



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Biológicas



**“BACTERIAS COLIFORMES, *Salmonella* y *Vibrio cholerae* EN DOS
ESPECIES DE MOLUSCOS BIVALVOS *Crassostrea virginica* y
Branchiodonte exustus DE LA LAGUNA MECOACÁN”**

Trabajo recepcional, en la modalidad de:

Tesis

Para obtener el título en:

Licenciatura en Biología

Presenta:

Santo Domingo López Sánchez

Directores:

Mca. Rosa Martha Padrón López
Dr. Luis José Rangel Ruiz

Universidad México.
Autonoma de Tabasco.

Bacterias Coliformes, Salmonella Y Vibrio Cholerae En Dos Especies De Moluscos Bivalvos Crassostrea Virginica Y Branchiodonte Exustus De La Laguna Mecoacán

Por Santo Domingo Lopez Sanchez

CANTIDAD DE PALABRAS 17608

HORA DE ENTREGA

01-JUL-2025 02:23P. M.

NÚMERO DE
IDENTIFICACIÓN DEL
TRABAJO

117019076

Bacterias Coliformes, Salmonella Y Vibrio Cholerae En Dos Especies De Moluscos Bivalvos Crassostrea Virginica Y Branchiodonte Exustus De La Laguna Mecoacán

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.aduanas-mexico.com.mx Internet	277 palabras — 2%
2	vsip.info Internet	194 palabras — 1%
3	eprints.uanl.mx Internet	172 palabras — 1%
4	www.redalyc.org Internet	121 palabras — 1%
5	repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx Internet	102 palabras — 1%
6	www.scielo.org.mx Internet	92 palabras — 1%
7	www.scribd.com Internet	92 palabras — 1%
8	revistas.ujat.mx Internet	87 palabras — 1%
9	pesquisa.bvsalud.org Internet	84 palabras — 1%
10	docplayer.es Internet	

81 palabras — 1%

11 dof.gob.mx
Internet

81 palabras — 1%

12 www.tandfonline.com
Internet

71 palabras — < 1%

13 es.scribd.com
Internet

61 palabras — < 1%

14 investigacion.izt.uam.mx
Internet

61 palabras — < 1%

15 hdl.handle.net
Internet

47 palabras — < 1%

16 scielosp.org
Internet

45 palabras — < 1%

17 www.dof.gob.mx
Internet

45 palabras — < 1%

18 www.coursehero.com
Internet

39 palabras — < 1%

19 fddocuments.ec
Internet

35 palabras — < 1%

20 cybertesis.unmsm.edu.pe
Internet

32 palabras — < 1%

21 issuu.com
Internet

32 palabras — < 1%

22 repositorio.uaaan.mx
Internet

30 palabras — < 1%

23 repositorio.xoc.uam.mx

Internet

29 palabras — < 1%

24 repositorio.ug.edu.ec
Internet

25 palabras — < 1%

25 www.oalib.com
Internet

25 palabras — < 1%

26 www.informea.org
Internet

24 palabras — < 1%

27 aquadocs.org
Internet

23 palabras — < 1%

28 ri2.bib.udo.edu.ve:8080
Internet

21 palabras — < 1%

29 pdffox.com
Internet

19 palabras — < 1%

30 bdigital.zamorano.edu
Internet

18 palabras — < 1%

31 1library.co
Internet

17 palabras — < 1%

32 docplayer.com.br
Internet

17 palabras — < 1%

33 www.archivos.ujat.mx
Internet

17 palabras — < 1%

34 Guadalupe Ramos. "Effect of lixiviated sediments affected with treated water on *Selenastrum capricornutum*, *Printz* and *Origanum vulgare* L.", *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 01/2010
Crossref

16 palabras — < 1%

35 worldwidescience.org

Internet

16 palabras — < 1%

36 www.economia-montevideo.gob.mx

Internet

16 palabras — < 1%

37 www.sandiegored.com

Internet

16 palabras — < 1%

38 repositorio.unapiquitos.edu.pe

Internet

15 palabras — < 1%

39 Marisela López Ortega, Laura Vázquez Castán, Marco A. Sánchez Olivares, María A. López Jiménez et al. "Presencia de coliformes fecales y totales en el *Isognomon alatus* en la laguna de Tampamachoco Veracruz", *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 2014

Crossref

13 palabras — < 1%

40 itunesu-assets.itunes.apple.com

Internet

13 palabras — < 1%

41 cdigital.uv.mx

Internet

12 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 12 PALABRAS



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCION**

MAYO 27 DE 2019

**C. SANTO DOMINGO LÓPEZ SÁNCHEZ
PAS. DE LA LIC. EN BIOLOGIA
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis denominado: **"BACTERIAS COLIFORMES, *Salmonella* y *Vibrio cholerae* EN DOS ESPECIES DE MOLUSCOS BIVALVOS *Crassostrea virginica* y *Branchiodonte exustus* DE LA LAGUNA MECOACÁN"**, asesorado por la MCA. Rosa Martha Padrón López y Dr. Luis José Rangel Ruiz sobre el cual sustentará su examen profesional, cuyo jurado está integrado por la MCA. Lucero Vázquez Cruz, M. en C. Marcela Alejandra Cid Martínez, Dr. Dr. Luis José Rangel Ruiz, Dra. Sugey López Martínez y M. en C. Andrés Arturo Granados Berber

**ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCION EN LA FE**

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCION

C.c.p.- Expediente del Alumno.
Archivo.

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis denominado: "**BACTERIAS COLIFORMES, *Salmonella* y *Vibrio cholerae* EN DOS ESPECIES DE MOLUSCOS BIVALVOS *Crassostrea virginica* y *Branchiodonte exustus* DE LA LAGUNA MECOACÁN**", de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 27 de Mayo de 2019

AUTORIZO



SANTO DOMINGO LÓPEZ SÁNCHEZ

Dedicatoria

“Sobre todas las cosas, al creador de mi vida, a tí Dios, por no olvidarme jamás, gracias por estar siempre conmigo, por ayudarme en mis fracasos y ayudarme a superarlos, y en mis triunfos a celebrarlos, todo te lo debo a tí al permitirme concluir con este sueño hecho realidad.

A mis padres que son los pilares de mi vida, **Higinio López Jiménez** y **Filiberta Sánchez Gamas**, gracias por todos sus apoyos incondicionales y brindándome siempre su amor, por estar siempre conmigo en cada etapa de mi vida, por sus buenos consejos en los momentos más difíciles, gracias a ustedes hoy pude ver alcanzado la meta final, los Amo. A mi Familia por estar siempre rodeándome de sus buenos deseos, y a mis dos sobrinos que son mis amores traviesos, **Emanuel y Berenice**, que sé, que algún día leerán este libro y se acordaran de mi para superarse. A mi maestra y amiga **Lucero Vásquez Cruz**, que nunca terminare de agradecerle por su apoyo, confianza y paciencia que siempre tuvo conmigo a lo largo de mi carrera profesional, sabe que la quiero mucho.

“La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace a un gran científico. Están equivocados, es el carácter”.

Albert Einstein

Agradecimiento

A Dios por a verme cubierto con su sangre preciosa todo los días y brindarme la oportunidad para concluir esta etapa de mi vida.

Mi profundo a agradecimiento a la **MCA. Lucero Vásquez Cruz**, por compartir su conocimiento, orientación y por su confianza, gracias a su apoyo he aprovechado su conocimiento además de sus experiencias en el área de la Microbiología, pero sobre todo por su paciencia.

A mis asesores la **MCA. Rosa Martha Padrón López, Dr. José Luis Rangel Ruíz** por brindarme parte de su valioso tiempo en su apoyo y observaciones para enriquecer este documento. Agradezco además la confianza en a verme elegido para participar en este proyecto.

A mi alma mater la **Universidad Juárez Autónoma de Tabasco**, en especial a la **División Académica de Ciencias Biológicas** mis más grandes agradecimientos por sus instalaciones y por ser nuestra máxima casa de estudios.

A los integrantes de la **comisión revisora** Lucero Vásquez Cruz, MCA. Marcela Alejandra Cid Martínez, Dr. José Luis Rangel Ruíz, Dra. Sugey López Martínez, MCA. Andrés Arturo Granados Berber, por su apreciable critica, revisión y correcciones a este trabajo de tesis.

A la Biol. María Lourdes Torres Pérez, por sus consejos y apoyo durante esta fase de este proyecto y por su amistad gracias; a la Biol. Gloria Isabel García de la Cruz, que siempre salía junto con migo corriendo tarde por apoyarme durante los análisis realizados en este trabajo.

A mis inolvidables **amigos de laboratorio de Microbiología**: Yina Lizbeth Alvarado, Mayra Asunción Almeida, Berenice de la Cruz.



Contenido

CAPITULO I. ESTADO DEL ARTE	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Alimentación de los Bivalvos	4
2.2 Bacterias en la salud pública.....	5
2.3 Familia <i>Vibrionaceae</i>	6
2.3 Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	7
2.3 Estudios bacterianos en moluscos bivalvos	7
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos específicos	14
5. ÁREA DE ESTUDIO	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1 Toma de muestra.....	18
6.2 Determinación para la identificación del grupo de los coliformes.....	18
6.3 Determinación de bacterias del grupo coliforme	19
6.4 Determinación de <i>Salmonella</i>	23
6.5 Fase de identificación para la determinación de <i>Vibrio</i> en muestras de moluscos.	27
7. LITERATURA CITADA	35
CAPITULO II. ARTÍCULO	39
2.1 RESUMEN	40
2.2 ABSTRACT.....	41
2.3 INTRODUCCIÓN	43
2.5 RESULTADOS.....	49
2.6 DISCUSIÓN	53
2.7 LITERATURA CITADA	59



Figuras

- Figura 1.** Distribución geográfica del área de estudio y sitios de muestreo, (ARCGIS 9.3). 16
- Figura 2.** Técnica de muestreo empleada para muestras simples de aguas superficiales (Modificada, Anónimo, 1978). 18
- Figura 3.** Diagrama de flujo para la determinación de CT y CF, utilizando la técnica de NMP (Número Más Probable). 20
- Figura 4.** Esquema general de las diluciones, para la detección de coliformes por el método de NMP. 21
- Figura 5.** Prueba confirmativa, resiembra de tubo positivo (+) de CT Caldo Lauril Sulfato de Sodio (LSS), a medio de enriquecimiento caldo lactosa Bilis Verde Brillante al 2% (BVB). 22
- Figura 6. a)** Prueba confirmativa para la búsqueda de CF, resiembra de tubo positivo (+) de CT Caldo Lauril Sulfato de Sodio (LSS), a medio de enriquecimiento EC. **b)** Incubación de los tubos en el baño de agua (baño maría) a 44.5 ± 0.5 °C, durante un periodo de 24 ± 2 h. 22
- Figura 7. a)** Homogenización del tejido blando y liquido intervalvar, en medio de pre-enriquecimiento caldo lactosado. **b)** Transferencia del homogenizado al frasco con tapón. **c)** Tiras de pH. 24
- Figura 8.** Características de *Salmonella* en los diferentes medios de cultivos. **a)** agar XLD. **b)** agar VB. **c)** agar SS. 25
- Figura 9.** Terminología estándar para la caracterización de una colonia bacteriana (Modificada de Alcamo, 2001). 26
- Figura 10.** Medios de cultivos. **a)** agar triple hierro azúcar (TSI). **b)** agar hierro lisina (LIA). **c)** Medio MIO. 26
- Figura 11. a)** Inóculo de la biopelícula bacteriana en medio de cultivo peptona alcalina sin agitar. **b)** Técnica del estriado de cola de ratón, en agar TCBS. 28



Figura 12. Diagrama para la identificación de *Vibrio cholerae*. 29

Figura 13. a) Cepa en agar soya tripticasa al 2 % de NaCl. **b)** Tiras para la prueba de Oxidasa. 30

Figura 14. Prueba positiva (+), collar de perlas. 31

Figura 15. a) Cepas bacterianas estriadas en Agar Mueller Hinton (Bioxon®). **b)** Suspensión bacteriana en 10 ml de solución salina al (0.85%)..... 33

Figura 16. Galería API NE (Biomérieux®). **a)** Pruebas negativas. **b)** Pruebas positivas. 34

Figura 17. Galería API 20NE (Biomérieux®)..... 34

Tablas

Tabla 1. Bacterias CT y CF en la Laguna Mecoacán durante los periodos 2014-2015 en Tejido Blando y liquido intervalvar a través del NMP/100g..... 49

Tabla 2. Bacterias CT y CF de agua en la Laguna Mecoacán a través del NMP/100ml durante los periodos de S y LL 2014-2015..... 50

Tabla 3. Identificación de las cepas bacterianas aisladas en tejido blando y liquido intervalvar de *C. virginica* y *B. exustus*. 51

Tabla 4. Distribución de especies aisladas por estaciones en tejido blando y liquido intervalvar. 51



CAPITULO I. ESTADO DEL ARTE

1. INTRODUCCIÓN

Los brotes de enfermedades de tifoidea, cólera, disentería y varias formas de gastroenteritis, pueden ser adquiridas a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados, siendo un riesgo de transmisión a través de productos marinos, tal es el caso de algunos moluscos bivalvos que generalmente son consumidos crudos o semicrudos. Debido a las actividades antropogénicas que producen contaminación, estos organismos están expuestos a diversos contaminantes como: metales pesados, plaguicidas, aguas residuales (domésticas o industriales), que contienen una gran cantidad de heces. Por la capacidad de filtración son capaces de acumular microorganismos con niveles altos de dosis infecciosa. Estos organismos se encuentran ampliamente distribuidos en las costas de los mares, estuarios y diversos cuerpos acuáticos (Quiñones *et al.*, 2000).

La calidad del agua y la vida están estrechamente relacionadas, González *et al.* (2003) mencionan que estamos expuestos a agentes infecciosos y compuestos químicos tóxicos; cuando se realiza la ingesta directa de agua no tratada, mariscos crudos, semicrudos o mal preparados, principalmente moluscos bivalvos; otras vías de transmisión puede ser el uso de agua contaminada al bañarse o algunos casos de lugares recreativos a través de la natación o buceo.

El incremento poblacional y la falta de recursos para el tratamiento de agua residuales es común encontrar áreas costeras contaminadas con microorganismos que se encuentran en el tracto intestinal del hombre; Martínez *et al.* (2014) mencionan que través de esto, ocurre un impacto en el ambiente marino, así como en la microbiota de sus habitantes; ya que los bivalvos son organismos filtradores y en su interior se acumulan microorganismos que pueden ser altamente patógenos para el hombre. Muñoz *et al.* (2010) describen las bacterias del grupo de los coliformes y enterococos como indicadores a nivel mundial, sin embargo, existen pocos estudios



de otros organismos donde son utilizados como indicadores y técnicas adecuadas para su cuantificación en ambientes marinos.

Los microorganismos también son importantes en la conservación de los alimentos, es por ello el interés preocupante para evitar algunas de las enfermedades; que pueden ser transmitidas por la ingestión de estos, ya que causan su descomposición y al ser consumidos pueden provocar enfermedades. Los alimentos deben presenciar buena calidad sanitaria al ser producido, distribuido y consumidos (crudos o preparados) de interés (Caballero, 2008).

En Venezuela, en el estado de Sucre, Graü *et al.* (2004) mencionan que los moluscos bivalvos son recursos naturales estratégicos, con gran importancia económica y social. Debido a sus mecanismos de filtración, son considerados vectores significativos de toxiinfecciones alimentarias causadas por microorganismos; forman parte de cadena trófica, muchas de estos organismos están siendo utilizados como recurso alimenticio, indicadores de contaminación fecal y estrés funcional en los ecosistemas costeros.

El cólera por ejemplo es una enfermedad diarreica grave, que actualmente ésta restringida al mundo subdesarrollado y es importante para la salud pública. *Vibrio cholerae* es el agente etiológico bacteriano; proteobacteria en forma curvada Gram negativa que puede transmitirse típicamente por la ingestión de agua contaminada y productos crudos, por ejemplo, en América la ingesta de mariscos crudos o vegetales sin cocinar, se han podido relacionar con casos de cólera. Desde 1817 se han registrados en el mundo aproximadamente siete importantes pandemias de cólera, de las cuales se conocen dos cepas diferentes de *V. cholerae*, el biotipo clásico y el Tor (Madigan *et al.*, 2009).

López *et al.* (2003), menciona que los productos marinos, como los moluscos bivalvos son poco durables, ya que fácilmente se contaminan con microorganismos patógenos, debido a la filtración



de agua en grandes cantidades; bioacumulan sustancias tóxicas y otros microorganismos presentes en su entorno, incluye miembros de la familia *Vibrionaceae* como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Lo cual su incidencia sigue constituyendo uno de los problemas de salud pública en el país y a nivel mundial, debido al creciente consumo de mariscos y pescados crudos, o que se encuentran mal cocidos y contaminados.

La salmonelosis puede ser transmitida por medio de los alimentos y de los animales de sangre caliente, el microorganismo puede alcanzar los alimentos por contaminación fecal de los manipuladores; Madigan *et al.* (2009) describen otras vías de transmisión de los microorganismos como; pollos, cerdos y vacas, los cuales pueden albergar serotipos de salmonella patógenos para el hombre, ya que puede pasar la bacteria a los alimentos frescos acabados, como huevos, carnes y productos lácteos. *Salmonella* no es una bacteria autóctona del ambiente acuático, por lo que es raro aislarla en pescados, moluscos, y crustáceos, provenientes de aguas oceánicas; sin embargo, se pueden aislar en ambientes marinos y en alimentos de este origen, cuando provienen de aguas costeras y estuarios contaminados de aguas residuales no tratadas (Morillo *et al.*, 2007).

En la actualidad la incidencia de enfermedades transmitidas por el agua en los países desarrollados es baja, de lo cual resulta difícil medir la eficacia de las prácticas de tratamiento, Madigan *et al.* (2009) describen que la mayoría de las enfermedades intestinales en los países desarrollados es transmitida principalmente por los alimentos crudos o preparados, que se manipulan inadecuadamente. Un indicador muy usado para la contaminación microbiana del agua es el grupo de los coliformes, son útiles para indicar los niveles de contaminación, además la enumeración de estos microorganismos en los ecosistemas marinos, tiene relevancia porque permite estimar su calidad bacteriológica y el potencial riesgo para la salud pública. Ya que



muchos de ellos habitan en grandes cantidades; los cuales se pueden encontrar en el tracto intestinal del hombre y de muchos animales (Herrera y Suárez, 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 Alimentación de los Bivalvos

Actualmente la mayoría de los protobranquios viven en el interior del sustrato, con su extremo anterior hacia abajo y el posterior hacia la superficie, estos organismos tienen un par de branquias bipectinadas posterolaterales, por lo cual hacen referencia a su nombre dicho anterior (primeras branquias). En la mayoría de ellos, tanto como en la mayor parte de los demás bivalvos las corrientes de ventilación entran por la cavidad paleal por su espacio posteroventral la cual queda entre las dos valvas, posteriormente atraviesa las branquias y sale por la zona posterodorsal. La corriente que se produce es debido a los cilios laterales que poseen las branquias, mientras los cilios que se encuentran en la parte frontal, eliminan las partículas de los sedimentos, de los cuales quedan retenidas en la superficie de ellos. Este grupo se mantienen en contacto con el sustrato gracias a que poseen un par de tentáculos, los cuales son prolongaciones de la boca, cada uno de ellos está asociado a cada pliegue grueso compuesto por dos salientes llamados palpos labiales; ubicados en ambos lados de la boca. Cuando ellos comienzan alimentarse estiran sus tentáculos hasta llegar al sedimento del fondo, lo cual las partículas que se encuentran, se adhieren a la superficie de ellos ya que poseen una cubierta mucosa, posteriormente son transportados hasta los palpos, estas estructuras sirven en la clasificación de estos organismos. Sin embargo en las superficies internas cada palpo, poseen una serie de rebordes de lo cual están ciliadas; continuamente las partículas más ligeras son transportadas por medio de los cilios de las cresta, hasta llegar a la boca, en cambio las partículas más pesadas son



transportadas por los cilios de los surcos hacia los laterales de los palpos, donde finalmente son eliminadas hacia la cavidad paleal (Ruppert y Barnes, 1996).

Los bivalvos filtran alrededor de 20 l de agua por h, de tal forma que acumulan partículas en suspensión como alimento, microorganismos, contaminantes químicos y biológicos (Marañón *et al.*, 2013).

2.2 Bacterias en la salud pública

Treviño (1995) describe a los moluscos bivalvos destinados para el consumo humano directo, que son consumidos crudos o ligeramente cocidos, pueden transmitir enfermedades gastrointestinales, ya que son de tipo sedentario poseen una gran capacidad de filtración, con lo cual pueden llegar a retener sustancias tóxicas producto de descargas humanas e industriales, o por fenómenos marino naturales como la marea roja. En Uruguay realizaron un estudio Bertullo y Pollak (2001) donde mencionan a los productos pesqueros como alimentos sensibles, con el fin de identificar que pueden ser medios de transmisión de enfermedades hacia los consumidores nacionales, ya que los han catalogado como un riesgo alimentario.

Las primeras enfermedades bacterianas transmitidas a través del consumo de los moluscos bivalvos que existen desde el siglo XIX y a principios del siglo XX, Gómez (2005) (en Rippey, 1994) menciona que la enfermedad más comunes asociadas a la ingestión de moluscos crudos o mal cocinados era la fiebre de la tifoidea, sin embargo estableciendo medidas de control en la producción y comercialización de estos productos mejoran su calidad, además con el tratamiento aguas residuales tuvieron una disminución de las enfermedades bacterianas transmitidas por estos alimentos, mencionando que los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Escherichia* son encontrados frecuentemente en aguas residuales.



Fimia *et al.* (2010) describe que algunas especies de moluscos, que se encuentran en los ecosistemas fluviales trae efectos perjudiciales como enfermedades para la salud humana, varias especies de moluscos sirven como hospederos intermediarios de numerosos parásitos que afectan al hombre y a otros animales. Esto se relaciona con las escorrentías de origen doméstico o industrial a los cuerpos de agua, tal es el caso de los residuos domésticos representado por los altos porcentajes de materia orgánica y de microorganismos de origen fecal encontrando como patógenos: bacterias, virus, protozoos, helmintos etc., el medio hídrico es de importancia para su ciclo vital de algunos vectores, que transmiten enfermedades (Moreno, 2012).

Los moluscos bivalvos que crecen en zonas costeras y son contaminadas por aguas fecales no tratadas, contienen microorganismos que pueden transmitirse al humano, a través del agua o de los alimentos si son consumidos crudos o mal cocidos, provocando infecciones en el tracto intestinal. Estos microorganismos pueden ser excretados por el humano infectado, llegando al agua, debido a su resistencia de tratamientos biológicos y fisicoquímicos del agua residual; pueden permanecer en ellas, generando contaminación del agua y alimentos, de tal manera brotes de enfermedades (Marañón *et al.*, 2013).

2.3 Familia *Vibrionaceae*

Características de la Familia *Vibrionaceae*

La familia *Vibrionaceae* abarca a los géneros: *Vibrio*, *Photobacterium* y *Plesiomonas*. *Vibrio cholerae* tiene gran importancia, como agente etiológico del cólera asiático en los seres humanos, ya que es una enfermedad diarreica potencialmente grave. Fue descrito por Pacini en el año 1854, pero más tarde fue aislado por Koch, quien lo nombro “bacilo en coma”, debido al aspecto curvo o en forma de coma característico de las células bacterianas individuales. Es una,



bacteria que se encuentra presente en las aguas y alimentos contaminados por heces fecales, se puede transmitir a través de estos, sin embargo sigue siendo un riesgo para muchos países.

Las cepas de *V. cholerae* tipo 01 se pueden separar en uno de tres serogrupos: Inaba, Ogawa e Hikojima, son importantes en estudios epidemiológicos, el Tor es un biotipo de *V. cholerae* lo cual a través de estudios se describe resistente y es capaz de sobrevivir en el medio ambiente, además el *V. cholerae* 0139, se distingue al *V. cholerae* por su inmunidad preexistente contra el *V. cholerae* 01, las cepas aisladas son asociadas a casos de cangrejos mal cocidos u ostras crudas, de acuerdo a las cepas de *V. cholerae* cuando colonizan el intestino humano es crucial en la inducción del sistema inmunológico (Winn *et al.*, 2006).

2.3 Familia *Enterobacteriaceae*

Las enterobacterias se aíslan fácilmente y con mayor frecuencia en los hospitales, las podemos encontrar ampliamente dispersas en el medio ambiente, estos microorganismos se encuentran en agua, tierra, sobre las plantas, además en el tubo digestivo de los seres humanos y animales. Winn *et al.* (2006) describen las enfermedades producidas por *Enterobacteriaceae* muy definidas, tal es el caso de los síndromes diarreicos y disentéricos, acompañados por fiebre, septicemia en casos claros de fiebre tifoidea, son provocadas por *Salmonella* y *Shigella*. *Klebsiella pneumoniae* es otro de los patógenos más importantes causante de una variante de la neumonía, mientras que *E. coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* se aíslan en heridas traumáticas contaminadas con tierra o material vegetal, o en incisiones de heridas abdominales posteriores a intervenciones quirúrgicas gastrointestinales.

3.3 Estudios bacterianos en moluscos bivalvos

En la laguna Pueblo Viejo, Veracruz, México, Barrera *et al.* (1998) realizaron el estudio preliminar de contaminación microbiológica, evaluaron agua, sedimento y ostión, a través de las



bacterias coliformes fecales (CF) y estreptococos fecales en dos épocas del año, aplicando la técnica de tubos de fermentación y parámetros fisicoquímicos simultáneamente, de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados para los puntos de muestreo. La boca de la laguna presentó mayor contaminación por los CF en agua con concentraciones $>2,400/100$ ml, la distribución de estas bacterias en agua y sedimento fue similar en concentraciones $>240,000/100$ g, el ostión sobrepasó el límite permisible para su consumo durante el periodo de seca, 400 CF/100 g, el valor obteniendo para los estreptococos fue un resultado homogéneo en la laguna, con concentraciones menores que los CF, la relación que tienen estos dos grupos se concluyó que son de origen humano, debido a la asociación que tiene con el Río Panuco, y a su misma vez la circulación del agua es muy lenta para la disociación de estas bacterias.

En México se ha desarrollado de una manera importante la pesquería del ostión (*C. virginica*) Téllez *et al.* (1999) describen que el 79 % de su captura en los últimos años fue en el estado de Tamaulipas, el objetivo de este trabajo fue realizar la calidad microbiológica de dicha especie, las muestras fueron recolectadas en la laguna Madre, Tamaulipas, México y se determinó la viabilidad de comercialización de este molusco debido al probable daño para la salud del consumidor. De los cuales se tomaron muestras durante un periodo de seis meses en dos de los bancos ostrícolas más importantes, de los sitios de muestreo Punta de Alambre y Punta de Piedra, determinando la presencia de mesófilos aerobios, CF, CT, además *Salmonella* y *V. cholerae*, apegándose a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993, para moluscos frescos-refrigerados y congelados. Los parámetros bacteriológicos del ostión, tanto fresco como congelado, y el agua, cumplieron las condiciones sanitarias, debido a que no se encontraron microorganismos patógenos.



Los moluscos bivalvos debido al tipo de alimentación que presentan y por el sitio donde son cultivados, pueden ser uno de los principales medios de transporte de microorganismos patógenos. En el norte del estado de Veracruz se recolectaron un total de 260 muestras de almejas durante un ciclo anual. Se determinó la presencia de *Salmonella ssp.*, *V. cholerae* y coliformes fecales. La metodología que se utilizó fue la establecida por el Manual de Bacteriología Analítica de la Administración de Alimentos y Medicamentos (BAM-FDA). En el 7 % de muestras analizadas se identificó a *V. cholerae* 01 Inaba Toxígeno, 11 % fue de *V. cholerae* no 01, de *Salmonella ssp.*, el 21.5 %, y el 100 % de las analizadas se encontró a coliformes fecales. La presencia de organismos de coliformes fecales indica, la presencia de asentamientos humanos mal planificados cerca de los cuerpos agua (Quiñones *et al.*, 2000).

Los moluscos bivalvos los podemos considerar como una fuente estratégica de gran importancia económica y social, Graü *et al.* (2004) mencionan que son señalados como una fuente principal de vectores significativos de toxiinfecciones alimentarias. El objetivo fue analizar la presencia de patógenos que los vincula con brotes de infecciones entéricas, y así mismo determinar la calidad e inocuidad. Para ello se analizaron un total de 270 muestras en dos especies diferente de moluscos bivalvos *Arca zebra* (pepitona) y *Perna perna* (mejillón), de lo cual provenían de tres sitios para su estudio; Isla Lobos, Punta Patilla y Punta la Iglesia, del estado de Sucre, Venezuela.

Los muestreos se realizaron mensualmente, entre los meses de abril y diciembre de 2002. Los índices de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF), se determinaron para su análisis por el método de tubos múltiples según (APHA) y *Vibrio* se utilizó la metodología recomendada por la Food and Drug Administration (FDA). De 270 muestras analizadas se aisló un total 247 cepas de *Vibrio*, predominando *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, y *V. vulnificus*. Ya que en las



muestras de mejillones procedentes de los sitios de Punta Patilla solo se reportó la presencia de *V. Cholerae* no O1. Posteriormente para los niveles de Coliformes en las muestras de *P. perna* y *A. zebra*, los resultados no sobrepasaron los límites microbiológicos establecidos para los indicadores fecales.

Se realizó un estudio para determinar la calidad microbiológica en moluscos bivalvos crudos y cocidos, en el sitio de Cumana estado de Sucre, Venezuela, con el fin de determinar su calidad sanitaria, lo cual para determinar los CF, se realizó a través de recuento en placa, así mismo para determinar la presencia de *E. coli*, ya que lograron aislar 80 cepas, de las cuales en ambas muestras abría la posibilidad de encontrar *E. coli*, por los altos valores obtenidos mediante el conteo, de esa manera se refleja que las practicas que realizan son inadecuadas para la preparación de venta, y consumo de los encurtidos (Martínez y Villalobos, 2005).

Muñoz *et al.* (2008) evaluaron la calidad sanitaria de mejillones *P. perna* y *P. viridis*, así como las aguas extraídos en tres sitios de producción del estado Sucre, Venezuela. Para el análisis de muestras de agua, se determinaron por la carga del (NMP/100) de CT, y posteriormente CF, en cuanto a los mejillones su análisis fue determinado por el recuento en placa de aerobios mesófilos (AM). Los sitios que cumplieron con los criterios de CT y CF fueron Bahía Iglesia y Punta Patilla, de acuerdo a los criterios establecidos de la (legislación venezolana y FDA-EUA), lo cual no cumpliendo con los criterios marcados fueron los sitios de Ensenada y La Chica, obteniendo valores máximos, de los mismos grupos, ya que fueron comparados con los límites establecidos. Los mejillones recolectados en el sitio de la Ensenada La Chica, presentaron contaminación, ya que los CF y *E. coli* mostraron la cifra de 230 NMP/g lo cual era su limite establecido. El sitio de Bahía Iglesia, presentó altas concentraciones bacterianas en el mejillón. (1,1x10⁴ NMP/g de CF y *E. coli*).



Negrete y Romero (2010) evaluaron la carga bacteriana en el ostión *C. virginica* desde su recolecta hasta su distribución, venta y consumo en diferentes centros comerciales de la ciudad de México, lo cual las bacterias aisladas purificadas se identificaron por medio de los criterios del programa Merck y se confirmó con API-20 E. Respecto al análisis microbiológico fue excedido de acuerdo a lo establecido, lo que se determinó que no cumple con las especificaciones de acuerdo a la PROY-NM-242-SSA-2005, ya que los moluscos bivalvos deben estar libre de contaminación microbiológica referente a los mesofílicos aerobios (500,000 UFC/g), CF (230 NMP/g), tanto en carne como liquido intervalvar), *Salmonella ssp.* (Ausente en 25g). Se concluyó que los ostiones *C. virginica*, se encuentra altamente contaminado durante su recolecta hasta su consumo, por especies patógenas para el ser humano como para ellos mismos, lo cual ponen en peligro la salud para los consumidores.

Padrón *et al.* (2010) determinaron la calidad microbiológica en muestras de agua y almeja, recolectadas en seis sitios localizadas en la Reserva Biosfera Pantanos de Centla (RBPC), en el estado de Tabasco; tomando en cuenta al grupo coliformes como indicador de contaminación. Los resultados obtenidos de CT, en muestras de agua fue de 430 y 11,000 NMP/ml, los CF entre 70 y 750 NMP/ 100 ml. En las almejas de la especie *Lampsilis tampicoensis* los valores obtenidos fueron de 9.3 a 110 CT, y 0.43 a 110 según el NMP/g de muestra.

Montiel *et al.* (2011) analizaron la calidad microbiológica en el sitio de la playa Curarie, Venezuela, a nivel físico (materia orgánica), determinando al grupo de los CT, CF, estreptococos y enterococos, por la técnica del NMP. Así mismo fue analizada la presencia de *Salmonella* en muestras de agua y sedimento. Para llevar a cabo su análisis se recolectaron un total de 90 muestras, de las cuales 30 fueron de agua, 30 de sedimentos y 30 de almejas (*Rangia cuneata*), en los periodos (noviembre 2008-octubre 2009). Los valores más elevados fueron obtenidos para



los CT de muestras de *R. cuneata* presentando valores desde $<2 \times 10^0$ hasta $1,6 \times 10^5$ NMP/100 g, CF ($<300/100$ g) y sólo el 3,3 % para *E. coli* ($<230/100$ g), se deduce los indicadores bacterianos, dando los valores un rango $<2 \times 10^0$ y $1,6 \times 10^5$ NMP/100 g para los sedimentos, el agua $<2 \times 10^0$ y $1,4 \times 10^4$ NMP/100 ml, el cual los CT se encontraron ($<70/100$ ml) equivalente a un (33,3 %), estos resultados sobrepasaron los límites de la normatividad venezolana.

En dos áreas de la bahía de Cienfuegos, Cuba Martínez *et al.* (2014) evaluaron la calidad microbiológica, durante los periodos de lluvia y seca donde se encuentra la mayor abundancia del mejillón *Perna viridis* de las muestras que fueron analizadas no se encontró la presencia de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* ni *Staphylococcus aureus*, sin embargo, todas tenían la presencia de *E. coli*, al igual que CF, de igual forma se encontró la presencia de una cepa de *S. cholerae* en relación a los datos obtenidos prohíbe la comercialización del producto sin darle algún tratamiento previo.



3. JUSTIFICACIÓN

Debido a las enfermedades gastrointestinales que existen en el mundo a través del consumo de alimentos contaminados como son carnes, peces y moluscos crudos, se da la importancia de la cocción y un buen manejo de preparación, en México cada año mueren aproximadamente 16,000 personas, por enfermedades transmitidas de los alimentos, lo cual provoca un gran impacto en la salud pública, además de pérdidas de productividad y económicas. La sanidad bacteriológica de los organismos acuáticos desempeña un papel de gran prevalencia para estos tipos de análisis, ya que los moluscos son organismos filtradores y tienden a acumular bacterias altamente patógenas, si se consumen crudos, ponen en peligro la calidad de la salud para los consumidores, estos suelen ser considerados un reservorio natural, es por ello necesario aplicar un análisis de los microorganismos en ostión, extraídos del sitio de la Laguna Mecoacán, Tabasco.

Sin embargo existe una gran variedad de microorganismos para ser utilizados y, así, evaluar el riesgo sanitario que pueden presentar, utilizando indicadores biológicos que deben cumplir con ciertos requisitos ideales, como los CT y CF, de origen entéricos, además de las bacterias coliformes, podemos describir algunas especies de interés asociadas a patógenas, como *Vibrio*.

Debido a lo anterior este trabajo tiene como objetivo evaluar la calidad microbiológica de los moluscos bivalvos provenientes de la Laguna Mecoacán, del estado de Tabasco, ya que pueden ser un riesgo para los consumidores, y además es un requisito sanitario en caso de ser comercializados, lo cual representa una fuente de ingreso para la población.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- ❖ Determinar la calidad bacteriológica en dos especies de moluscos bivalvos *Crassostrea Virginica* y *Branchiodonte exustus* extraídos de la Laguna Mecoacán, Tabasco.

4.2 Objetivos específicos

- ❖ Cuantificar al grupo Coliformes (fecales y totales) en tejido blando y líquido intervalvar en dos especies de moluscos *Crassostrea Virginica*, *Branchiodonte exustus* y agua de la Laguna Mecoacán, durante dos épocas del año (seca y lluvia).
- ❖ Identificar especies del género *Salmonella* y *Vibrio* en los moluscos bivalvos, a través de las pruebas bioquímicas miniaturizado API WEB (Biomérieux®).



5. ÁREA DE ESTUDIO

Laguna Mecoacán, Paraíso, Tabasco, México

Se localiza en la parte Norte del estado en el litoral del Golfo de México, entre los paralelos 18°24' y 18°24' Latitud N y los meridianos 93°10' y 93°5' Longitud E, se encuentra asociada con sistemas deltáicos fluviales. Posee una forma alargada, con un eje principal paralelo al litoral, tiene una profundidad de 1.20 m con valores máximos de hasta 3.0 m en la barra de Dos Bocas y 5.0 m en el canal natural El Bellote.

Tiene una gran variabilidad en condiciones hidrológicas, haciendo referente a la salinidad superficial, representa fuertes rangos, mientras que referente a la temperatura incrementan levemente en la misma dirección. Sin embargo las condiciones que presenta hidrológicas, se ve influenciada por la variación estacional, de acuerdo por las condiciones atmosféricas, teniendo en todo momento salinidades menores que en mar abierto, esto muestra que posee un comportamiento estuarino durante todo el año, gracias a los aportes continuos de agua dulce por escurrimiento continental y al régimen intenso de lluvias.

Con los rangos de salinidad y temperatura que se observan durante el transcurso del año, y así mismo los rangos de salinidad y temperatura óptimos para el funcionamiento biológico, producen el ostión *Crassostrea virginica*, aprovechando de una manera formal e integral la potencialidad para este recurso.

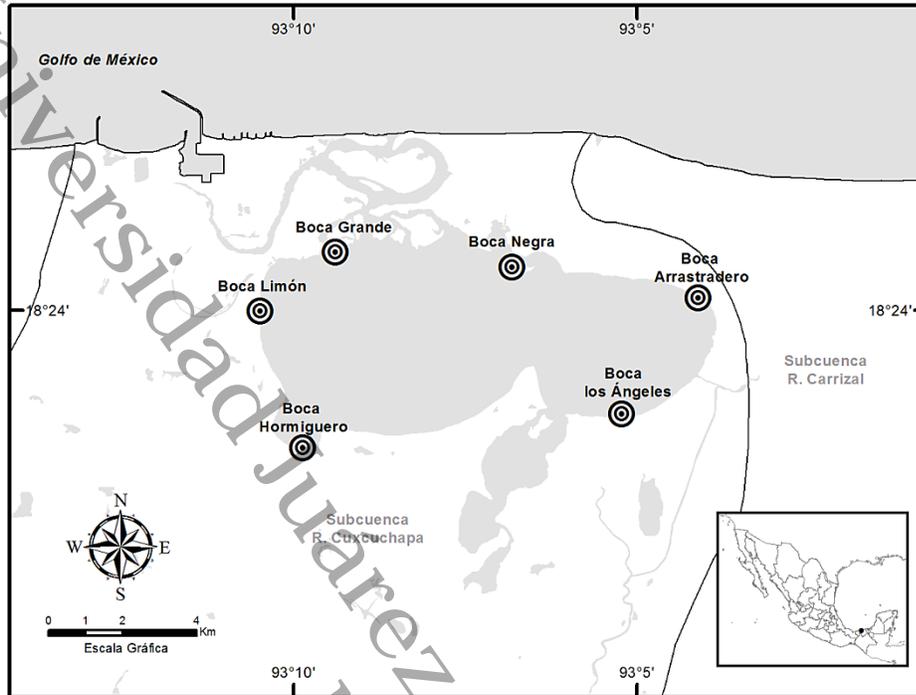


Figura 1. Distribución geográfica del área de estudio y sitios de muestreo, (ARCGIS 9.3).

Los puntos de muestreos se determinaron en una fecha aproximadamente casi diez años, por los colaboradores del Sistema Ambiental Regional (SAR), tomando en consideraciones características que son de impacto ambiental al ecosistema lagunar, como son: Nivel de Fragilidad (NF), Entradas y Salidas de agua o puntos de control (E/S), Aporte de Agua (AA), Conectividad (C), Cercanías a Obras (CO), Cercanías a Poblaciones (CP), y Acumulación de Contaminantes (AC); para describir tendencias de desarrollo y el impacto ambiental que se produce.



Tabla 1. Estaciones de monitoreo para el monitoreo de calidad del agua y monitoreo hidrológico en el proyecto de desarrollo de actividades petroleras, sección Delta Grijalva.

No	Estación	UTM X	UTM Y
DG_CA-10	Laguna Mecoacán 1, Boca Negra	488000	2035615
DG_CA-11	Laguna Mecoacán 2, Boca Grande	483473	2036014
DG_CA-12	Laguna Mecoacán 3, Boca Limón	481534	2034431
DG_CA-13	Laguna Mecoacán 4, Boca El Hormiguero	482621	2030752
DG_CA-14	Laguna Mecoacán 5, Boca los Ángeles	490822	2031666
DG_CA-15	Laguna Mecoacán 6, Boca Arrastradero	492777	2034776



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Toma de muestra

Las muestras de agua fueron colectadas en forma superficial en frascos de vidrio estériles y se colectaron entre 20 y 30 almejas, almacenándolas para su transporte en bolsas plásticas con cierre hermético. Ambas muestras fueron transportadas en condiciones de refrigeración, 4 °C, al Laboratorio de Microbiología de la División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, donde se procesaron en forma inmediata.

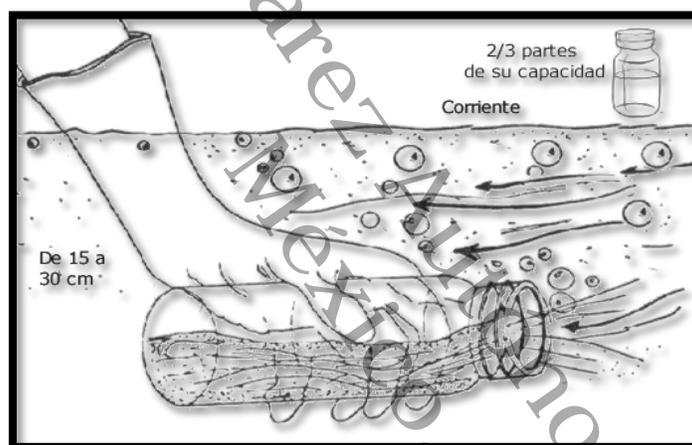


Figura 2. Técnica de muestreo empleada para muestras simples de aguas superficiales (Modificada, Anónimo, 1978).

6.2 Determinación para la identificación del grupo de los coliformes

Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable (NMP).

Se basa en la dilución de las muestras en tubos múltiples, de tal forma se busca obtener que todos los tubos con menor dilución sean positivos, en el caso contrario, que todos los tubos de la dilución más alta sean negativos. Sin embargo, la lectura de los resultados de las muestras se leen positivos (+) con la presencia de gas o crecimiento microbiano.



6.3 Determinación de bacterias del grupo coliforme

Coliformes fecales

Para la determinación del grupo coliformes, se realizó según el método del Número más Probable o NMP, de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009. Que consiste en dos etapas, la prueba presuntiva y la confirmativa.

En el caso de los coliformes en los organismos (almejas) se pesaron 10 g de muestra y se transfirió a una jarra de licuadora asépticamente estéril con 90 ml de diluyente, se homogenizó durante 1 a 2 minutos, hasta lograr obtener una suspensión completa y homogénea.

Prueba Presuntiva

Para las muestras de agua se realizaron diluciones de 10, 1, 0.1 y 0.01 ml; con serie de 3 tubos con dispositivo de Durham (tubos de fermentación).

En el caso del homogenizado se dejó sedimentar, se transfirió la cantidad deseada, tomando de la capa superior de la suspensión. Se realizaron diluciones seriales a partir de 10, 1, 0.1 y 0.01. El medio que se utilizó fue el Caldo Lauril Sulfato de Sodio (LSS) con dispositivo de Durham; incubando a 35 ± 0.5 °C durante 48 h. Para ambas matrices (agua y organismos) se realizó la misma metodología para la determinación de coliformes fecales y totales.

Los Coliformes producen gas a partir de la glucosa y fermentación de la lactosa en un periodo de 48 h de incubación a 35 ± 0.5 °C (Coliformes). Los tubos positivos son aquellos que presentan gas en el dispositivo de Durham posterior al tiempo de incubación. Los tubos negativos no presentan dicha característica mencionada anteriormente.

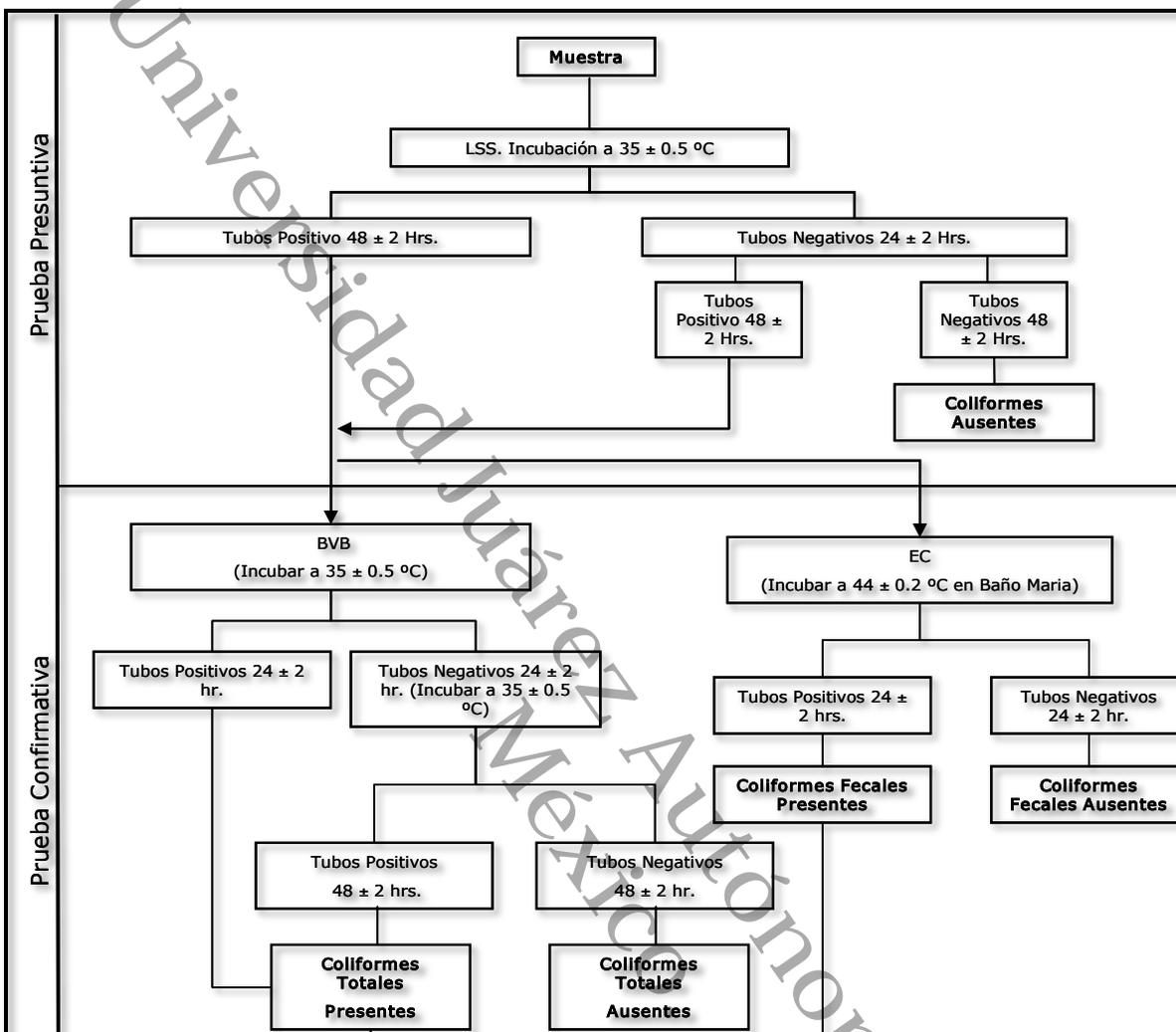


Figura 3. Diagrama de flujo para la determinación de CT y CF, utilizando la técnica de NMP (Número Más Probable). Vásquez, L. (2006). Tesis de licenciatura.

Los tubos se leyeron cuando cumplieron las 24 h de incubación, los cuales se agitaron y se observaron la formación de burbuja de gas y desplazamiento del medio en el tubo de hemólisis. Los tubos que presentaron las características formando gas, se consideraron positivos (+), los tubos que se caracterizaron negativos (-), se pre incubaron durante un periodo de 24 h. La formación de gas dentro de un periodo de 48 ± 2 h, constituye a una prueba presuntiva positiva y da un indicio de la presencia de coliformes. Sin embargo la ausencia de gas al final de las 48 ± 2 h indica una prueba negativa (-), en este caso se dice que es ausente los coliformes.

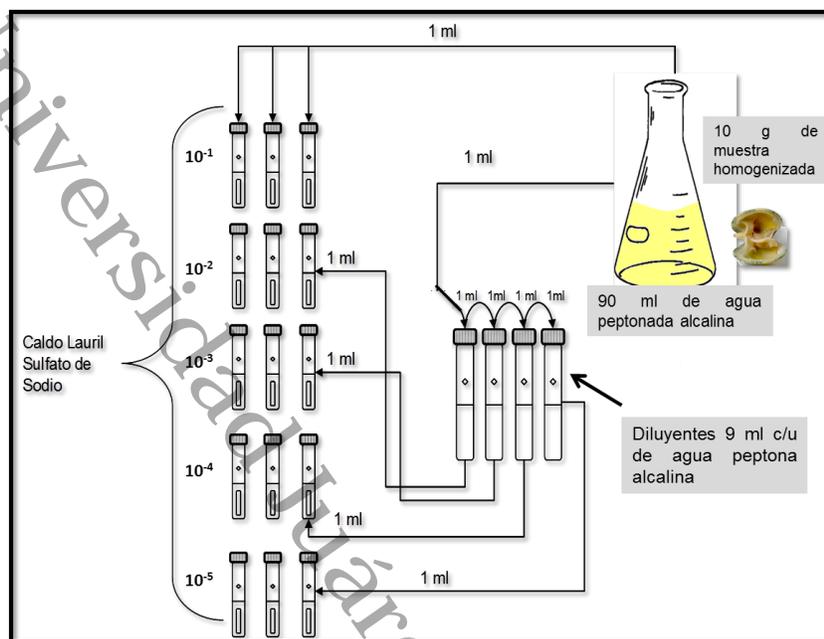


Figura 4. Esquema general de las diluciones, para la detección de coliformes por el método de NMP.

Prueba confirmativa

En este caso cada tubo que presentó la característica formadora de gas, se tomó 3 asadas del medio de cultivo y se sembró en un número igual de tubos con medio de confirmación. Posteriormente se incubó a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 h o si la formación de gas no se observó en este tiempo, se prolongó la incubación por 48 ± 2 h.

Coliformes Totales

Para la búsqueda de los CT, los tubos positivos de la prueba presuntiva, fueron resembrados con un asa de siembra asépticamente, en tubos de fermentación lo cual contenían medio de enriquecimiento caldo lactosa Bilis Verde Brillante al 2% (BVB), incubándolos a $35 \pm 0,5$ °C durante un periodo de 48 ± 2 h. Posteriormente los tubos que presentaron fermentación o gas se consideraron positivos (+), en el caso de la ausencia de gas al final del periodo de las 48 ± 2 h, se indicó la ausencia del grupo CT.



Figura 5. Prueba confirmativa, resiembra de tubo positivo (+) de CT Caldo Lauril Sulfato de Sodio (LSS), a medio de enriquecimiento caldo lactosa Bilis Verde Brillante al 2 % (BVB).

Coliformes Fecales

Para la búsqueda de CF, se realizó a través de tubos que contenían medio de enriquecimiento EC (*Escherichia coli*), posteriormente se prosiguió a la incubación en el baño de agua (baño maría), con termo circulación aproximadamente de 44.5 ± 0.5 °C. Posteriormente las lecturas se realizaron en un periodo de 24 ± 2 h, tomando las características de los tubos que presentaron la formación de gas en la campana de Durham, estos se consideraron como positivos (+), en el caso de ausencia de gas al final de las 24 ± 2 h, se indicaron como pruebas negativas (-).



Figura 6. a) Prueba confirmativa para la búsqueda de CF, resiembra de tubo positivo (+) de CT Caldo Lauril Sulfato de Sodio (LSS), a medio de enriquecimiento EC. **b)** Incubación de los tubos en el baño de agua (baño maría) a 44.5 ± 0.5 °C, durante un periodo de 24 ± 2 h.



Expresión de los resultados de los Coliformes

Para la expresión de los resultados, se tomó la serie de los tubos de la prueba confirmativa, que dieron formación de gas después del periodo de incubación requerido y se buscó en la tabla de NMP los resultados correspondientes.

Cuando solo una dilución mostro tres tubos positivos, se eligió esta, y posteriormente las diluciones siguientes, cuando más de una dilución mostro tres tubos positivos y la última dio menos tres, se eligió esta última y las dos diluciones anteriores más bajas, sin embargo, cuando en ninguna dilución se encontró tres tubos positivos, y estos lo pudimos encontrar en más de tres diluciones, se seleccionaron las dos diluciones mayores positivas y la siguiente.

Cuando los tubos positivos se encontraron en la muestra sin diluir (10 ml o 1 g) y en la primera dilución (1ml o 10^{-1}) se seleccionaron las tres primeras diluciones para el cálculo del NMP.

Esta técnica de NMP pudo admitir una gran cantidad de variaciones, los resultados que se obtuvieron con esta técnica fueron utilizados con cuidado. Los límites de confianza para cada muestra sólida con un NMP de 70 coliformes por g, su límite de confianza es del 95 %, en algunos casos variaron de 10 a 230 coliformes por g.

6.4 Determinación de *Salmonella*

Fase 1.

La determinación de *Salmonella* se siguió la metodología de acuerdo a la NOM-242-SSA1-2009, Productos y Servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

Las conchas de los moluscos bivalvos se desinfectaron con un cepillo estéril y enjuagando con agua corriente, desprendiendo el exceso de limo y sedimento.



Se pesó asepticamente 25 g de tejido blando y líquido intervalvar, posteriormente vertiéndolo en un vaso de licuadora estéril con 225 ml de caldo lactosado, homogenizándolo durante dos minutos aproximadamente. La muestra se transfirieron a un matraz con boca ancha y tapón de rosca, dejándolo reposar 60 minutos a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada, y se determinó el pH con bandas o cintas de pH, en caso de ser necesario se ajustó a un pH de $6,8 \pm 0$, con hidroxilo de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N estériles. Incubándose durante 24 ± 2 h a una temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$.



Figura 7. a) Homogenización del tejido blando y líquido intervalvar, en medio de pre-enriquecimiento caldo lactosado. b) Transferencia del homogenizado al frasco con tapón. c) Tiras de pH.

Fase 2.

Se cerró firmemente el tapón de los matraces con cultivo de pre-enriquecimiento y se agito suavemente. Transfiriendo 1 ml de la mezcla a un tubo que contenía 10 ml de caldo tetrionato agregando una solución de yoduro-yodurado y caldo Vassiliadis Rappaport, incubados a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 18-24 h.

Posteriormente los tubos con solución mencionados en el párrafo anterior, fueron agitados para ser estriados xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB), y agar *salmonella-shigella* (SS), incubando a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Las cepas fueron caracterizadas de acuerdo al



medio correspondiente, de acuerdo a los siguientes criterios: color, forma, elevación y margen (Figura 9).

Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En ocasiones pueden aparecer las colonias completamente negras.

Agar VB: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes redondas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de lactosa dan colonias amarillas.

Agar sulfito bismuto: las colonias típicas de *Salmonella* pueden ser cafés, grises o negras; con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación de halo oscuro. Si las placas no muestran colonias típicas o no se observa crecimiento, incubar 24 h adicionales.

Agar *Salmonella Shigella* (SS): colonias translucidas, ocasionalmente opacas. Algunas colonias fermentadoras de lactosa son rojas.

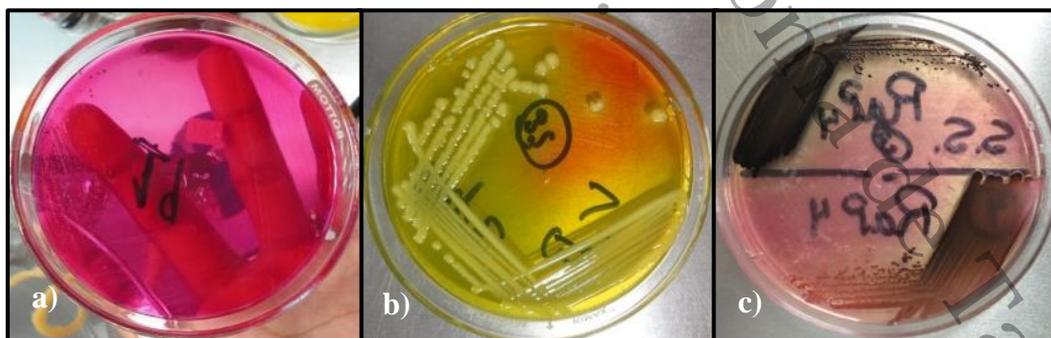


Figura 8. Características de *Salmonella* en los diferentes medios de cultivos. a) agar XLD. b) agar VB. c) agar SS.

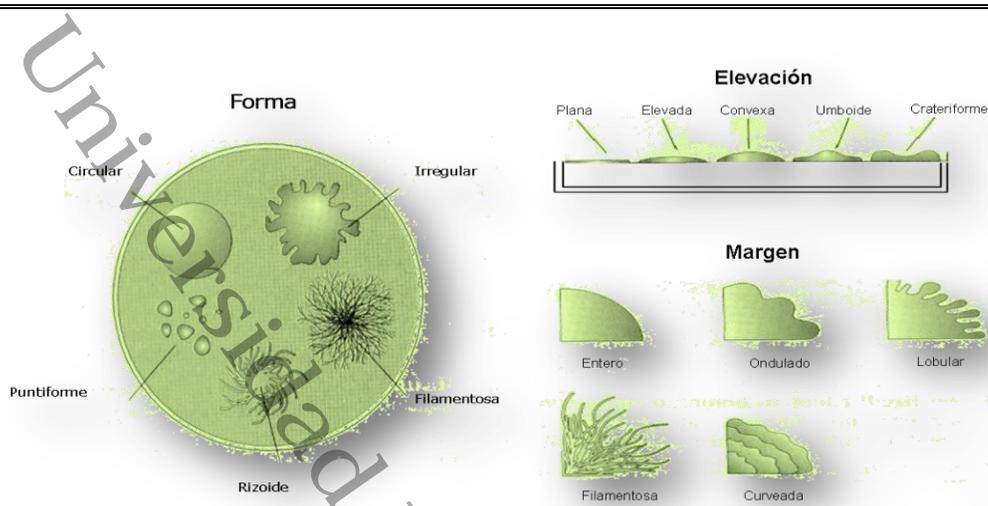


Figura 9. Terminología estándar para la caracterización de una colonia bacteriana (Modificada de Alcamo, 2001).

Fase 3.

Las cepas seleccionadas de cada medio de cultivo mencionado en el párrafo anterior, se identificaron bioquímicamente utilizando los siguientes medios de cultivo: agar triple hierro azúcar (TSI), agar hierro lisina (LIA) y medio MIO, incubándose a 35 °C durante 24 ± 2 h. Además se aplicó el sistema bioquímico miniaturizado API NE de la marca (Biomérieux ®).



Figura 10. Medios de cultivos. **a)** agar triple hierro azúcar (TSI). **b)** agar hierro lisina (LIA). **c)** Medio MIO.



Una vez transcurrido el tiempo establecido de incubación, se observó el crecimiento en los tubos, lo cual se consideraron presuntivamente positivo *Salmonella*, las colonias que presentaron las siguientes reacciones:

Agar TSI: en el fondo del tubo se observó un vire del indicador, debido a la fermentación de la glucosa, en la superficie del medio se observó un color más rojo intenso, que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de sacarosa. En la mayoría de los casos pudimos observar coloración negra a lo largo de la punción, esto se debió a la producción de ácido sulfhídrico.

Agar LIA: se observó intensificación de color purpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Se consideró negativo a aquellos cultivos que produjeron claramente color amarillo en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de *Salmonella* produjeron ácido sulfhídrico en este medio se presentó con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

6.5 Fase de identificación para la determinación de *Vibrio* en muestras de moluscos.

Fase 1

La fase primaria de análisis consistió en la limpieza de las conchas de los moluscos debajo de agua corriente, por lo cual fueron desinfectados con agua corriente y eliminando los residuos de sedimentos con un cepillo. Luego con la ayuda de un cuchillo estéril se abrieron y posteriormente se pesaron un total de 50 g de tejido blando y líquido intervalvar, se introdujo a un vaso de licuadora estéril, y se agregó 450 ml de agua peptonada alcalina, se licuó para homogenizar durante aproximadamente dos minutos a alta velocidad.

Una vez lista la homogenización se procedió a los tubos los cuales estaban estériles, uno de ellos estaba vacío y los dos restantes contenían peptona alcalina lo cual era necesario para el medio de



cultivo. Por cual se prosiguió las diluciones de series de 3, lo cual al primer tubo se le agrego 10 ml de muestra directa, y dos diluciones de 0.01 y 0.001. Este proceso se realizó por duplicado, incubando a 35 °C y otras a 42 °C, durante 24 h.

Fase 2

Transcurrido el tiempo de incubación mencionado en el párrafo anterior, se prosiguió a la segunda fase, consistiendo en resembrar las muestras, transfiriendo el inóculo sin agitar la película (crecimiento superficial) con una asa de 3-5 mm de diámetro, estriando con la técnica de cola de ratón a una placa de medio de cultivo selectivo agar TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa), e incubando durante 18 a 24 h a 35 °C.

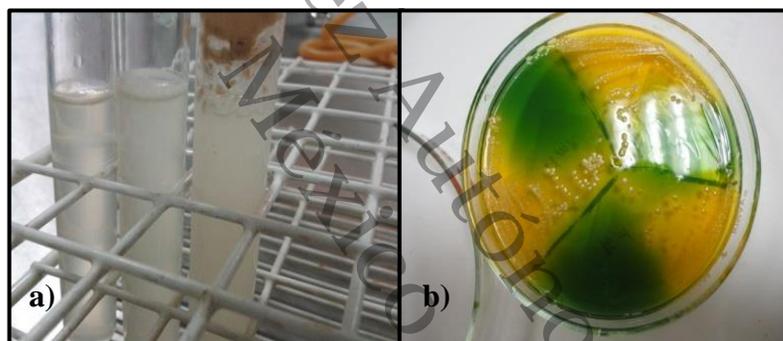


Figura 11. a) Inóculo de la biopelícula bacteriana en medio de cultivo peptona alcalina sin agitar. b) Técnica del estriado de cola de ratón, en agar TCBS.

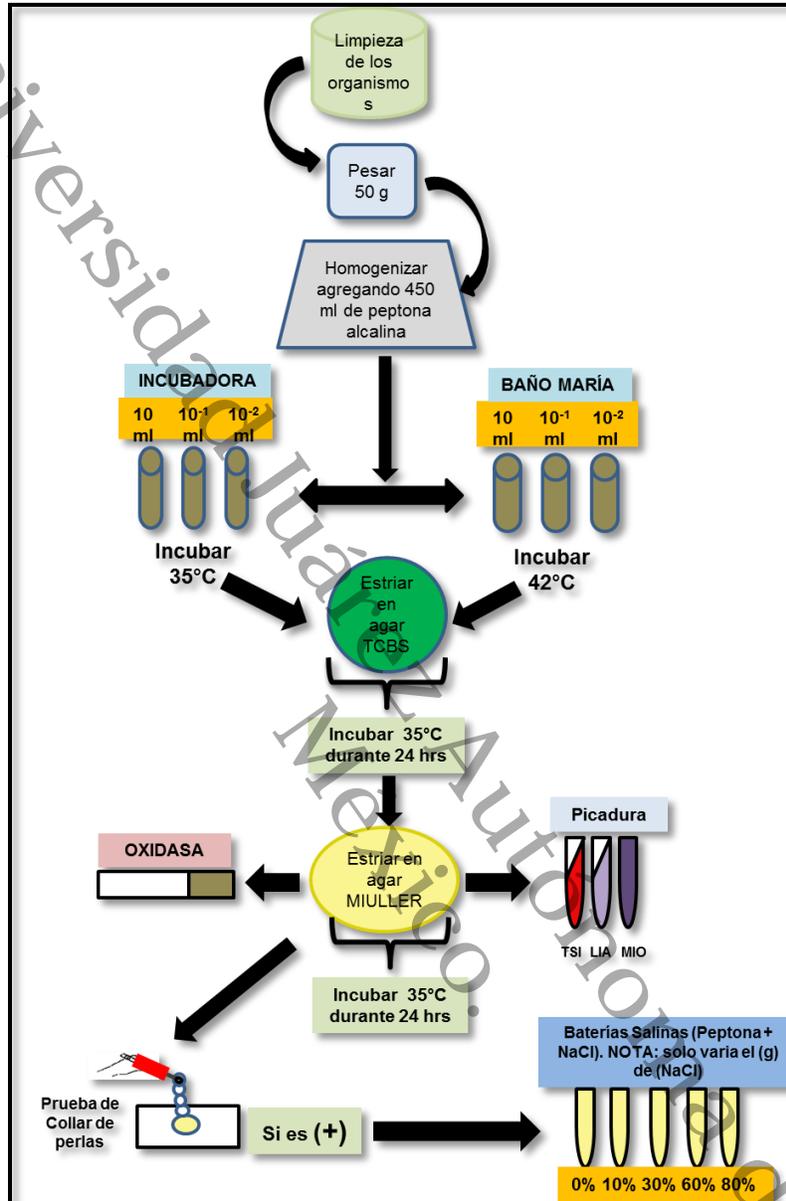


Figura 12. Diagrama para la identificación de *Vibrio cholerae*.

Morfología colonial

Las colonias de *V. cholerae* son aquellas que presentan las características grandes, lisas, amarillas (positivas para la fermentación de sacarosa) y ligeramente planas, con el centro opaco y borde translúcido, además se encuentran especies de *Vibrio* lo cual crecen en medio de cultivo agar TCBS y producen colonias amarillas y verdes.



Si se encontró la presencia de colonias con las características antes mencionadas, se seleccionaron las diferentes colonias sospechosas de cada placa y se transfirieron a agar soya tripticasa al 2 % de NaCl, se incubaron durante 24 h a 35 °C.

Pruebas de oxidasa

Del inóculo del agar soya tripticasa al 2 % de NaCl, se tomó con un aplicador de madera una proporción de cepa, se depositó la muestra en una banda que contenía el reactivo de oxidasa y se obtuvo el resultado, si la oxidasa era positiva (+) o negativa (-). Las especies patógenas son oxidasa positiva (+).

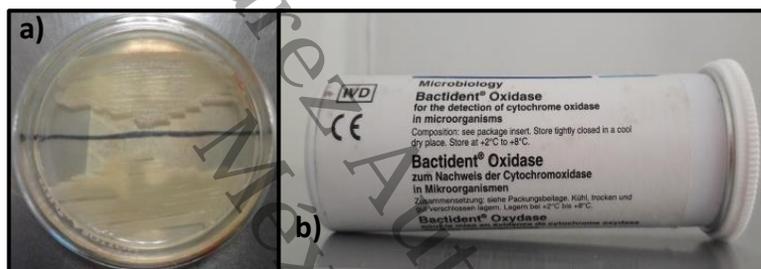


Figura 13. a) Cepa en agar soya tripticasa al 2 % de NaCl. b) Tiras para la prueba de Oxidasa.

Prueba de collar de perlas

Consistió en poner en un porta objetos una gota del reactivo desoxicolato de sodio, luego se tomó con un asa estéril una proporción de cepa y se homogenizo (haciendo un frotis suavemente) con el aplicador (asa) y se levantó, si este se formó un collar o hilo se tomó positiva, se procedió posteriormente a identificar por medio de una galería de bioquímicas.

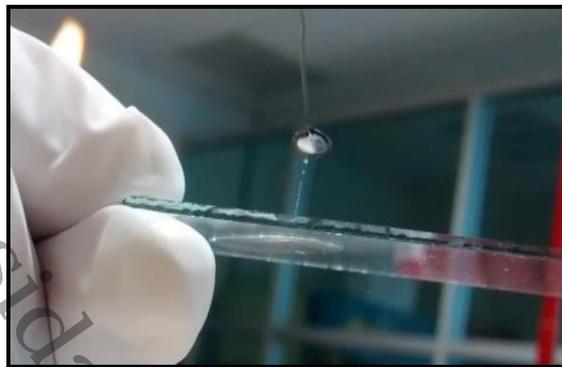


Figura 14. Prueba positiva (+), collar de perlas.

Pruebas bioquímicas para la confirmación de *Vibrio*

Las reacciones bioquímicas para la identificación de *V. cholerae* y otras especies bacterianas a fines, fue compuesta por los siguientes reactivos:

La fórmula para todos los medios bioquímicos debió contener por lo menos un 2 % de NaCl. En vez de medios convencionales se utilizaron tiras API 20 E, con 2 % de NaCl como diluyente.

Para el *V. cholerae* se utilizó solución salina fisiológica (0,85 % de NaCl) como diluyente.

Identificación taxonómica

La identificación de cada una de las cepas diferentes de *Vibrio*, *salmonella* y enterobacterias se aplicó el método miniaturizado API WEB (Biomérieux®).

Las cepas bacterianas debieron presentar una morfología de bastones Gram negativos y estos no son fermentadores de lactosa, por lo cual se utilizó el sistema 20 NE, lo cual permitió identificar los bacilos Gram negativos, que no pertenecen al grupo de las enterobacterias.

La galería del sistema 20 NE está compuesta por un total de 20 cúpulas (microtubos), lo cual contiene diferentes sustratos químicos deshidratados, en las que ocho cúpulas son pruebas bioquímicas y doce de asimilación, además como complemento se realizó la prueba de oxidasa.



Tabla 1. Lectura de los diferentes pruebas bioquímicas para la identificación de bacilos Gram Negativos no fermentadores de lactosa (API 20 NE).

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	CANT. (mg/cúp.)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
NO₃	Nitrato potásico	0,136	Reducción de Nitratos en nitritos	<u>NIT1+NIT2 /5 min</u>	
				incoloro	rosa-rojo
TPR	L-triptofano	0,2	Reducción de Nitratos en nitrógeno	<u>Zn/5 min</u>	
				rosa	incoloro
GLU	D-glucosa	1,92	Formación de índole (TRiPtofano)	<u>JAMES / inmediato</u>	
					Incoloro verde pálido/amarillo
ADH	L-arginina	1,92	Fermentación (GLUcosa)	Azul verde	amarillo
URE	L-arginina	1,92	Arginina DiHidrolasa	amarillo	Naranja / rosa /rojo
URE	Urea	0,76	UREasa	amarillo	Naranja / rosa /rojo
ESC	Esculina citrato férrico	0,56	Hidrólisis (β-glucosidasa)(ESCulina)	amarillo	Gris /
		0,072			marrón / negro
GEL	Gelatina (origen bovino)	0,6	Hidrólisis (proteasa)(GELatina)	Sin difusión del pigmento	Difusión del pigmento negro
PNPG	4-nitrofenil-βD- galactopiranosida	0,22	B-galactosidasa (Para-NitroFenil-βD- galactosidasa)	incoloro	amarillo
GLU	D-glucosa	1,56	Asimilación (GLUcosa)	Transparencia	Turbio
ARA	L-arabinosa	1,4	Asimilación (ARAbinosa)	Transparencia	Turbio
MNE	D-manosa	1,4	Asimilación (MaNoSa)	Transparencia	Turbio
MAN	D-manitol	1,36	Asimilación (MANitol)	Transparencia	Turbio
NAG	N-acetil-glucosamina	1,28	Asimilación (N-Acetil-Glucosamina)	Transparencia	Turbio
MAL	D-maltosa	1,4	Asimilación (MALtosa)	Transparencia	Turbio
GNT	Gluconato potasico	1,84	Asimilación (GlucoNaTo potásico)	Transparencia	Turbio
CAP	Ácido cáprico	0,78	Asimilación (ácido CAPrico)	Transparencia	Turbio
ADI		1,12	Asimilación (ácido ADIpico)	Transparencia	Turbio
MLT	Ácido málico	1,56	Asimilación (MaLaTa)	Transparencia	Turbio
CIT	Citrato trisódico	2,28	Asimilación (CITrato trisódico)	Transparencia	Turbio
PAC	Ácido fenilacético	0,8	Asimilación (ácido fenilACético)	Transparencia	Turbio
OX	(ver ficha técnica del ensayo de oxidasa)	-	Citocromo-oxidasa	(ver ficha técnica del ensayo de oxidasa)	



Preparación de las galerías API 20 NE (Biomérieux®)

Para las cepas bacterianas con morfología de bastones, Gram negativas y fermentadoras de lactosa, se utilizó el sistema API 20 E, y se identificó a aquellas bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y en entre ellos otros bacilos Gram negativos. La galería está compuesta por 20 cúpulas (microtubos) que contienen diferentes sustratos químicos deshidratados, para un total de 23 pruebas bioquímicas diferentes.

Preparación del inóculo para las pruebas API 20 NE (Biomérieux®)

Cada una de las cepas fueron sembrada en placas con Agar Miuller Hinton (Bioxon®) con el objeto de obtener suficiente material biológico para la inoculación de las galerías e incubándolas posteriormente durante 24 h a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de la incubación transcurrida, se realizó una suspensión bacteriana en 10 ml de solución salina al (0.85 %) hasta lograr obtener una turbidez según él tuvo de 0.5 de la escala de McFarland.



Figura 15. a) Cepas bacterianas estriadas en Agar Miuller Hinton (Bioxon®). b) Suspensión bacteriana en 10 ml de solución salina al (0.85 %). (Anónimo, 2018).

Inoculación de las galerías de las pruebas API 20 NE (Biomérieux®)

Las cúpulas (microtubos) fueron llenados con 150 μl de la suspensión bacteriana con la ayuda de una micropipeta con puntas estériles, de esta manera se evitó la formación de burbujas. Una vez preparadas las galerías se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, debido al efecto del metabolismo bacteriano se produjeron cambios de colores espontáneos o bien al añadir reactivos.



complementarios. Posteriormente la lectura de los resultados se realizó de acuerdo a las reacciones positivas o negativas, y así mismo coloración de cada microtubos.

Obtenidos los resultados se introdujeron en un software de identificación de API webTM, el cual es un sistema que se encuentra en línea y que proporciona la identificación de la cepa a estudiar y el porcentaje de confiabilidad de la identificación.

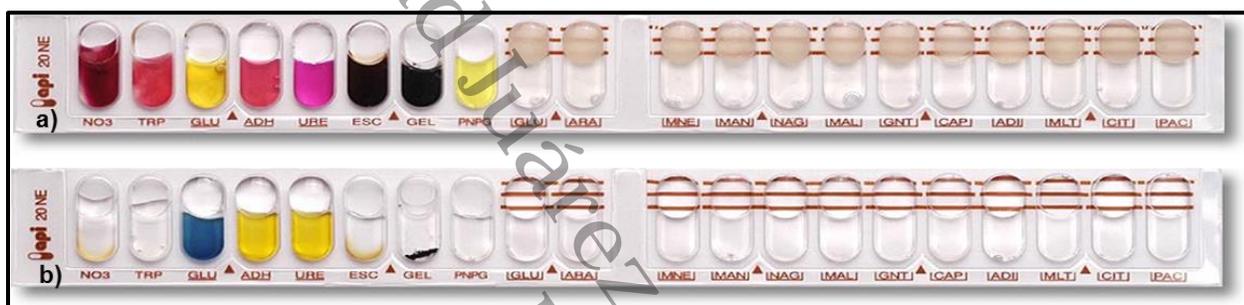


Figura 16. Galería API NE (Biomérieux®). **a)** Pruebas negativas, **b)** Pruebas positivas.

En las pruebas de ensayos de asimilación de la galería API 20 NE (Biomérieux®), se utilizó una ampolleta complementaria API AUX Medium, transfiriendo 200 μ l de la suspensión bacteriana, se agitó constantemente con la misma punta colocada en la micropipeta, hasta lograr completamente la homogenización de la muestra con el reactivo. Con esta suspensión generada se llenó hasta su máxima capacidad cada una de las siguientes cúpulas (microtubos): GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT y PAC.

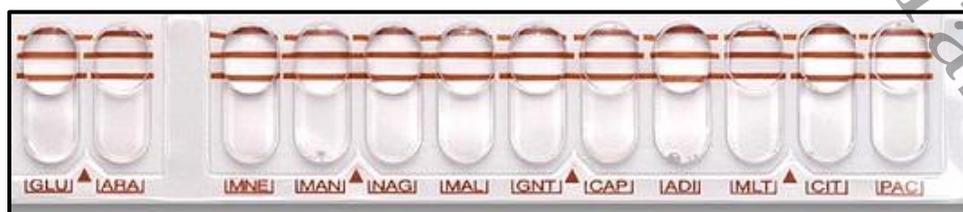


Figura 17. Galería API 20NE (Biomérieux®).



7. LITERATURA CITADA

- Berrera, E., Wong, C., Sobrino, F., Guzmán, G., Hernández, G., y Saavedra, V. (1998). Estudio preliminar de contaminación bacteriológica en la Laguna Pueblo Viejo, Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 14(2), 63-68 pp.
- Bertullo, E., y Pollak, A. (2001). Análisis de peligros y Evaluación de riesgos en productos pesqueros sensibles comercializados en el Uruguay. T. Basañez (presidencia), (título congreso). Simposio llevado a cabo en el VII Congreso Nacional de Veterinaria, Uruguay, Uruguay.
- Caballero, T. (ed.). (2008). *Temas de higiene de los alimentos*. La Habana, Cuba. Editorial Ciencias Médicas. 387 p.
- Fimia, D., Vázquez, P., Luis, R., Cepero, R., y Pereyra, M. (2010). Malacofauna fluvial con importancia médica en el municipio Yaguajay, Sancti Spiritus. *Revista Cubana Médica Tropical*, 62(1), 11-15 pp.
- Gómez, C. (2005). *Cryptosporidium en moluscos bivalvos* (tesis de doctora). Universidad de Santiago de Compostela, España.
- González, G., Torres, R., y Chiroles, R. (2003). Calidad microbiológica de aguas costeras en climas tropicales. *Cub@: Medio Ambiente y Desarrollo, Revista Electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, 3(4), ISSN-1683-8904 pp.
- Graü, C., Barbera, A., Zerpa, A., Silva, S., y Gallardo, O. (2004). Aislamiento de *Vibrio ssp.*, y Evaluación de la condición sanitaria de los moluscos Bivalvos *Arca zebra* y *Perna perna*.



- procedentes de la costa nororiental de estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica*, 14(6), 513-521 pp.
- Herrera, A., y Suárez, P. (2005). Indicadores bacterianos como herramientas para medir la calidad ambiental del agua costera. *Interciencia*, 30 (3), 171-176 pp.
- López, H., Pardo, S., y Williams, J. (2014). Evaluación del riesgo microbiológico a *Vibrio ssp.*, en alimentos de origen marino México. *Salud Publica de México*, 56(3), 295-301 pp.
- Madigan, T., Martinko, M., Dunlap, V., y Clark, P. (ed.12^a). (2009). *Biología de los microorganismos*. Madrid, España: Pearson Educación. 1296 pp.
- Marañón, N., Ochoa, L., Espigares, R., y Moreno, R. (2013). Moluscos bivalvos como agentes transmisores de infecciones víricas. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 13(2), 961-967 pp.
- Martínez, N., y Villalobos, B. (2005). *Escherichia coli* enteropatógena en moluscos crudos y cocidos. *Revista Científica*, 15(2), 163-167 pp.
- Martínez, T., Fuentes, M., Achoy, L., Castelo, R., Silveira, R., y Artiles., A. (2014). Calidad microbiológica de *Perna viridis* (LINNÉ, 1758) de la bahía Cienfuegos, Cuba. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 31(2), 23-29 pp.
- Montiel, M., Silva, R., Núñez, J., Espinoza, N., y Morales, R. (2011). Indicadores bacterianos y materia inorgánica en la almeja *Rangia cuneata* y su relación con el agua y sedimento. *Revista de la Universidad de Zulia*, 2(3), 66-78 pp.
- Moreno, R., (2012). *Prevalencia de norovirus en moluscos bivalvos y su relación con indicadores de contaminación* (tesis doctoral). Universidad de Granada, España.



- Morillo, N., Rondón, I., Valero, K., y Uzcátegui, S. (2007). Bacterias patógenas en carne de cangrejo comercializado fresco y pasteurizado, Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica*, 17 (3), 288-293 pp.
- Muñoz, D., Graü de Marín, C., Villalobos de B, B., Marval, H., Martínez, C., y Zerpa, A. (2010). Uso del *Clostridium perfringens* como indicador de contaminación fecal en zonas de cultivo de moluscos bivalvos en el estado de Sucre, Venezuela. *Revista Científica*, 20 (6), 575-583 pp.
- Muñoz, D., Graü de Marín, C., Villalobos de B., Martínez, C., y Zerpa, A. (2008). Indicadores bacterianos en los mejillones *Perna perna* (LINNÉ, 1758) y *P. viridis* (LINNÉ, 1758) y en las aguas de extracción de bivalvos precedentes de la costa Norte y Sur de estado Sucre, Venezuela. *Revista Científica*, 18(5), 595-606 pp.
- Negrete, R., y Romero, J. (2010). Carga bacteriana en ostión (*Crassostrea virginica*), desde su recolecta hasta su consumo. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, 10(20), 75-1001 pp.
- Padrón, L., Vázquez, C., Montero, R., y Rangel, L. (2010). Calidad bacteriológica de la almeja de agua dulce *Lampsilis tampicoensis* en la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla. En el L.J. Rangel. (ed. 1^a). *Perspectivas en Malacología Mexicana* (pp. 205-218). Villahermosa, Tabasco, México: José N. Roviroso Biodiversidad, Desarrollo Sustentable y Trópico Húmedo.
- Quiñones, R., Vázquez, S., Pedroche., Moreno, S., y Rodas, S. (2000). Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella*, y detección de los coliformes fecales en almejas del Golfo de México. *Hidrobiológica*, 10(2), 31-138 pp.



Ruppert, E., y Barnes. (1996). (ed. 6^a). *Zoología de los vertebrados*. Madrid, España. McGRAW-HILL INTERAMERICANA. 1114 pp.

Secretaría de Gobernación. DOF. Secretaría de Salud (SSA). Norma Oficial Mexicana. NOM-242-SSA1-2019. Productos y Servicios. Productos de la Pesca Frescos, Refrigerados, Congelados y Procesados. Especificaciones Sanitarias y Métodos de Prueba. México; 2011. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5177531&fecha=10/02/2011

Téllez, J., Oliva, M., Ramírez de León, A., y Vázquez, M. (2009). Evaluación de la calidad microbiológica del ostión de la Laguna Madre de Tamaulipas, México. *Ciencias Tecnológicas de los Alimentos*, 2(3), 152-157 pp.

Treviño, G. (1995). *Clasificación de la calidad sanitaria del agua en área de cultivo de moluscos bivalvos en la zona de la cooperativa bahía Tortugas (BCS)* (tesis de pregrado). Instituto Politécnico Nacional, La Paz, Baja California Sur, México.

Winn, C., Allen, D., Janda, M., Koneman, W., Procop, W., Schreckenberger, C., y Goods, L. (ed. 6^a). *Diagnostico microbiológico*. Madrid, España. Medica Panamericana. 1475 pp.



CAPITULO II. ARTÍCULO

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



**Bacterias coliformes, *Salmonella* y *Vibrio cholerae* en dos especies de moluscos bivalvos
Crassostrea virginica y *Branchiodonte exustus* de la laguna Mecoacán.**

Coliform bacteria, *Salmonella* and *Vibrio cholerae* in two species of

Bivalve mollusks *Crassostrea virginica* and *Branchiodonte exustus* of the Mecoacan lagoon.

Santo D. López-Sánchez^{a,*}, Lucero Vázquez-Cruz^a, Rosa M. Padrón-López^a, Luis J. Rangel-Ruiz^b, María L. Torres-Pérez^a, Gloria I. García-de la Cruz^a.

^aLaboratorio de Microbiología. División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIol), Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5, entronque con Bosques de Saloya, C.P. 94250, Villahermosa, Tabasco, México. E-mail: lopezdoming@hotmail.com.

^bLaboratorio de Malacología. División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIol), Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5, entronque con Bosques de Saloya, C.P. 94250, Villahermosa, Tabasco, México.

2.1 RESUMEN

La laguna Mecoacán, se localiza en el estado de Tabasco, alberga especies de gasterópodos, bivalvos y una gran diversidad de peces. Económicamente los bivalvos son de gran interés, debido a que *C. virginica* presenta una alta demanda en la zona, ya que sea consumido en crudo, semi crudo o adquirido en su concha, beneficiándose principalmente la población local. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de coliformes fecales, *Salmonella* y *Vibrio cholerae* en dos especies de moluscos bivalvos *C. virginica* y *B. exustus*. Los muestreos se realizaron en temporadas de secas y lluvias (2014-2015), en seis sitios. Para la determinación de los coliformes, *Salmonella* y *V. cholerae* en tejido y líquido intervalvar se utilizó la NOM-242-SSA1-2009 y para agua la NMX-AA-042-SCFI-2015. El 80 % de las muestras excedieron los límites permisibles 230 CF/100 g, según la normatividad vigente. Las muestras de agua provenientes de los sitios de extracción de los organismos, excedieron el 70 % (200 CF/100 ml), por lo tanto no son aptas para su uso recreacional y para la vida acuática de acuerdo a la normatividad establecida vigente. Se identificó a especies como, *Salmonella entérica ssp. arizonae*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*.



Palabras claves: Coliformes, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, Moluscos Bivalvos, Mecoacán.

2.2 ABSTRACT

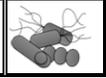
Mecoacan Lagoon, state of Tabasco, harbors a large diversity of fish, bivalves, and gastropods. Bivalves are economically important to local inhabitants due to the great demand for *C. virginica* that is consumed raw, semi-raw or sold in its shell. This paper aims to determine presence of fecal coliforms, *Salmonella* and *Vibrio cholerae*, in two bivalve mollusk species. Samples were collected during the dry and rainy season (2014-2015) in six sites. We used NOM-242-SSA1-2009 to determine coliforms *Salmonella* and *V. cholerae* in tissue and inter-valve liquid, and NMX-AA-042-SCFI-2015 for water. According to current regulation, 80% of the samples exceeded permissible limits (230 FC/100 g). Seventy percent of water samples from sites where organisms were collected exceeded 200 FC/100 ml; thus, they are not suitable for recreational use nor aquatic life according to current regulations. Identified species were: *Salmonella enterica* ssp *arizonae*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*.

KEY WORDS: Coliforms, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, Bivalve mollusks, Mecoacán.



AGRADECIMIENTOS

Al proyecto Servicio de Acreditación Ambiental y Seguimiento del Cumplimiento a Términos y Condicionantes del Proyecto Regional Delta, Grijalva, Moluscos Bivalvos, realizado en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Laboratorio de Microbiología de la División Académica de Ciencias Biológicas, por darme la oportunidad de ser partícipe de este proyecto, además por apoyarme con los materiales y reactivos que fueron necesarios.

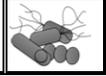


2.3 INTRODUCCIÓN

México presenta aproximadamente 137 lagunas costeras de gran diversidad biológica, valor ecológico y económico (pesca, acuicultura, extracción de hidrocarburos y minerales), la población local es la principal beneficiada, ya que obtiene su alimento y excedentes económicos. La Laguna Mecoacán, se localiza en el estado de Tabasco, hospeda especies de gasterópodos, bivalvos y una gran diversidad de peces de gran interés pesquero^{8,12}.

Los bivalvos son un producto de gran valor económico debido a que presentan una alta demanda en la zona, ya sea en crudo, poco cocido o adquirido en su concha. Anualmente en México, se produce 54,964 toneladas con un incremento anual del 2.39 %. Los estados de Tabasco y Veracruz aportan 25 y 42 % respectivamente, su principal destino de exportación es Estados Unidos de América³. El gobierno Mexicano ha establecido la NOM-242-SSA1-2009³³, que señala los requisitos sanitarios que deben contener las áreas de captura de moluscos bivalvos; los establecimientos que procesan productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados, incluyendo las embarcaciones de pesca y recolección, así como las especificaciones sanitarias que deben cumplir dichos productos.

Los moluscos bivalvos por caracterizarse como organismos suspensívoros y colectores de depósitos orgánicos, son considerados indicadores de contaminación y de estrés funcional en los ecosistemas costeros. Están ampliamente distribuidos en zonas con sustrato limo-arenoso y con poca corriente marina, ya que, son organismos que se adaptan fácilmente a cuerpos de agua cercanos a la costa o estuarios^{9,18}. El crecimiento urbano inadecuado y desordenado, actividades antropogénicas y la presencia de contaminantes, han generado eutrofización de zonas costeras^{18,23}. Muchos de estos mariscos son consumidos en crudo o poco cocidos, su calidad y cantidad de microorganismos puede variar y estar influenciadas por las precipitaciones,



descargas residuales o domésticas, metales pesados y plaguicidas. El consumo está asociado a brotes gastrointestinales, virus humanos entéricos, patógenos bacterianos como *Salmonella*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus*. Se ha reportado brotes infecciosos en Estados Unidos, Reino Unido, Australia, Japón, España, Italia, China, Canadá, Malasia, Singapur, Francia, Nueva Zelanda y México, por el consumo de los moluscos ya sea, crudo o semi crudo^{7,38}.

En México se ha registrado la prevalencia de *Vibrio spp.*, *V. cholerae* serotipo no-O1/no-O139 y *V. parahaemolyticus* en puestos de venta de mariscos en crudo (Ceviche, coctel de camarón y ostión) en el norte de la Ciudad de México, Veracruz, Tamaulipas y Tampico, entre otros²². Su prevalencia depende de las condiciones ambientales del ecosistema acuático, características fisicoquímicas y diversos aspectos ambientales que influyen en la ecología del ecosistema. El grupo coliformes, estreptococos, *Salmonella* y *V. spp.*, son monitoreados en los ecosistemas costeros a nivel mundial, principalmente las especies de *Vibrio*, causante de 7 pandemias^{23,25}.

En este estudio, se determinaron los niveles de microorganismos indicadores fecales (coliformes totales, fecales, *Vibrio* y *Salmonella*) en ostiones y mejillones (*C. virginica* y *B. exustus*) y agua (CF), (CT), en la Laguna Mecoacán, México.

2.4 MATERIALAES Y MÉTODOS

Área de estudio

La Laguna Mecoacán, Paraíso, se localiza en la parte norte del estado de Tabasco en el litoral del Golfo de México, en la Subcuenca Río Cuxcuchapa y delimitada entre los paralelos 18°24' y 18°24' Latitud N y los meridianos 93°10' y 93°5' Longitud E, asociada con sistemas deltaicos fluviales. Posee una forma alargada, con un eje principal paralelo al litoral, tiene una



profundidad promedio de 1.20 m con valores máximos de hasta 3.0 m en la barra de Dos Bocas y 5.0 m en el canal natural El Bellote (Figura 1).

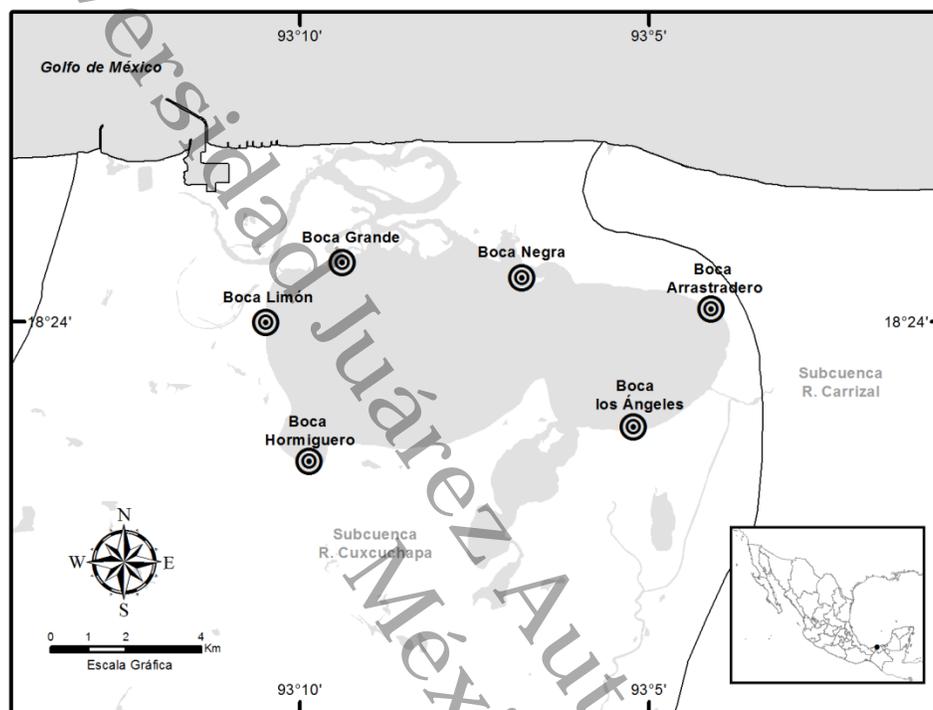
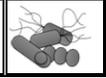


Figura 1. Distribución geográfica del área de estudio y sitios de muestreo, (ARCGIS 9.3).

Los muestreos se realizaron en mayo y octubre, correspondientes a las temporadas de Secas y Lluvias 2014 (S2014, LL2014) y 2015 (S2015, LL2015), en seis sitios de la Laguna Mecoacán: Boca Negra (B. Negra) $18^{\circ}24'38.08''N$, $93^{\circ}6'49.03''O$, Boca Grande (B. Grande) $18^{\circ}24'50.95''N$, $93^{\circ}9'23.35''O$, Boca Limón (B. Limón) $18^{\circ}23'59.39''N$, $93^{\circ}10'29.39''O$, Boca Hormiguero (B. Hormiguero) $18^{\circ}21'59.72''N$, $93^{\circ}9'52.23''O$, en estas cuatro estaciones se colectaron las sp. *B. exustus* y *C. virginica*; en el caso de Boca Los Ángeles (B. Los Ángeles) $18^{\circ}22'29'64''N$, $93^{\circ}5'12.78''O$ y Boca Arrastradero (B. Arrastradero) $18^{\circ}24'10.86''N$, $93^{\circ}4'6.19''O$ solo se encontró a *B. exustus*. Estos sitios fueron seleccionados en base a: nivel de Fragilidad (NF), Entradas y Salidas de agua o puntos de control (E/S), Aporte de Agua (AA), Conectividad (C), Cercanías a Obras (CO), Cercanías a Poblaciones (CP) y Acumulación de



Contaminantes (AC); para describir tendencias de desarrollo y el impacto ambiental que se produce.

Toma de muestras

Las muestras de agua fueron colectadas en forma superficial a contra corriente utilizando frascos de vidrio estériles (121 °C durante 15 min) con capacidad nominal de 250 ml. De forma paralela se colectaron *B. exustus* y *C. virginica* entre 20 y 30 organismos de cada especie, hasta obtener los 200 g establecidos para los análisis por cada sitio de muestreo, posteriormente se almacenaron en bolsas plásticas con cierre hermético. Las muestras fueron transportadas a 4 °C en neveras para su análisis, no excediendo las 48 h para organismos y 24 h para agua, según las especificaciones en las normas oficiales (NOM-210-SSA1-2014, NMX-AA-042-SCFI-2015)^{31,35}.

Preparación de los Moluscos

Los coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), *Salmonella* y *V. cholerae*, se determinaron con base a la normatividad vigente (NOM-242-SSA1-2009)³³.

Determinación del Numero Más Probable de CT y CF (NMP/100 g) en los organismos

El método de NMP consistió en dos etapas. Para la prueba presuntiva se realizaron diluciones de 1ml, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , en series de tres tubos con dispositivo de Durham, con caldo Lauril Sulfato de Sodio (LSS). Incubando a 35 ± 0.5 °C durante 48 h. Para la prueba confirmativa de CT, se utilizó caldo Verde Brillante y Bilis al 2 % (VBB); y para los CF el medio EC (*Escherichia coli*), incubando a 35 ± 0.5 °C los CT y a 44.5 ± 0.5 °C los CF, durante 48 h. Los tubos que presentaron turbidez y gas en el dispositivo de Durham en los medios de enriquecimiento (BVB) y (EC) fueron tomados como prueba positiva. Posteriormente de los tubos con medio de enriquecimiento (BVB) positivos, se tomó una asada y se inoculo en placas de Eosina Azul de Metileno (EAM), incubando a 37 °C \pm 2 h, una vez transcurrido este tiempo, se seleccionaron las



Unidades Formadoras de Colonias (UFC) morfológicamente distintas y se identificaron bioquímicamente mediante el sistema miniaturizado API 20 E.

Aislamiento de *Salmonella*

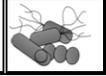
El homogeneizado de tejido blando más Caldo Lactosado (CL), fue vertido a un frasco con tapón, dejándolo reposar por 15 min, se determinó el pH de $6,8 \pm 0,2$ con tiras indicadoras, incubando a 24 ± 2 h a una temperatura de 37 °C, según la metodología descrita en la NOM-242-SSA1-2009³³.

Para el pre-enriquecimiento de la muestra se procedió a agitar suavemente el homogeneizado, transfiriendo 1 ml de este, a un tubo con 10 ml de caldo tetrionato con una solución de yoduro-yodurado. De igual forma fue inoculado 1 ml a un tubo con caldo Vassiliadis Rappaport, incubando ambos a 37 °C durante 18 ± 24 h. Después de la incubación se procedió a estriar un pequeño volumen de cada uno de los caldos de cultivo en los medios Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), Agar Verde Brillante (VB), y Agar *Salmonella* y *Shigella* (SS), incubando a 37 °C durante 24 h.

Las UFC de *Salmonella* se caracterizaron de acuerdo al medio correspondiente y a los siguientes criterios: color, elevación, margen y forma. Para la tercera fase las UFC seleccionadas de cada medio de cultivo mencionado en el párrafo anterior, se identificaron bioquímicamente utilizando los siguientes medios de cultivos: Agar Triple Hierro Azúcar (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA) y Medio MIO, incubando a 35 °C durante 24 ± 2 h.

Aislamiento de *Vibrio*

A partir del homogeneizado del tejido blando y líquido intervalvar más Agua Peptonada Alcalina (APA) se procedió a realizar diluciones de 1 ml, 10^{-1} y 10^{-2} . Este proceso se realizó, incubando a 35 °C y 42 °C, durante 24 h, respectivamente. Posteriormente, sin agitar la muestra, se transfirió

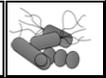


un inóculo del crecimiento superficial en placa de medio selectivo de Agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa). Incubando a 35 °C durante 18 ± 24 h.

Las UFC tomadas presuntivamente como *V. cholerae* fueron seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios: grandes, lisas, amarillas (positivas para la fermentación de sacarosa), ligeramente planas, centro opaco y borde translúcido. Estas UFC se inocularon en placas con Agar Soya Trypticosa al 2 % de NaCl, incubadas a 35 °C durante 24 h. Se les realizó las pruebas de oxidasa y de collar de perlas con desoxicolato de sodio. Además de las pruebas bioquímicas convencionales, LIA, TSI, MIO, Medio (OF).

Identificación bioquímica

Para la identificación taxonómica de las UFC elegidas presuntivamente como *Vibrio*, *Salmonella* y coliformes se aplicó el método miniaturizado API WEB (Biomérieux®). La prueba API 20 NE fue utilizada para aquellas cepas que presentaron morfología de bastones Gram negativos, no fermentadores de lactosa con las siguientes pruebas; NO³, TPR, GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG, GLU, ARA, NME, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT, PA. La galería API 20E fue aplicada a los bacilos Gram negativos, fermentadores de lactosa; ONPG, ADH, LDC, CIT, H₂S, URE, TDA, IND, VP, GEL, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA.



2.5 RESULTADOS

Las concentraciones de CT en tejido blando y líquido intervalvar de *C. virginica* y *B. exustus* durante el 2014, variaron en la temporada de secas de 43 en B. Limón a 4,600 en B. Negra y en lluvias de 210 en B. Arrastradero a 46,000 en B. Limones y B. Los Ángeles. En el 2015 en secas de 9,300 en B. Limones y B. Hormiguero a 110,000 en B. Negra, B. Grande y B. Arrastradero y en lluvias de 2,400 en B. Arrastradero a 110,000 en Negra, B. Grande y B. Los Ángeles. Y para los CF en el 2014 en la temporada de secas variaron de 23 en B. Limón a 4,600 en B. Negra; para lluvias de 90 en B. Arrastradero a 9,300 en B. Negra. Para el 2015 en secas de 700 en B. Los Ángeles a 110,000 en B. Grande; y para lluvias de 930 en B. Limón a 110,000 en B. Negra y B. Los Ángeles (Tabla 1).

Para el 2014 las mayores concentraciones promedio tanto para los CT y CF en tejido blando y líquido intervalvar se presentaron en la época de lluvias. En el 2015 los CT fueron muy similares en las dos épocas, mientras que para los CF las mayores concentraciones se presentaron en lluvias.

Tabla 1. Bacterias CT y CF en la Laguna Mecoacán durante los periodos 2014-2015 en Tejido Blando y líquido intervalvar a través del NMP/100g.

Indicador	Temporada	B.N	B.G	B.L	B.H	B.L.A	B.A	
CT	2014	S	4600	93	43	2400	93	230
		Ll	9300	4300	46000	24000	46000	210
	2015	S	110000	110000	9300	9300	46000	110000
		Ll	110000	110000	9300	46000	110000	2400
CF	2014	S	4600	93	23	90	93	70
		Ll	9300	930	4300	4300	4600	90
	2015	S	9300	110000	9300	1500	700	4300
		Ll	110000	1500	930	4300	110000	2400

BN: Boca Negra, **BG:** Boca Grande, **BL:** Boca Limón, **BH:** Boca Hormiguero, **BLA:** Boca Los Ángeles, **BA:** Boca Arrastradero.



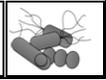
Las concentraciones de CT en agua durante 2014 variaron en la temporada de seca de 50 en B. Los Ángeles a 1,300 en B. Negra y en lluvias de 230 en B. Grande a 18,000 en B. Limón. En 2015 en secas de 20 en B. Hormiguero a 1,300 en B. Arrastradero y en lluvias de 50 en B. Grande a 2,400 en B. Los Ángeles. Y para los CF en el 2014 en la temporada de seca de 20 en B. Limón a 230 en B. Negra, para lluvias de 130 en B. Grande a 16,000 en B. Arrastradero. Para el 2015 en secas de 20 en B. Hormiguero a 1,300 en B. Arrastradero, y para lluvias vario de 50 en B. Grande a 1,700 en B. Limón y B. Hormiguero.

Para el 2014 las mayores concentraciones promedio tanto para los CT y CF en agua se presentaron en la época de lluvias. En el 2015 los CT fueron muy similares en las dos temporadas, mientras que para los CF las mayores concentraciones se presentaron en lluvias (Tabla 2).

Tabla 2. Bacterias CT y CF de agua en la Laguna Mecoacán a través del NMP/100ml durante los periodos de S y LL 2014-2015.

Indicador		Temporada	B.N	B.G	B.L	B.H	B.L.A	B.A
CT	2014	S	1300	230	270	170	50	80
		Ll	3500	230	18000	9200	1100	16000
	2015	S	330	230	230	20	790	1300
		Ll	140	50	1700	1700	2400	1100
CF	2014	S	230	130	20	50	20	50
		Ll	2400	130	9200	130	1100	16000
	2015	S	330	230	230	20	490	1300
		Ll	70	50	1700	1700	490	1100

En los análisis microbiológicos en tejido blando y líquido intervalvar de los organismos analizados, no se detectó a *V. cholerae* no O1 toxígeno, pero se aisló la presencia de *salmonella* entérica ssp. *Arizonae*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*. Se aislaron 153



cepas bacterianas agrupadas en 15 especies, pertenecientes a cinco Familias; *Aeromoneaceae*, *Burkholderiaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae* (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de las cepas bacterianas aisladas en tejido blando y liquido intervalvar de *C. virginica* y *B. exustus*.

Familia	Especie	N° de Cepas
<i>Aeromoneaceae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	36
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	10
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	27
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2
	<i>Vibrio cholerae</i>	4
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	8
	<i>Enterobacter cloacae</i>	10
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	11
	<i>Escherichia coli</i>	2
	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	8
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	7
	<i>Raoultella terrigena</i>	7
	<i>Salmonella enterica ssp arizonae</i>	8
	<i>Serratia odorifera</i>	8

En la estación B. Negra, B. Grande y B. Los Ángeles se manifestó el mayor número de especies de bacterias de importancia sanitaria como: *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica ssp arizonae*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*.

Tabla 4. Distribución de especies aisladas por estaciones en tejido blando y liquido intervalvar.

Especies	Estaciones					
	B.N	B.G	B.H	B.L	B.L.A	B.A
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	1	0	0	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	1	0	1	1
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	0	0	1



<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	0	1	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	0	1	1	0	1	1
<i>Pseudomonas luteola</i>	1	1	1	1	1	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	0	1	0	1	1	0
<i>Raoultella terrigena</i>	1	0	1	1	0	0
<i>Salmonella enterica ssp arizonae</i>	1	0	1	1	1	0
<i>Serratia odorifera</i>	1	1	1	1	1	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	1	0	0	0	1	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	0	0	1	1
Total sp.	13	8	6	7	12	7

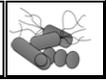


2.6 DISCUSIÓN

En este estudio se determinó, que el 80 % de las muestras en tejido blando y liquido intervalvar excedieron los 230 NMP/100 g de CF, valor establecido en las especificaciones sanitarias de la NOM-242-SSA1-2009³³, para productos pesqueros o congelados. Los moluscos al presentar una alimentación por filtración, pueden llegar a acumular en la masa visceral y lumen intestinal, diversas partículas suspendidas en la columna de agua, como consecuencia incrementan las densidades de bacterias de origen fecal u otros microorganismos autóctonos^{5,6,17}.

Los valores promedios de coliformes fecales y totales durante la época de seca (2,734 y 33,505 NMP/100 g, respectivamente), en tejido blando y liquido intervalvar, fueron menor, a la época de lluvia (21,054 y 43,126 NMP/100 g). Esto puede deberse a múltiples factores, como la fisiología y morfología de los moluscos (tamaño, excreción y tasas metabólicas). También dependen de las condiciones meteorológicas como; irradiación solar, temperatura del agua, salinidad, nutrientes y flujo del agua. En una investigación, realizada por Mignani et al. (2013), menciona que, existe una correlación positiva entre las precipitaciones y la marea alta, con las densidades de bacterias coliformes reportadas en la temporada de lluvia, a una constante recirculación del agua de mar, hacia los cuerpos costeros^{15,24}.

Los valores altos de coliformes pueden atribuirse a la presencia de descargas residuales en la zona. En el 2018, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en conjunto a Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), registraron 2,526 plantas de tratamientos de aguas residuales en operación a nivel nacional, con una capacidad de tratar de 135.6 m³/s, es decir, que el 63 % de las aguas negras, reciben un tratamiento antes de ser vertida a los ecosistemas hídricos. En Tabasco, se reporta un total de 149 plantas de tratamiento en operación.



En el municipio de Paraíso al que pertenece la Laguna Mecoacán, se reportan 3 plantas de tratamiento de aguas residuales en funcionamiento óptimo⁴.

Las descargas de aguas residuales y sin tratamiento previo, representan un riesgo para los cuerpos de agua que se encuentran aledaños, son aguas de procedencias domésticas o industriales, pueden contener bacterias, parásitos, virus y sustancias tóxicas, como metales pesados^{28,39,40}. En la laguna se observa diversas descargas residuales ilegales no tratadas, siendo un factor de riesgo para este cuerpo lagunar y para los consumidores que adquieren este producto pesquero.

El 80 % de las muestras de aguas colectadas en el área de extracción, excedieron los 200 CF NMP/100 ml, valor establecido en los criterios ecológicos de calidad de aguas (CE-CCA-001/89)³⁴. Los coliformes son indicadores sanitarios de la calidad del agua y permite establecer zonas adecuadas para la extracción de los moluscos y establecer programas sanitarios. Igawa y Olivera (2013), menciona que los moluscos, deben ser depurados antes de ser consumidos tienen la capacidad de filtrar 317.7 ml/h. Cuantificar las densidades de bacterias coliformes nos permite establecer el tipo de depuración y medidas sanitarias. La normatividad debería de incluir a otros indicadores bacterianos como; estreptococos y *E. coli*; para garantizar la seguridad sanitaria de estos organismos. El aporte de materia fecal, por contaminación no puntual, puede derivarse de granjas avícolas, porcícolas o ganaderas; sus desechos son arrastradas durante los eventos de lluvias, como lo encontrado en este estudio, para bacterias coliformes, que coinciden con reportes en Brasil y Corea^{7,11, 15,38}.

Los sitios B. Negra, B. Arrastradero, B. Grande y B. los Ángeles presentaron densidades altas de coliformes. Estos sitios presentan núcleos poblacionales, restaurantes y descargas clandestinas. En B. los Ángeles desemboca el río Cuxcuxapa y la laguna la Negrita, ambos causes

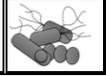


hidrológicos forman una corriente que atraviesa longitudinalmente por la laguna, hasta el paso el Bellote¹⁶. La Secretaría de Energía, Recursos Naturales y Protección Ambiental (SERNAPAM), reporta, que el río Cuxcuxapa “puente campo Mecoacán”, punto más cercano a B. arrastradero, valores de 7,900 NMP/100 ml de CF, cifras menores a las obtenidas en este trabajo (16,000 NMP/100 ml de CF), excediendo los límites permisibles de los CE-CCA-001/89³⁴. B. Arrastradero, presenta vialidades terrestres importantes que comunica a la población la Solución Somos Todos a Chiltepec^{16,32}.

El sitio B. Limón, presenta densidades elevadas de CT y CF, este punto de muestreo esta, influenciado por el arroyo Carrizal y las descargas de aguas residuales provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales ubicada en la localidad de Puerto Ceiba y los núcleos poblacionales cercanos donde existe actividad turística.

Los resultados y las características de los sitios estudiados, muestra claramente que la laguna Mecoacán, se encuentra impactada por actividades antropogénicas. La presencia de núcleos poblacionales y descarga residuales municipales o clandestinas, y las escorrentías de otros cuerpos hidrológicos, como el río Cuxcuxapa, afectan negativamente la calidad del agua de esta laguna. En zonas urbanizadas los niveles de bacterias coliformes, sobrepasan los valores establecidos por la normatividad sanitaria, ya sea, de carácter nacional e internacional^{11,16}.

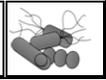
En muchos países como México, Estados Unidos, Brasil, la Unión Europa, Nueva Zelanda y Corea, han establecidos límites regulatorios en sus programas de monitoreo para la calidad de los moluscos y sus áreas de cultivos, con el objetivo de proteger la salud pública^{24,26,38}, permitiéndoles estimar la contaminación en áreas de cultivo, y así poder establecer zonas adecuadas para su extracción.



Los eventos de lluvia provocan el arrastre de materia fecal que proviene de granjas, resuspensión de los sedimentos y entrada de nutrientes, favoreciendo la eutrofización de las aguas, afectan a los mariscos, bioacumulando bacterias que pueden ser transmitidas de animales a seres humanos^{7,39}, podemos mencionar a *Salmonellas*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, por mencionar algunas. La Agencia Europea de Medio Ambiente ha reportado, que el aumento de la temperatura de la superficie del mar (TSM), provocado por el cambio climático, ha ocasionado el resurgimiento de muchas enfermedades humanas como; *V. cholerae* serogrupo no O1 y O139; *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en varios países de Europa llamadas enfermedades reemergentes²⁰.

En base a los perfiles bioquímicos, en esta investigación, se reporta a *Salmonella ssp arizonae*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*. Estas bacterias pueden causar, enfermedades gastrointestinales, vómitos, náuseas, fiebre, dolor de cabeza, septicemia en la Piel^{1,10,13,36}. Los moluscos al ser filtradores, acumulan bacterias como *Salmonella typhi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *E. coli*, *Clostridium*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus*, por mencionar algunos., al ser degustados por el consumidor y en su mayoría en crudo, pone en riesgo sanitario a la población causando cuadros gastrointestinales^{17,21,29}.

En las muestras analizadas se identificó bioquímicamente la presencia de *A. hydrophila*, *P. luteola*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *S. enterica ssp arizonae*, estas especies han sido reportadas, por otros autores en moluscos, reptiles, animales de sangre caliente, aves de corral, aguas residuales o naturales y su origen puede ser no puntual, de manera que las descargas de contaminantes pueden ser superficiales o infiltradas a través de las escorrentías que desembocan a los cuerpos de agua^{7,1,29}.



Mientras mayor sea el número de consumidores infectados la prevalencia de la enfermedad puede ir en aumento; si las descargas municipales exceden los límites regulatorios, los moluscos estarán expuestos a contaminantes de origen fecal acumulando microorganismos patógenos, y al ser consumidos en crudo, los comensales estarán en riesgo de sufrir una infección gastrointestinal y finalmente defecarán dando comienzo al ciclo, a esto se le conoce como contaminación fecohídrica³⁰.

La virulencia dependerá de la toxicidad de cada serotipo bacteriano, regulada en los genes toxigénicos, nocivas para el ser humano. Para *V. cholerae* se han definido 200 serogrupos, las cepas del serogrupo no O1 y O139 pueden producir enterotoxinas del cólera (CT) y la toxina pilus (TCP) que pueden causar epidemias²⁷.

Algunos autores, señalan que las especies de *Vibrio*, pueden llegar a causar diarreas ligeras, sin causar, todo el cuadro característico de *Vibrio*. Cabe mencionar, que en este estudio se identificó a *V. cholerae* bioquímicamente, pero es importante, realizar análisis moleculares para determinar si es un grupo serológico toxigénico, ya que son especies que pueden encontrarse en ambientes acuáticos, aguas costeras, estuarios y sedimentos, de forma natural. Algunas especies se consideran como patógenos oportunista, causando gastroenteritis, septicemia en infecciones en heridas, con altas tasas de mortalidad en personas inmunocomprometidas^{14,37}.

Los valores obtenidos en los seis sitios que fueron muestreados sobrepasaron los límites permisibles. En épocas de secas se puede observar valores bajos en comparación con la época de lluvia. Las cantidades de bacterias de origen fecal, aumentan después de un evento de lluvias, debido a las escorrentías, tienen como causa final hacia los cuerpos hidrológicos. Como una medida preventiva, con la finalidad de mitigar daños en los consumidores, Canadá y Brasil, recomiendan depurar a los moluscos por un período mayor a las 24 h., y principalmente en zonas



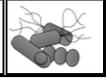
críticas donde se haya detectado valores altos de bacterias de origen fecal y después de eventos de lluvia⁷.

Finalmente, en esta investigación se determinó que durante los eventos de lluvia los valores de bacterias coliformes se incrementan, comparados con los obtenidos en seca, sin embargo, estadísticamente no fueron significativas diferentes de acuerdo con la prueba Kruskal-Wallis ($p > 0.5$).

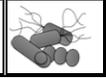


2.7 LITERATURA CITADA

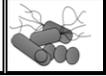
1. Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect.* 2011;13:992-1001. doi: 10.1016/j.micinf.2011.06.013.
2. Cardoso de Olivera AJF, Watanabe Pinhata JM. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus spp.* isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Res.* 2008;42:2242-2250. doi: 10.1016/j.watres.2007.12.002
3. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA), (2017). Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2017 de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Mazatlán, Sinaloa México. (SEMARNAT). pp. 300. Recuperado de: https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf
4. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), (2018). Estadísticas del agua en México 2018. (SEMARNAT). Ciudad de México. pp. 306. Disponible en: sina.conagua.gob.mx/publicaciones/EAM_2018.pdf
5. De Donno A, Grassi T, Bagordo F, Idolo A, Serio F, Gabutti G. Detection of Virus in Coastal Seawater Using *Mytilus galloprovincialis* as an Accumulation Matrix. *Food Environ Virol.* 2012;4:81-88. doi: 10.1007/s12560-012-9079-8
6. De Donno A, Liaci D, Bagordo F, Lugoli F, Gabutti G. *Mytilus galloprovincialis* as a Bioindicator of Microbiological Pollution of Coastal Waters: A Study Conducted in the Salento Peninsula (Italy). *J of Coastal Research.* 2008;24: 216-221. doi: 10.2112/05-0463.1



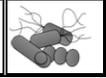
7. De Lima JV, Interaminense JA, Batista JE, Vaz RV, Ventura RF, Olivera IB, Soares RB, Peixoto SM. Coliform risk assessment through use of clam *Anomalocardia brasiliiana* as animal sentinel for shellfish harvesting áreas in Brazil's northeast. J Food Sci Technol. 2015;52:5364-69. doi: 10.1007/s13197-015-1744-0
8. Domínguez JC, Sánchez AJ, Florido R, Barba E. Distribución de macrocrustáceos en Laguna Mecoacán, al sur del Golfo de México. Hidrobiología. 2003;100:127-136. [On-line]
9. Espinoza Tenorio A, Zepeda Domínguez JA, Núñez Gómez JC, Mendoza Carranza M, Barba-Macías E. ¿DE LA INTUICIÓN AL CONOCIMIENTO CIENTÍFICO? PUBLICACIONES SOBRE LAS LAGUNAS COSTERAS DE TABASCO, MÉXICO. INTERCIENCIA. 2015;40:448-456. [On-line]
10. Esteve C, Alacaide E, Blasco MD. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Isolated from Feces, Water and Fish in Mediterranean Spain. Microbes Environ. 2012;27:367-373. doi:10.1264/jsme2.ME12009
11. Garbossa LHP, Sousa RV, Campos CJA, Vanz A, Vianna LFN, Rupp GS. Thermotolerant coliform loadings to coastal areas of Santa Catarina (Brazil) evidence the effect of growing urbanisation and insufficient provision of sewerage infrastructure. Environ Monit Assess. 2017;189:27. doi:10.1007/s10661-016-5742-0
12. García Cubas A, Escobar de la Llata F, González LV, Reguero M. MOLUSCOS DE LA LAGUNA MECOACÁN, TABASCO, MÉXICO: SISTEMÁTICA Y ECOLOGÍA. Research Gate. 1990;671:2-55. [On-line]
13. Hernández Robles MF, Álvarez Contreras AN, Juárez García P, Natividad Bonifacio I, Curiel Quesada E, Vásquez Salinas C, Quiñones Ramírez EI. Virulence factors and



- antimicrobial resistance in Environmental strains of *Vibrio alginolyticus*. Microbiolol. int. 2016;19:191-198. doi:10.2436/20.1501.01.277
14. Hossain MT, Kim EY, Lee JM, Kong IS. Detection of *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* by duplex PCR specific to the groEL gene. Fish Sci. 2013; 79: 335-340. doi. 10.1007/s12562-012-0586-1. doi: 0.1007/s12562-012-0586-1
15. Igawa Martinez D, Olivera Cardoso de AJF. FAECAL BACTERIA IN *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA: BIVALVIA) FOR BIOMONITORING COASTAL WATERS AND SEAFOOD QUALITY. Braz J Oceanogr. 2010;58:29-35.
16. INEGI.net [On-line], México: SIATL; 2012 [Actualización 2012; citado 30 ago 2018]. Disponible en: http://www.atares.inegi.org.mx/analisis/red_hidro.
17. Kucuksezgin F, Kacar A, Kucuksezgin Gokhan, Uluturhan E. Monitoring metal contamination levels and fecal pollution in clam (*Tapes decussatus*) collected from Izmir Bay (Turkey). Environ Monit Assess. 2009;162:407-415.doi: 10.1007/s10661-009-0805-0
18. Lara JR, Arreola Lizárraga JA, Calderón LE, Camacho VF, Lanza G, Escofet A, Espejel MLL, Guzmán M, Ladah LB, López M, Meling EA, Casasola PM, Reyes H, Ríos E, Zertuche JA. Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales, en Capital natural de México. Conocimiento actual de la biodiversidad, CONABIO, México. 2008;1:109-134. [On-line]
19. Le Guyader F, Le JC, Ambert K, Krol J, Serais O, Parnaudeau S, Giraudon H, Delmas G, Pommepuy M, Photier P, Atmar RL. Aichi Virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus Involved in Clinical Cases from a French Oyster-Related Gastroenteritis Outbreak. J Clin Microbiol. 2008;46:4011-4017. doi:10.1128/JCM.01044-08



20. Le Roux F, Wegner KM, Baker C, Vezzulli L, Osorio CR, Amaro C, Ritchie J, Defoirdt T, Destoumieux D, Blokesch M, Mazel D, Jacq A, Cava F, Gram L, Wendling CC, Strauch E, Kirschner A, Huehn. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris,11-12th March 2015). Front Microbiol. 2015;6:1-8. doi: 10.3389/fmicb.2015.00830
21. Lima M, Lampert MC, Rodrigues A. Evaluation of the processing of *Perna perna* mussels: the influence of water quality involved in the cooling operations in the physico-chemical and microbiological characteristics of the product. J Sci Food Agri. 2013;93:3322-3329. doi: 10.1002/jsfa.6178
22. López KM, Pardío Sedas VT, Williams JJ. Evaluación del riesgo microbiológico a *Vibrio ssp.* en alimentos de origen marino México. Salud pública de México. 2014;56:295-301. [On-line]
23. Martínez MT, Fuentes M, Achoy L, Castelo R, Silveira R, Artiles A. Calidad microbiológica de *Perna viridis* (LINNÉ, 1758) de la bahía de Cienfuegos, Cuba. Rev Cub de Inv Pes. 2014;31:23-29.
24. Mignani L, Barbier E, de Almeida Marques HL, Olivera Cardoso de AJF. Coliform density in culture waters and its relationship with environmental factors. Pesq. Agropec. Bras., Brasília. 2013;48:833-840. doi: 10.1590/S0100-204X2013000800004
25. Muñoz D, Graü de Marín C, Villalobos de Bastardo LB, Marval H, Martínez C, Zerpa A. USO DE *Clostridium perfringens* COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN FECAL EN ZONAS DE CULTIVO DE MOLUSCO BIVALVOS EN EL ESTADO DE SUCRE, VENEZUELA. Rev Cient, FCV-LUZ. 2010;20:575-583. [On-line]



26. NZFSA (New Zealand Food Safety Authority) (200) Animal products (Specifications for bivalve molluscan shelfish).
http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Animal_Products-Applies_Anyone.pdf.
Accessed 22 Jun 2015.
27. Paauw A, Trip H, Niemcewicz M, Sellek R, Heng JME, Mars RH, Jong AL, Majchrzykiewicz JA, Olsen Js, Tsvitshivadze E. OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and non-epidemic *Vibrio cholerae* in a modified MALDI-TOF MS assay. BMC Microbiology. 2014;14:158. [On-line] <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/158>
28. Peralta EM, Andalecio MN. Microbiological Quality of Oyster (*Crassostrea sp*) and Mussel (*Perna viridis*) in Selected Growing Areas in Western Visayas, Philippines. Phil J of Nat Sci. 2011;16:1-8. [On-line]
29. Quiñones EI, Vázquez C, Pedroche FF, Moreno L, Rodas OR. Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella*, y detección de coliformes fecales en almejas de México. Hidrobiología. 2000;10:131-138.
30. Ríos Tobón S, Agudelo RM, Gutiérrez LA. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. Fac. Nac. Salud Pública. 2017;35:236-247. doi: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08
31. Secretaría de Economía: DOF. NMX-AA-042-SCFI-2015. ANÁLISIS DE AGUA – ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES, ORGANISMOS COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES) Y *Escherichia coli* – MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE EN TUBOS MÚLTIPLES (CANCELA A LA



NMX-AA-42-1987). México; 2015. Disponible en:
www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5433394&fecha=18/04/2016

32. Secretaría de Energía, Recursos Naturales y Protección Ambiental (SERNAPAM). (2017). Programa: Monitoreo de Calidad del Agua. Red Estatal de Monitoreo de Calidad del Agua. Estación 22: Río Cuxcuchapa, (Puente “Campo Mecoacán” por la carretera Jalpa de Méndez-Chiltepec. Disponible en:
https://tabasco.gob.mx/sites/default/files/users/sernapamtabasco/REG_CENTRO_T1_2017.pdf

33. Secretaría de Gobernación. DOF. Secretaría de Salud (SSA). Norma Oficial Mexicana. NOM-242-SSA1-2019. Productos y Servicios. Productos de la Pesca Frescos, Refrigerados, Congelados y Procesados. Especificaciones Sanitarias y Métodos de Prueba. México; 2011. Disponible en:
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5177531&fecha=10/02/2011

34. Secretaría de Gobernación: DOF. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE). CE-CCA-001/89. Criterios Ecológicos de Calidad del Aguas. México; 1989. Disponible en: www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4837548&fecha=13/12/1989

35. Secretaría de Gobernación: DOF. Secretaria de Salud (SSA). Norma Oficial Mexicana. NOM-210-SSA1-2014. Productos y Servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice H. México; 2015. Disponible en:
www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015



36. Shamsur Rahman M, Martino ME, Cardazzo B, Facco P, Bordin P, Mioni R, Novelli E, Fasolato L. *Vibrio* Trends in the Ecology of the Venice Lagoon. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80:2372-2380. [On-line]
37. Sikora EA. ed. Walker. 2018. *Vibrio Cholerae. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY.* Humana Press, Nueva York, NY. [On-line]
<https://www.springer.com/series/7651>. Consultado el 8 agosto de 2018.
38. Soo Mok J, Seek T, Ho P, Jung A, Soo K, Jeong K, Joo Y, Hoe J. Bacteriological quality evaluation of seawater and oysters from the Hansan-Geojeman area in Korea, 2011-2013: impact of inland pollution sources. *SpringerPlus.* 2016;5:1412. doi: 10.1186/s40064-016-3049-9
39. van Weerelt MDM, Signori C, Enrich Prasct A. BALNEABILIDADE DA LAGOA RODRIGO DE FREITAS VARICAO TEMPORAL E ESPACIAL. *Oecol. Aust.* 2012;16:566-580. [On-line]
40. Wu Y, Chen J. Investigating the effects of point source and nonpoint source pollution on the Water quality of the East River (Dongjiang) in South China. *Ecol. Indic.* 2013;32:294-304. doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.04.002