Luis Potosí, México, en donde se recolecta y procesa quiste de este organismo, se observó que los estanques de cultivo son revisados diariamente para mantener las condiciones adecuadas de cultivo, además de que se cuenta con personal calificado para efectuar las labores de cultivo. El centro posee un laboratorio en donde se produce el alimento que se les proporciona a los organismos que cultivan. Se controla la densidad de población, se efectúa la separación de los organismos de acuerdo con su estadio; los utensilios, redes y contenedores son desinfectados sistemáticamente. Las condiciones de bodega, almacenamiento y distribución del producto cumplen con las indicaciones de las especies que se cultivan. Con ello se asegura la calidad e inocuidad del producto, de acuerdo con los estándares establecidos en esta investigación, por lo que cubre 90% del puntaje de evaluación total (Cuadro 1).

En los mercados “Mixhuca” y “Emilio Carranza,” ninguno de los criterios establecidos previamente se cumple. Se cuenta con servicios como drenaje, luz, agua, personal suficiente. Sin embargo, en ambos sitios no se llevan a cabo acciones de higiene, los contenedores donde almacenan a los organismos están sucios; no se aplica a los organismos en cultivo ningún tratamiento profiláctico ni preventivo antes de su venta; no separan los individuos enfermos y el producto que no se vende y muere es desechado al basurero del mismo mercado; tampoco cuentan con bodega. No alimentan a los peces de acuerdo con los requerimientos de la especie. En el mismo espacio se venden otros animales como aves, roedores y reptiles, entre otros, lo que ocasiona contaminación cruzada. El producto empacado no porta etiqueta que indique las características nutrimentales, forma de manejo y administración del producto. Estos sitios registraron 48% y 24% de calificación, respectivamente, con base en lo establecido por las normas (Cuadro 1).

El análisis de varianza de las condiciones sanitarias del manejo, por organismo y fases del proceso productivo, muestra diferencias significativas ($P < 0.001$), $F = 71.315$, $GI = 11.48$. Al efectuarse la prueba de comparación de medias múltiples por el método de Tukey, se observaron diferencias significativas en las condiciones de manejo de los alimentos y se identificaron tres niveles de condiciones (Figura 1): *a*) en condiciones pésimas, las fases de comercialización de *Artemia*; recolección y comercialización de *Daphnia*, y la fase de recolección, producción y comercialización de *Tubi-*

Cuadro 1

PUNTOS CRÍTICOS EN LA RECOLECCIÓN, PRODUCCIÓN Y
 COMERCIALIZACIÓN DEL ALIMENTO VIVO PARA PECES
 CRITICAL POINTS IN COLLECTION, PRODUCTION AND
 COMMERCIALIZATION OF LIVE FOOD FOR FISHES

<i>Critical points</i>	<i>Maximum score</i>	<i>Site of collection (Texcoco)</i>	<i>Site of collection (Puebla)</i>	<i>Site of production (Guadalajara)</i>	<i>Site of production (San Luis P.)</i>	<i>Market "Mixhuca" (Mexico City.)</i>	<i>Market "Emilio Carranza" (Mexico City)</i>
INFRASTRUCTURE	6	3	0	4	3	4	4
Laboratory	2	-	-	-	+	-	-
Offices	1	-	-	+	+	+	+
Fencing	3	+	-	+	-	+	+
WAREHOUSE	10	0	0	10	10	2	0
Adequate ventilation	2	-	-	+	+	-	-
Humid free	2	-	-	+	+	-	-
Over-dais	2	-	-	+	+	-	-
Packed	2	-	-	+	+	-	-
Expiration date	2	-	-	+	+	+	-
SERVICES	10	3	3	10	10	10	10
Water	3	+	+	+	+	+	+
Light	2	-	-	+	+	+	+
Drainage	3	-	-	+	+	+	+
Bathrooms	2	-	-	+	+	+	+
PONDS	17	11	11	17	17	5	5
Number of ponds	2	+	+	+	+	+	+
Adequate for the species	3	+	+	+	+	-	-
Aeration system	3	+	+	+	+	-	-
Temperature	3	+	-	+	+	-	-
Filters	3	-	-	+	+	-	-
Water sumistration	3	+	+	+	+	+	+
CLEANLINESS AND HYGIENE	17	0	0	17	17	3	3
General equipment cleansing	3	-	-	+	+	+	+
Quarentine ponds	3	-	-	+	+	-	-
Desinfection of containers	2	-	-	+	+	-	-
Burning or burying of dead organisms	3	-	-	+	+	-	-
Free from harmful fauna	3	-	-	+	+	-	-
Desinfection of food	3	-	-	+	+	-	-
DISEASES	11	4	0	6	6	6	0
Infectious outbreaks	3	-	-	+	+	+	-
Causal agent	3	-	-	-	-	-	-
Treatment	3	+	-	+	+	+	-
Personnel sickness	2	+	-	-	-	-	-
HUMAN RESOURCES	5	2	2	2	2	2	2
Enough personnel	2	+	+	+	+	+	+
Trained personnel	3	-	-	-	-	-	-
WATER QUALITY	13	13	13	13	13	0	0
PH	3	+	+	+	+	-	-
Hardness	3	+	+	+	+	-	-
Oxigen	3	+	+	+	+	-	-
Turbidness	4	+	+	+	+	-	-
FOOD	3	0	0	3	3	0	0
Adequate for the species	3	-	-	+	-	-	-
PRODUCT PRESENTATION	11	0	0	11	10	3	0
Adequate for the species	3	-	-	+	+	+	-
Expiration date	2	-	-	+	+	-	-
Use indications	3	-	-	+	+	-	-
Mentions nutrimental content	3	-	-	+	-	-	-
TOTAL	100	36	29	92	90	48	24

lection phase, 14, 10, 14, and 1 species were isolated from the same food, respectively.

The lower number of bacterial species was isolated and identified in phases of production with 4, 3 and 2 species in *Artemia*, *Daphnia* and *Tenebrio*; in these cases and phases, the diversity of bacterial species was lower: 23%, 46% and 11.7% of the total species. *Tubifex* registered 17 different species in this phase, that is, 100% of the isolated and identified species.

Tubifex showed high intervals of bacterial contamination: 1×10^7 cfu/mL in the collection phase, 6×10^7 cfu/mL in the production phase, and 7×10^7 cfu/mL in commercialization in BHI agar. In TCBS agar 5×10^7 cfu/mL, 4×10^8 cfu/mL and 4×10^7 cfu/mL colonies were counted, which box morphology corresponded to *Vibrio cholerae* El Tor, *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* and *Pseudomonas* in collection, production and commercialization, respectively. In EMB agar the registry was of uncountable number of cfu/mL in collection and production phases; and 1×10^8 cfu/mL with metallic shine and violet color colony growth, which corresponds to *Escherichia coli* and *Salmonella*, respectively, in commercialization phase. Finally, in S-S agar an uncountable quantity of cfu/mL was obtained, with growth of transparent colonies with black center and colorless with a shade of yellow, corresponding to *Salmonella* and *Proteus*, during the three phases of the commercialization process (Table 3).

The quantification of the bacterial charge in the samples of *Daphnia* in BHI agar obtained, for the collection phase, 1×10^8 cfu/mL; in the commercialization phase, 3×10^7 cfu/mL; and in the production phase, 3×10^6 cfu/mL. In TCBS agar an uncountable number of cfu/mL in the collection phase; and in the production and commercialization, 7×10^7 cfu/mL and 4×10^7 cfu/mL, respectively, of different growth

fex; b) en malas condiciones, las fases de recolección de *Artemia*; producción de *Daphnia* y comercialización de *Tenebrio*; c) en buenas condiciones, las fases de: producción de *Artemia*, *Tenebrio*; y recolección y producción de *Tenebrio*.

En los cuatro tipos de alimento: *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* y *Tenebrio*, se aislaron bacterias de las familias Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae. Se identificaron 17 especies diferentes de los géneros: *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pasteurella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Providencia* (Cuadro 2).

Del género de *Aeromonas* se identificaron: *A. hydrophila* y *A. salmonicida*; del género *Vibrio* tres especies, *V. fluvialis*, *V. cholerae* El Tor y *V. alginolyticus*. Se registró mayor número de enterobacterias de las especies *Salmonella arizona*, *Salmonella* spp, *Proteus rettgeri*, *Pantoea* spp, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Pasteurella peumotropica*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca* y *Providencia* spp (Cuadro 2).

La fase de comercialización presentó mayor contaminación bacteriana en cuanto a ufc/mL y a número de especies identificadas se refiere. En esta fase, en *Artemia*, *Daphnia*, *Tubifex* y *Tenebrio* se identificaron 15, 12, 17 y 7 especies diferentes de bacterias, respectivamente. En la fase de recolección se aislaron 14, 10, 14 y 1 especies en los mismos alimentos, respectivamente.

El menor número de especies bacterianas se aisló e identificó en las fases de producción con 4, 3 y 2 especies en *Artemia*, *Daphnia* y *Tenebrio*; en estos casos y fases, la diversidad de especies bacterianas fue menor: 23% 46% y 11.7% del total de especies. *Tubifex* registró 17 especies diferentes en esta fase, esto es, 100% de las especies aisladas e identificadas.

Tubifex presentó intervalos altos de contaminación bacteriana: 1×10^7 ufc/ mL en la fase de recolección,

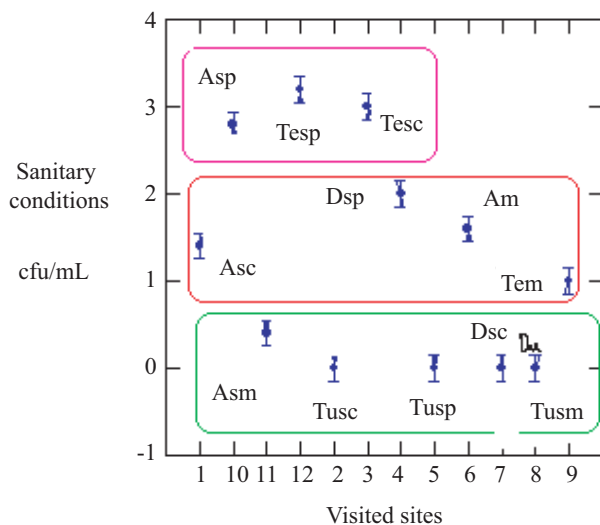


Figura 1: Comparación de medias múltiples (Tukey), del diagnóstico de las condiciones sanitarias de manejo del alimento vivo para peces expresado en unidades formadoras de colonias (ufc/mL). Asc = *Artemia* sitio de recolección, Asp = *Artemia* sitio de producción, Am = *Artemia* sitio de comercialización (mercados), Dsc = *Daphnia* sitio recolección, Dsp = *Daphnia* sitio de producción, Dm = *Daphnia* sitio de comercialización (mercados), Tesc = *Tenebrio* sitio de recolección, Tesp = *Tenebrio* sitio de producción, Tem = *Tenebrio* sitios de comercialización (mercados), Tusc = *Tubifex* sitio de recolección, Tusp = *Tubifex* sitio de producción, Tusc = *Tubifex* sitio de comercialización (mercados).

Figure 1: Comparison of multiple means (TUKEY), of the diagnosis of live food sanitary handling conditions for fishes expressed in colony forming units (cfu/mL). Asc = *Artemia* site of collection, Asp = *Artemia* site of production, Am = *Artemia* site of commercialization (markets), Dsc = *Daphnia* site of collection, Dsp = *Daphnia* site of production, Dm = *Daphnia* site of commercialization (markets), Tesc = *Tenebrio* site of collection, Tesp = *Tenebrio* site of production, Tem = *Tenebrio* sites of commercialization (markets), Tusc = *Tubifex* site of collection, Tusp = *Tubifex* site of production, Tusc = *Tubifex* site of commercialization (markets).

Cuadro 2

ESPECIES IDENTIFICADAS EN LAS MUESTRAS DEL ALIMENTO VIVO PARA PECES
IDENTIFIED SPECIES IN LIVE FOOD SAMPLES FOR FISHES

BACTERIA	Artemia			Daphnia			Tubifex			Tenebrio			Total
	C	P	M	C	P	M	C	P	M	C	P	M	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	*	-	*	*	-	*	*	*	*	-	-	*	8
<i>Aeromonas salmonicida</i>	*	-	*	-	-	*	-	-	*	-	-	-	4
<i>Pseudomonas cepaciae</i>	*	*	*	*	-	*	*	*	*	*	*	*	7
<i>Vibrio fluvialis</i>	*	-	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	7
<i>Vibrio cholerae El Tor</i>	*	-	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	6
<i>Vibrio alginolyticus</i>	*	-	*	-	-	*	*	*	*	-	-	-	3
<i>Salmonella arizona</i>	*	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	9
<i>Salmonella spp</i>	*	-	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	6
<i>Proteus rettgeri</i>	-	-	-	-	-	-	*	*	*	-	-	*	1
<i>Pantoea spp</i>	*	-	*	-	-	-	*	*	*	-	-	*	4
<i>Enterobacter agglomerans</i>	*	*	*	-	-	*	*	*	*	-	-	*	7
<i>Enterobacter sakazakii</i>	*	-	*	-	*	*	*	*	*	-	-	*	6
<i>Escherichia coli</i>	*	*	*	*	*	*	*	-	*	-	-	-	9
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	-	-	*	-	-	-	-	-	*	-	-	*	2
<i>Citrobacter freundii</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	*	-	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	8
<i>Providencia spp</i>	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	*	6
TOTALS	14	6	15	10	3	12	14	14	16	1	1	7	

Note: * Present, - Absent, C = Site of collection, P = Site of production, M = Sites of commercialization

forms, corresponding to bacteria of the *V. fluvialis* and *V. cholerae El Tor*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* and *Pseudomonas*.

Also in EMB agar an uncountable number of cfu/mL were recorded in the collection phase and 3×10^7 cfu/mL, as well as 1×10^7 cfu/mL with *Escherichia coli* and *Salmonella* growth. Also in S-S agar uncountable ciphers of cfu/mL in collection and production phases, and 4×10^7 cfu/mL in commercialization phase (Table 3).

Likewise, in BHI agar, in Artemia, in the processes of collection and commercialization 6×10^7 cfu/mL and 5×10^7 cfu/mL were recorded, respectively, keeping 1×10^7 cfu/mL during its production. In TCBS agar, in collection phase, 5×10^7 cfu/mL with *Vibrio colera El Tor* growth, *Vibrio fluvialis*, 5×10^7 cfu/mL with *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas* growth were counted. In production phases, recorded counting was 3×10^6 cfu/mL of growth from the same species

6×10^7 ufc/mL en la fase de producción, y 7×10^7 ufc/mL en la de comercialización en agar de BHI. En agar de TCBS se contaron 5×10^7 ufc/mL, 4×10^8 ufc/mL, y 4×10^7 ufc/mL de colonias cuya morfología de caja correspondió a *Vibrio cholerae El Tor*, *Vibrio fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* y *Pseudomonas* en las fases de recolección, producción y comercialización, respectivamente. En agar de EMB el registro fue de número incontable de ufc/mL en las fases de recolección y de producción; y 1×10^8 ufc/mL con crecimiento de colonias con brillo metálico y color violeta, que corresponde a *Escherichia coli* y *Salmonella*, respectivamente, en la fase de comercialización. Por último, en agar de S-S se obtuvo cantidad incontable de ufc/mL, con crecimiento de colonias transparentes con centro negro e incoloras con viraje del medio a amarillo, correspondiente a *Salmonella* y *Proteus*, durante las tres fases del proceso de comercialización (Cuadro 3).

that were identified in the aforementioned phase; also, in production phase presence of these species was recorded, but in quantities of 6×10^7 cfu/mL. In EMB agar ciphers of 7×10^7 cfu/mL and 8×10^6 cfu/mL corresponded to commercialization and collection phases, with metallic shine shape, which indicated presence of *E. coli*, and pink with dark center colonies, corresponding to *Klebsiella oxytoca*.

Finally, presence of *Salmomella*, in S-S agar, was quantified in this food with 5×10^6 cfu/mL and 6×10^6 , with dark center and transparent growth in collection and commercialization phases. Production phase was recorded bacteria free in EMB and S-S (Table 3).

In the samples obtained at the commercialization sites of *Tenebrio*, counting of cfu/mL in BHI agar recorded 7×10^7 cfu/mL, and 1×10^7 cfu/mL in collection and production phases. In TCBS, EMB and S-S agar plates there was no bacterial growth.

In the analysis of variance of cfu/mL counting of the different food samples, counted in BHI agar, for each of the commercialization process phases, indicated that there are significant differences between them ($P < 0.001$, $F = 39.306$, $GL = 11.168$), recording these differences in the bacterial charge of each food (Figure 2). Three main groups were identified: a) Very bad, $>$ at 100×10^6 cfu/mL, formed by *Tubifex* at collection site; b) bad, between $50-100 \times 10^6$ cfu/mL by *Artemia* at collection and commercialization sites, *Tubifex* at production and commercialization sites and *Daphnia* at collection and commercialization sites, and c) good $<$ at 50×10^6 cfu/mL, *Artemia*, *Daphnia* and *Tenebrio* at production, as well as *Tenebrio* at commercialization sites.

Discussion

Enterobacteria family was the most representative group in collection, production and commercialization phases, in the four types of food, with 10 differ-

La cuantificación de la carga bacteriana de las muestras de *Daphnia* en agar de BHI obtuvo, para la fase de recolección, 1×10^8 ufc/mL; en la fase de comercialización, 3×10^7 ufc/mL; y en la fase de su producción, 3×10^6 ufc/mL. En agar de TCBS se registro número incontable de ufc/mL en la fase de recolección; y en las fases de producción y comercialización, 7×10^7 ufc/mL y 4×10^7 ufc/mL, respectivamente, de diferente forma de crecimiento, correspondiente a bacterias de las especies *V. fluvialis* y *V. cholerae El Tor*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* y *Pseudomonas*.

En agar de EMB se registró también número incontable de ufc/mL en la fase de recolección y 3×10^7 ufc/mL, así como 1×10^7 ufc/mL con crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella*. Igualmente en agar de S-S se obtuvieron cifras incontables de ufc/mL en las fases de recolección y producción, y 4×10^7 ufc/mL en la fase de comercialización (Cuadro 3).

De igual forma, en agar de BHI, en *Artemia*, en los proceso de recolección y comercialización se registró 6×10^7 ufc/mL y 5×10^7 ufc/ mL, respectivamente, manteniendo durante su producción 1×10^7 ufc/mL. En agar de TCBS se contaron, en la fase de recolección, 5×10^7 ufc/mL con crecimiento de *Vibrio cholerae El Tor*, *Vibrio fluvialis*, 5×10^7 ufc/mL con crecimiento de *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas*. En las fases de producción, el conteo registrado fue de 3×10^6 ufc/mL de crecimiento de las mismas especies que fueron identificadas en la fase anteriormente descrita; de igual forma, en la fase de producción se registró presencia de estas especies, pero en cantidades de 6×10^7 ufc/mL. En agar de EMB las cifras de 7×10^7 ufc/mL y 8×10^6 ufc/mL correspondieron a las fases de recolección y comercialización, con formas de brillo metálico, que indicó presencia de *E. coli*, y colonias rosadas con centro oscuro, correspondientes a *Klebsiella oxytoca*.

Por último, en este alimento se cuantificó, en agar de S-S, presencia de *Salmonella* con 5×10^6 ufc/mL y 6×10^6 ufc/mL, con crecimiento transparente con centro

Cuadro 3

CUANTIFICACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA ($\times 10^6$ ufc/mL) DE ALIMENTO VIVO EN TODAS LAS FASES DE COMERCIALIZACIÓN
BACTERIAL CHARGE QUANTIFICATION ($\times 10^6$ cfu/mL) OF LIVE FOOD IN ALL COMMERCIALIZATION PHASES

Medium	<i>Artemia</i>			<i>Daphnia</i>			<i>Tenebrio</i>			<i>Tubifex</i>		
	Colec	Pro	Cm	Colec	Prod	Cm	Colec	Prod	Cm	Colec	Prod	Cm
TCBS	5.7	0	6.4	INC	72	42	0	3	3	55	48	40
BHI	68	12	51	115	3	37	10	10	72	115	68	70
EMB	7.2	0	8	INC	32	16	0	0	9	INC	INC	132
S-S	5	0	6	INC	INC	46	0	0	0	INC	INC	INC

Colec -Collection, Prod- Production, Cm- Commercialization INC-Uncountable

ent genres: *Proteus* sp genus belongs to the *Proteea* tribe, important bacteria in organic matter decomposition; they are isolated from contaminated water samples, *Proteus rettgeri* has been isolated from internal organs and lesions of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in Israel ponds;³⁴ *Citrobacter freundii*, recorded by Edwards and Erwing³⁵ in different species of pets, wild and marine animals; in birds, insects and humans it has been recorded by Hansen *et al.*³⁶ and it has been associated as fish pathogen by Swiderski and Jedrsekowska;³⁷ *Klebsiella oxytoca* has not been recorded as animal or plant pathogen, but it is in humans; different *Salmonella* species are associated with human intestinal infections. Le Minor³⁸ reports isolations of this bacterium in fish extracted from contaminated waters, but without manifesting salmonellosis signs. Some plant diseases have been attributed to *Erwinia arboricola* genus, which is also known as Enterobacter agglomerans;³⁹ some other *Erwinia* genres can be animal pathogens, but they are not known as such, as in the case of the so called *Klebsiella oxytoca*, considered as harmful by doctors and environmentalists, and it can be referred as *Erwinia* by phytopathologists.⁴⁰

Aeromonadaceae family was found in 11.6 % of the species, one of them, *A. hydrophila*, is recognized as pathogen in a great variety of animals such as: frogs,⁴¹ alligator,⁴² snakes and shrimps,⁴³ and in different fish species;⁴⁴ another isolated species in this study, *A. salmonicida*, is associated with syndromes of ulcerative diseases in salmonids.^{45,46}

V. fluvialis, *V. aglynoycticus* and *V. cholerae* El Tor species, from the Vibrionaceae family, manifested 17.5% of the total species. *V. aglynoycticus* is a marine pathogen of fishes associated with acute signs of bacterial septicemia and focal chronic lesions;^{47,48} *V. cholerae* El Tor known as human pathogen,⁴⁹ *V. fluvialis* is isolated for the first time, in human vomit samples, by Lee *et al.*,⁵⁰ later Negrete and Romero⁵¹ experimentally proved its infectious capacity in ornamental fishes *Carassius auratus*.

negro, en las fases de recolección y comercialización. La fase de producción se registró libre de bacterias en EMB y S-S (Cuadro 3).

En las muestras obtenidas en los sitios de comercialización de *Tenebrio*, el conteo de ufc/mL en agar de BHI registró 7×10^7 ufc/mL, y en las fases de recolección y producción se registró 1×10^7 ufc/mL. En placas de agar de TCBS, EMB y S-S no se registró crecimiento bacteriano.

El análisis de varianza del conteo de ufc/mL de las muestras de los diferentes alimentos, contadas en agar de BHI, por cada una de las fases del proceso de comercialización, indicó que existen diferencias significativas entre ellas ($P < 0.001$, $F = 39.306$, $GL = 11.168$), registrando estas diferencias en la carga bacteriana de cada alimento (Figura 2). Se identificaron tres grupos principales: a) Pésimo, $> a 100 \times 10^6$ ufc/mL, formado por *Tubifex* en sitio de recolección; b) malo, entre $50-100 \times 10^6$ ufc/mL por *Artemia* en sitio de recolección y comercialización, *Tubifex* en sitios de producción y comercialización y *Daphnia* en sitio de recolección y comercialización, y c) bueno $< a 50 \times 10^6$ ufc/mL, *Artemia*, *Daphnia* y *Tenebrio* en producción, así como *Tenebrio* en sitios de comercialización

Discusión

La familia de las enterobacterias fue el grupo con mayor representatividad en las fases de recolección, producción y comercialización, en los cuatro tipos de alimento, con 10 géneros diferentes: el género *Proteus* sp pertenece a la tribu *Proteea*, son bacterias importantes en la descomposición de materia orgánica; se aíslan a partir de muestras de agua contaminada, *Proteus rettgeri* ha sido aislada de órganos internos y lesiones de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) en estanques de Israel;³⁴ *Citrobacter freundii*, registrada por Edwards y Erwing³⁵ en diferentes especies de animales de compañía, animales salvajes y marinos; en pájaros, insectos y humanos ha sido registrada por

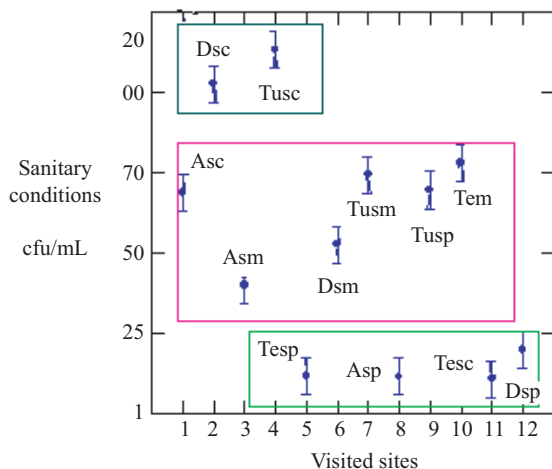


Figura 2: Comparación de medias múltiples (Tukey) del diagnóstico de las condiciones sanitaria del alimento para peces, expresado en unidades formadoras de colonia (ufc/mL) en los diferentes sitios visitados: Asc = *Artemia* sitio de recolección, Asp = *Artemia* sitio de producción, Am = *Artemia* sitio de comercialización (mercados), Dsc = *Daphnia* sitio recolección, Dsp = *Daphnia* sitio de producción, Dm = *Daphnia* sitio de comercialización (mercados), Tesc = *Tenebrio* sitio de recolección, Tesp = *Tenebrio* sitio de producción, Tem = *Tenebrio* sitios de comercialización (mercados), Tusc = *Tubifex* sitio de recolección, Tusp = *Tubifex* sitio de producción, Tum = *Tubifex* sitio de comercialización (mercados).

Figure 2: Comparison of multiple means (Tukey) of the diagnosis of live food sanitary conditions for fishes, expressed in colony forming unites (ufc/mL) in the different visited sites: Asc = *Artemia* site of collection, Asp = *Artemia* site of production, Am = *Artemia* site of commercialization (markets), Dsc = *Daphnia* site of collection, Dsp = *Daphnia* site of production, Dm = *Daphnia* site of commercialization (markets), Tesc = *Tenebrio* site of collection, Tesp = *Tenebrio* site of production, Tem = *Tenebrio* sites of commercialization (markets), Tusc = *Tubifex* site of collection, Tusp = *Tubifex* site of production, Tum = *Tubifex* site of commercialization (markets).

The analyzed food samples from the different sights of collection, production and commercialization, presented different levels of sanitary quality in its handling and in the bacterial charge they carry. In this way, in the different phases of the commercialization process it was found that in sanitary handling only the *Tenebrio* collection phase complies with a good level, condition that is confirmed while establishing the same quality grade in low bacterial charge indexes identified in this food, represented only by *Pseudomonas cepaciae* species, that are isolated from water and soil, this species has been identified as the cause of soft-red disease in onions;⁵² in humans it has been recorded as the cause of mild fevers that disappear spontaneously^{53,54} and it has also been isolated from human fluids such as: saliva, blood and urine.⁵⁵

Artemia, *Daphnia* and *Tenebrio*, production phase complies with a good level of sanitary handling quality, which reflects in the bacterial charge in regard to number and quantity of isolated species in these food: 60% are enterobacteria, among them *E. coli* and *S. Arizona* stand out, which also can be opportunist pathogens of fish associated with different bacteriosis, that when environmental conditions change they manifest as virulent and cause serious losses in aquatic species susceptible to environmental stress.⁵⁶

In general, commercialization phase presented very bad and bad levels, in handling conditions as in cfu/mL of all food, since in this phase it increases the bacterial charge to uncountable levels from 12 to 16 bacteria species of the 17 isolated, with representative genres of the Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae families, with fish pathogen representatives of the first three, in quantities that represent a high health risk for fishes that consume this type of food; likewise, if these fishes are assigned for human consumption public health problem will be implicated, while being consumed with an important enteric bacteria charge as *E. coli*, *S. Arizona*, *C. freundii* and vibrios and aeromonas such as *V. fluvialis*, *V. aglynotyticus*, *V. cholerae El Tor*, *A. hydrophila* and *A. salmonicida*.

It is important that sanitary norms, aquaculture as well as fishing products and services, consider a strict surveillance in commercialization points of these products, since heavy fecal contamination was detected.

Therefore, it is necessary to continue with researches that design organism purification systems that are supplied as diet for cultured aquatic species.

In the present study it is concluded that from the health aquaculture point of view, *Tenebrio* represents the most recommendable option, as live food for fishes.

Hansen *et al.*³⁶ y ha sido asociada como patógeno de peces por Swiderski y Jedrsekowska;³⁷ *Klebsiella oxytoca* no se ha registrado como patógena de animales o plantas, pero sí del humano; las diferentes especies de *Salmonella* se asocian con infecciones intestinales de humanos. Le Minor³⁸ informa aislamientos de esta bacteria en peces extraídos de aguas contaminadas, pero sin manifestar signos de salmonelosis. Algunas enfermedades de plantas han sido atribuidas al género *Erwinia arboricola*, la cual es conocida también como *Enterobacter agglomerans*;³⁹ algunos otros géneros de *Erwinia* pueden ser patógenos de animales, pero no son reconocidos como tal, como el caso de la llamada *Klebsiella oxytoca*, considerada nociva por médicos y ambientalistas, y puede llegar a ser referida como *Erwinia* por los fitopatólogos.⁴⁰

La familia Aeromonadaceae se encontró en 11.6% de las especies, una de ellas, *A. hydrophila*, es reconocida como patógeno en gran variedad de animales como ranas,⁴¹ lagarto,⁴² serpientes y camarones,⁴³ y en diferentes especies de peces;⁴⁴ otra especie aislada en el presente trabajo, *A. salmonicida*, se asocia con síndromes de enfermedades ulcerativas en salmónidos.^{45,46}

Las especies *V. fluvialis*, *V. aglynotyticus* y *V. cholerae El Tor*, de la familia Vibrionaceae, manifestaron 17.5% del total de las especies. *V. aglynotyticus* es patógeno marino de peces asociados con cuadros agudos de septicemia bacteriana y lesiones focales crónicas;^{47,48} *V. cholerae El Tor*, conocido como patógeno de humanos,⁴⁹ *V. fluvialis* es aislada por primera vez, en muestras de vómito de humano, por Lee *et al.*,⁵⁰ posteriormente Negrete y Romero⁵¹ comprueban experimentalmente su capacidad infecciosa en peces de ornato *Carassius auratus*.

Las muestras de alimento analizadas de los diferentes sitios de recolección, producción y comercialización, presentaron diferentes niveles de calidad sanitaria en su manejo y en cuanto a la carga bacteriana que portan. De esta forma, en las diferentes fases del proceso de comercialización se encontró que en el manejo sanitario únicamente la fase de recolección de *Tenebrio* cumple con un nivel bueno, condición que se confirma al establecer el mismo grado de calidad en índices de baja carga bacteriana identificada en este alimento, representado únicamente por la especie de *Pseudomonas cepaciae*, que se aíslan en muestras de agua y suelo, esta especie ha sido identificada como causante de la enfermedad de *soft-red* en cebollas;⁵² en humanos se ha registrado como causante de fiebres ligeras que desaparecen espontáneamente^{53,54} y se ha aislado también de fluidos humanos como saliva, sangre y orina.⁵⁵

La fase de producción de *Artemia*, *Daphnia* y *Tene-*

Referencias

1. Food and Agriculture Organization. Estadísticas de la producción de acuicultura. México D F : FAO, Circular de pesca N° 815, Revisión 2001;11:203.
2. Vallat B. Organización Mundial de Sanidad Animal. El papel de la OIE, en las enfermedades de animales acuáticos. México D F: Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico, 2002;12:19-24.
3. Fernández A A. Crecimiento de crías de peces utilizando alimento vivo. Acuuario. México D F: Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, 2001:17.
4. Luna-Figueroa J. Influencia de alimento vivo sobre la reproducción y crecimiento de pez Ángel *Pterophyllum scalare* (Perciforme:Cichlidae). Guanajuato, Guanajuato: Acta Universitaria Autónoma de Guanajuato 1999;9:2.
5. Luna FJ , Soriano S M. Efecto de diferentes tipos de alimento en el crecimiento de pez Ángel (*Pterophyllum scalare*). XII Congreso Nacional de Zoología; 2001 oct 28 a nov 1; Cuernavaca (Morelos) México. Cuernavaca (Morelos) México: Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigaciones Biológicas, 2001:98.
6. Soriano SMB, Luna-Figueroa J, Figueroa TJ, Hernández OD. Efectos de diferentes dietas sobre el crecimiento de *Pterophyllum scalare* (Perciforme:Cichlidae) en condiciones de laboratorio. Estado de México (México): Universidad Ciencia y Tecnología. Universidad Autónoma del Estado de México, 1993;3:1.
7. Wheaton FW. Acuicultura, diseño y construcción de sistemas. México DF: Ed. AGT. 1993.
8. Dehasque M, Veronch L, Sorgeloos P, Swings J, Leger P, Kkerster P. Determination of the bacterial contamination in live food production systems in marine fish hatcheries in southern Europe. In: Lavens P, Sorgeloos P, Jaspers E, Ollevier F, editors. Larci'91. Fish & Crustacean Larviculture Symposium; 1991 julio12-17; Belgium. Belgium: European Aquaculture Society, Special Publications No 15, 1991;339-402
9. Sorgeloos P, Lavens P, Leger Ptackert W, Versichele D. Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. Bélgica: FAO, 1986.
10. Muroga K, Higashi M, Keitoku H. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. Aquaculture 1987;65:79-88
11. Murghelano R A, Bishop J. Bacterial counts of commercial fish diets. J Fish Res 1975;32: 739-745.
12. Nicolas J L, Robic E, Ansquer D. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. Aquaculture 1989;83:237-248.
13. Tanasomwang V, Muroga K. Intestinal microflora of marine fish and their larval and juvenile stages. In: Hirano R, Hanyu I, editors. The 2nd Asian fisheries Forum; 1990 octubre 10-15; Manila (Philippines). Manila (Philippines): Asian Fisheries Society, 1990; 345-350.
14. Vanderberghe J, Thompson FL, Gomez-Gil B, Swings J. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquatic systems. Aquaculture 2003;2:14:1-4.
15. Thompson R, Macpherson HL, Riaza A, Birkbeck TH. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L). J Appl Microbiol 2005; 99: 2-12.
16. Acuavisión. Explotación del gusano de fango en Hidalgo. Acuavisión 1988;13:19-23.
17. Martínez J F, Ramírez G R, Villaseñor C R, Tios B G, Espinoza Ch. Cultivos de Apoyo para la acuicultura. Producción de alimento vivo. Acuavisión 1988;3:14.
18. Nenoph P, Uhlemann R. Mycobacteriosis in Mangrove killifish (*Rivuluv magdalenae*) caused by living fish *brio*, cumple con buen nivel de calidad en el manejo sanitario, que se refleja en la carga bacteriana en cuanto al número y cantidad de especies aisladas en estos alimentos; 60% son enterobacterias, entre ellas destacan *E. coli* y *S. arizona*, que también pueden ser patógenos oportunistas de peces asociados con diferentes bacteriosis, que al cambiar las condiciones ambientales se manifiestan como virulentas y ocasionan pérdidas graves en la producción de especies acuáticas susceptibles al estrés ambiental.⁵⁶

La fase de comercialización, en general, presentó niveles pésimos y malos, tanto en las condiciones de manejo como en el conteo de ufc/mL de todos los alimentos, ya que en esta fase se incrementa a niveles incontables la carga bacteriana de un número de 12 a 16 especies de bacterias de las 17 aisladas, con géneros representantes de las familias Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae, con representantes patógenos de peces de las tres primeras, en cantidades que representan alto riesgo sanitario para los peces que consumen ese tipo de alimento; asimismo, si estos peces son destinados para consumo humano se estará implicando un problema de salud pública, al ser consumidos con una importante carga de bacterias entéricas como *E. coli*, *S. arizona*, *C. freundii* y vibrios y aeromonas como *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* El Tor, *A. hydrophila* y *A. salmonicida*.

Es necesario que las normas de sanidad, tanto acuicola como de productos y servicios de la pesca, contemplen una vigilancia más estricta en los puntos de comercialización de estos productos, ya que se detectó fuerte contaminación fecal.

Por ello es necesario continuar con investigaciones que diseñen sistemas de purificación de los organismos que son suministrados como dieta a las especies acuáticas en cultivo.

En el presente trabajo se concluye que desde el punto de vista de la sanidad acuicola, *Tenebrio* representa la opción más recomendable, como alimento vivo para peces.

- food (*Tubifex tubifex*) infected with *Mycobacterium marinum*. Deutsche Tierärztlich Wochenschrift 2006;113: 25-37.
19. Morse EV, Duncan MA. A survey of aquarium fish. Their foods and environmental water of *Salmonella*. Lab Anim Sci 1976;26: 3-15
 20. Mendoza FJ. Estudio de coleópteros que infestan la harina (tesis de licenciatura). México DF: UNAM. Facultad de Ciencias, 2001.
 21. Aston RJ, Milner AGP. Conditions required for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 1981;26: 155-160.
 22. Piper GR. Fish management. Department of interior. Washington DC: Fish and Wildlife Service, 1992.
 23. Negrete RP, Romero JJ. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícolas en los estados de México y Morelos. Hidrobiológica 1998; 8:43-54.
 24. Diario Oficial de la Federación, 1994. Norma Oficial Mexicana -NOM- 021-PESCA. SEMARNAT. 1994. Aplicación de Cuarentenas. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Julio 1994.
 25. Diario Oficial de la Federación, 1994. Norma Oficial Mexicana -NOM- 011-PESCA. Importación y movilización de organismos acuáticos vivos. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Julio 1994.
 26. Diario Oficial de la Federación, 1994. Norma Oficial Mexicana -NOM- 020-PESCA. Requisitos para establecer enfermedades en organismos acuáticos. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Julio 1994.
 27. Diario Oficial de la Federación, 1996. Norma Oficial Mexicana. ANTEPROYECTO-NOM- 022-PESCA. Puntos críticos. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Octubre 1996.
 28. APHA. Standard methods for examination of water and waste water. 17th ed. Washington DC: American Public Health Association, 1992.
 29. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria. 9th ed. Paris (France): Biomérieux, 1992.
 30. Analytical Profile Index. Enterobacteriaceae and other Gram negative Bacteria. 9th ed. Paris (France): Biomérieux, 1997.
 31. Merck. Manual de medios de cultivo. Darmstadt (Alemania): Merck, 1994.
 32. Kachigan SK. Multivariables statistical analysis. A conceptual introduction. New York: Radius press, 1991.
 33. Tatsuoka MM. Selected topics in advanced statistics. An elementary approach. N0 6 Discriminant Analysis. Illinois: Ed. IPAT 1970.
 34. Bejerano Y, Saragi S, Horn E, Roberts J. Mass mortalities in silver *Hypophthalmichthys molitrix* (Valencienses) associated with bacterial infection following handling. J Fish Dis 1979;2:40-56.
 35. Edwards PR, Erwing WH. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd ed. Mineapolis: Burgess Publishing Co, 1976.
 36. Hansen GH, Raa JK, Olafsen JA. Isolation of Enterobacter agglomerans from dolphin fish, *Coryphaena hippurus*. L J Fish Dis 1990;13:93-96.
 37. Swiderski M, Jedrzekowska I. Infekcyjna lekoopornose i wirulecia pateczek Citrobacter orgniska intoksykacji prosiat. (with English summary). Med Wet 1976; 32: 665-668.
 38. Le Minor. The Genus *Salmonella*. In: Starr P, Stolp H, Truper G, Balows A, Schlegel HG, editors. The prokaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Berlin: Springer-Verlag, 1981;92:1149-1159.
 39. Erwin WH, Fife M A. Enterobacter agglomerans (Bjeijerinck) comb.nov. (the herbicola- lathyri bacteria). Int J Sys Bacteriol 1972; 22: 4-11.
 40. Starr PM. The Genus *Erwinia*. In: Starr P, Stolp H, Truper G, Balows A, Schlegel HG, editors. The prokaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Berlin: Springer-Verlag 1981;102:1261-1271.
 41. Gibbs EL. An effective treatment for red-leg diseases in *Rana pipiens*. Lab Anim Care 1963;13:781-783.
 42. Shotts E, Gaines JL, Martin L, Prestwood AK. *Aeromonas* induced death among fish and reptiles in a eutrophic inland lake. J Ame Vet Med Ass 1972;161:603-607.
 43. Mead AR. *Aeromonas hydrophila* in the leukoderma syndrome of *Achatina fulica*. Malacologia 1969;9:43.
 44. Figuereido De J, Plumb JA. Virulence of different isolates of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. Aquaculture 1971;11: 349-354.
 45. Roberst RJ. Introduction fish. In: Inglis W, Roberts RJ, Bromage RN, editors. Bacterial diseases of fish. London: Academic Press, 1994:735.
 46. Snieszko SF, Griffin PJ, Friddle S. A new bacterium (*Haemophilus piscium* n sp.) from ulcer diseases of trout. J Bacteriol 1950;59:699-710.
 47. Colorni A, Paperna I, Gordin H. Bacterial infections in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cultured at Elat. Aquaculture 1981; 23: 257-267.
 48. Hjeltnes B, Roberts JR. Vibriosis. In: Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR, editors. Bacterial diseases of fish. New York: John Wiley & Sons. INC, 1994.
 49. Sakazaki R, Balows A. The genera *Vibrio*, *Pleisomonas* and *Aeromonas*. In: Starr P, Stolp H, Truper G, Balows A, Schlegel HG, editors. The prokaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Berlin: Springer-Verlag 1981;103:1272-1302.
 50. Lee JV, Shread P, Furniss AI, Bryant TN. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov. (Synonym. Group F. Vibrios EF6) J Appl Bacteriol 1981;50: 73-94.
 51. Negrete RP, Romero JJ. Estudio cualitativo de las condiciones sanitarias de producción y manejo de granjas acuícolas en los estados de México y Morelos. Hidrobiológica 1998; 8:43-54.