

71  
2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

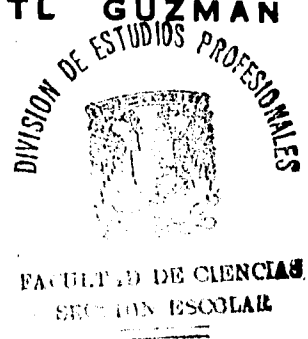
FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE LA CALIDAD  
SANITARIA DEL OSTION *Crassostrea*  
Virginica DE LA LAGUNA DE  
TAMIAHUA, VER.

T E S I S  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:  
XOCHITL GUZMAN GARCIA



MEXICO, D. F.



OCTUBRE 1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
División de Estudios  
Profesionales  
Exp. Núm. 55

M. EN C. JOAQUIN CIFUENTES BLANCO  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Universidad Nacional Autónoma de México  
P r e s e n t e

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizo LA pasante XOCHITL GUZMAN  
GARCIA  
con el título: EVALUACION DE LA CALIDAD SANITARIA DEL OSTION  
( Crassostrea virginica ) DE LA LAGUNA DE TAMIHUA, VER.

Consideramos que reúne los méritos necesarios para obtener el título de - - -  
BIOLOGO

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A t e n t a m e n t e  
México, D. F., a

- 1.- BIOLOGA GUADALUPE BARRERA ESCORCIA  
grado Nombre (s) Apellidos completos
- 2.- DOCTOR CARLOS ROSAS VAZQUEZ  
grado Nombre (s) Apellidos completos
- 3.- DOCTORA IRMA AURORA ROSAS PEREZ  
grado Nombre (s) Apellidos completos
- 4.- Sup. M. EN C. CECILIA VANEGAS PEREZ  
grado Nombre (s) Apellidos completos
- 5.- Sup. DOCTORA GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDIA  
grado Nombre (s) Apellidos completos

NOTA: El interesado deberá ponerse de acuerdo con el jurado para fijar fecha (día y hora) del examen, para evitar problemas de asistencia. ES IMPOR-  
TANTE LA PUNTUALIDAD.

**DEDICATORIA.**

**Para**

**LUCIO** cuya tolerante paciencia y amor  
nunca terminaré de agradecer.

**A MEZTLI LUCIA** por ser un regalo de la  
vida, muy por encima de lo que la vida permite.

**A mi MADRE**

con amor, agradecimiento y una  
profunda admiración.

**A FERNANDO, MINERVA Y SARA**

por el lazo de unión y apoyo que  
siempre me han brindado.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a todos los maestros que han contribuido a mi formación como persona y como profesionista, muy en especial a La Biol. Guadalupe Barrera directora de esta tesis , a la Dra. Irma Rosas por sus invaluable comentarios en el presente trabajo, así como a el Dr. Carlos Rosas Vazquez, Dra. Guillermina Alcaraz . y M. en C. Cecilia Vanegas por su gran calidad humana , y a todos ellos por la lectura critica del trabajo y participación como jurado del examen profesional.

Agradezco a la M. en C. Irma Wong por su amistad y revisión de la tesis, así como a todo el personal del área de Hidrobiología, del Laboratorio de Contaminación, Biensayos e Impacto ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana y a mis amistades que de una manera u otra participaron en el desarrollo de esta tesis

## Índice

RESUMEN.....	1
I.- INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	8
II.- MATERIALES Y MÉTODO.....	12
II.1. COLECTA DE LAS MUESTRAS.....	12
II.2. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO.....	13
II.3. CALIDAD SANITARIA.....	17
ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN.....	18
FACTOR DE ACUMULACIÓN.....	18
II.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
III.- RESULTADOS.....	20
CALIDAD SANITARIA EN OSTIÓN.....	21
NMP EN AGUA Y SEDIMENTO.....	25
FACTORES FÍSICO-QUÍMICOS.....	29
CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE LOS ORGANISMOS ANALIZADOS.....	32
IV.- DISCUSIÓN.....	34
V.- CONCLUSIONES.....	43
VI.- LITERATURA CONSULTADA.....	44
ANEXO.....	51

## Resumen

Los contenidos de bacterias en ostión son influenciados por las condiciones de manejo comercial, almacenado, el estado fisiológico del organismo, así como por la calidad del agua donde se desarrollan y por diversos factores del medio que pueden aumentar o disminuir el proceso de acumulación.

Sabiendo que existen diferencias estacionales en las concentraciones de bacterias en el agua de la laguna de Tamiahua, es posible que estas también se manifiesten en el ostión.

El objetivo de este estudio fue evaluar los contenidos de bacterias coliformes fecales y estreptococos fecales en *Crassostrea virginica* relacionándolos con algunos factores ambientales y el almacenamiento comercial durante un ciclo anual.

Los organismos fueron colectados en las estación de secas, lluvias y nortes en un banco ubicado frente a la ciudad de Tamiahua, Ver.

Se utilizó el método del Número Más Probable por tubos múltiples para la determinación de las concentraciones de bacterias coliformes fecales y estreptococos fecales, reemplazando el macerado de músculo de ostión obtenido de varios organismos, por el análisis bacteriológico individual. Se colectaron 30 ostiones en cada estación, así como muestras de agua y se registraron los parámetros fisicoquímicos del banco de colecta. Se realizó el análisis de 10 organismos y el agua antes de las 24 hrs. Los 20 organismos restantes se analizaron a las 72 y 120 hrs para estimar el efecto del almacenamiento.

Se comprobó que hubo cambios en la concentración de bacterias por almacenamiento a las 120 hrs ( $p < 0.05$ ), así como variación estacional significativa ( $p < 0.05$ ) encontrándose las mayores concentraciones al inicio de la estación de lluvias.

Se caracterizó la contaminación como de origen animal de acuerdo a la tasa CF/EF (coliformes fecales/estreptococos fecales) en organismos con 24 y 72 hrs de almacenamiento, mientras que en los de 120 hrs la tasa fue mayor de 4.0, lo que se interpretaría como de origen humano. Esto indicó que, durante el almacenamiento existe diferente sobrevivencia de cada uno de los grupos de bacterias, lo que a su vez se manifiesta en una variación en la relación CF/EF que puede originar confusión en la interpretación del origen de la contaminación, si la muestra no se analiza de inmediato.

Las bacterias coliformes fecales en el agua no presentaron correlación significativa con las concentraciones registradas en ostión; pero los Números Más Probables de estreptococos fecales en agua sí presentaron correlación con las concentraciones de bacterias en el ostión, probablemente por la mayor resistencia de este grupo a cambios ambientales.

La calidad sanitaria del ostión rebasó los límites establecidos por la Norma mexicana después de las 120 hrs de almacenamiento y en la estación de lluvias. El ostión no reflejó los contenidos ambientales en el caso de coliformes fecales pero sí para estreptococos, colocando a este grupo como un indicador de contaminación más estable, con pocas variaciones en el tiempo. La acumulación de bacterias es un proceso individual que difiere de un organismo a otro.

## I. Introducción

El ostión *Crassostrea virginica* es un recurso de gran importancia alimenticia, cuya calidad sanitaria se ve afectada por la calidad del agua donde se cultiva y por su manejo comercial (Rosas *et al.*, 1985). La relación entre la contaminación de áreas de cultivo de ostión y la incidencia de diarreas ha sido ampliamente demostrada (FDA, 1992), y se origina debido a que bacterias del grupo coliforme y otras, pueden retenerse en el ostión durante su alimentación, ocasionando que éste, se convierta en posible vector de enfermedades (Thatcher y Clarck, 1973).

En diferentes países se tienen registrados brotes de infecciones por consumo de ostión (Rodríguez y Fernández, 1968; Goyal *et al.*, 1979; Pelczar *et al.*, 1982; Pontefract *et al.*, 1993), en nuestro país no existe una estadística específica al respecto, sin embargo se contemplan criterios microbiológicos para el control de la calidad de este recurso (Secretaría de Salud, 1993).

La calidad sanitaria se establece mediante pruebas bacteriológicas sensibles y específicas que ponen de manifiesto fuentes de contaminación, utilizando para ello tres grupos de microorganismos; los que son capaces de alterar la calidad del alimento, los patógenos y los grupos indicadores.

Dentro de los grupo indicadores es de uso frecuente la determinación de bacterias coliformes fecales, las cuales constituyen un buen elemento para evaluar la calidad sanitaria debido a que implican la posible presencia de patógenos (Hernández y Vargas, 1993). El grupo de estreptococos fecales que se utiliza como indicador de contaminación fecal animal, así como algunas otras bacterias que recientemente se han propuesto como indicadores de contaminación ( Rodopoulou y Papapetropoulou, 1992).



7

Las bacterias coliformes constituyen un grupo heterogéneo con hábita primordial intestinal en la mayoría de las especies que involucra. Su definición incluye a todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, gram-negativas, no esporuladas, baciliformes que fermentan la lactosa formando gas en un período de 48 hrs. a 35 ° C. de incubación (Braude et al., 1984).

Las bacterias coliformes se reportan como coliformes totales y coliformes fecales; esta subdivisión se realiza atendiendo la necesidad de disminuir márgenes de error, ya que el grupo de coliformes fecales presenta mayor probabilidad de provenir del intestino e incluye a *E. coli* y otras cepas estrechamente relacionadas de origen fecal, mientras que las coliformes totales pueden incluir cepas que no son de origen directamente fecal sino también del ambiente (Vargas y Lizarraga-Partida, 1993)

Las bacterias coliformes fecales representan un grupo de organismos que son seleccionados por incubación del inóculo procedente de un caldo de enriquecimiento de coliformes, que se cultiva a temperaturas de 44 a 45.5 °C (Thatcher y Clarck, 1973). La cuantificación de estas bacterias y las del grupo estreptococos fecales son empleadas para discernir sobre el origen de la contaminación (Declerck, 1991).

Los miembros del grupo de estreptococos fecales pertenecen al género *Streptococcus* de la familia *Streptococaceae* y comprende las especies *S. faecalis* (y sus variedades), y *S. faecium*; junto con *S. bovis* y *S. equinus* (Braude et al., 1984). Estas especies son capaces de crecer o sobrevivir de 10 a 45° C, en presencia de 6.5% de cloruro de sodio, a pH 9.6 y soportan calentamiento hasta de 60° C por 30 minutos (Thatcher y Clarck, 1973).

Existen varias técnicas para la determinación de la cantidad de bacterias. La más ampliamente utilizada es la de tubos múltiples de fermentación para determinación del Número Más Probable (APHA, 1989). Esta técnica es empleada para la estimación del contenido de gérmenes

con base en el cambio observado en los medios de cultivo como resultado de la actividad bacteriana.

La prueba de tubos múltiples se ha utilizado para valorar la calidad sanitaria del ostión y del agua en la que se desarrolla (FDA, 1992), misma que puede ser transformada por las descargas domésticas en insatisfactoria para el desarrollo de estos bivalvos (Escobar, 1989).

El ostión constituye un recurso valioso para la acuicultura mexicana, tanto por su volumen de producción como por los niveles de consumo y la cantidad de empleos que se generan a través de su extracción. *Crassostrea virginica* es la especie más importante a nivel nacional y se cultiva en las lagunas litorales del Golfo de México. Los riesgos asociados a este cultivo, se dan cuando existe contaminación de las áreas ostrícolas o del agua con la que se maneja el ostión en los desconchaderos, motivo por el cual su calidad sanitaria ha sido deteriorada y no cubre los requerimientos microbiológicos necesarios para la exportación (Bardach *et al.*, 1992).

Los estudios sobre calidad bacteriológica del ostión en nuestro país corroboran casi siempre que existen niveles superiores a los establecidos tanto en el agua para el cultivo de moluscos, como en el ostión de diversas lagunas mexicanas como son: Tecolutla, Ver. (González *et al.*, 1988), Carmen-Machona, Tabasco (Rodríguez, 1986) y Términos, Campeche (Romero y Rodríguez, 1982). En la laguna de Tamiahua, Ver., Rosas *et al.* (1985) indicaron que, a pesar de que el ostión contenía el doble de bacterias que las registradas en agua, no estuvo alterado severamente; sin embargo, Barrera *et al.* (1989) indicaron que se han presentado niveles de bacterias coliformes fecales en el agua de la laguna superiores a los límites máximos permitidos, sobre todo en las zonas cercanas a los poblados.

Algunos de los estudios realizados, señalan que los factores que pueden estar asociados con la contaminación del ostión son los siguientes:

la recolección en zonas prohibidas, el almacenamiento a temperaturas inadecuadas, el tiempo entre su colecta y distribución, la ausencia de lavado antes de abrir el ostión, la manipulación por personas con malos hábitos higiénicos y la exposición al ambiente una vez sacados de su concha (González *et al.*, 1988; Rosas *et al.*, 1985)

El método de almacenamiento de ostión que se utiliza en la zona del Golfo de México, generalmente consiste en el transporte de los organismos en seco y a temperatura ambiente hasta los centros de distribución comercial, transcurriendo varias horas o incluso días hasta el punto de destino. Esta situación es contraria a lo que prevé el anteproyecto de Norma Oficial Mexicana para Moluscos (Secretaría de Salud, 1993) que ordena para la conservación y transporte de este molusco una temperatura menor de 7.2 °C.

En el caso de la ciudad de México, el centro principal de abasto de este producto es el mercado de la Viga, en donde se mantiene en las bodegas sin ninguna refrigeración por lo menos 3 días (comunicación verbal con los comerciantes de este mercado); después de este período se empieza a desconchar el producto. Las precarias condiciones de comercialización en México, facilitan que se presenten padecimientos intestinales en áreas geográficamente retiradas de la zona de extracción por consumo de ostión contaminado (Rodríguez y Fernández, 1968). Cuando el consumo de ostión es local, el radio de su posible impacto sobre la salud de la población es menor, que cuando se extrae de zonas que aportan grandes cantidades de este producto, con una amplia distribución en la República Mexicana como es el caso de la Laguna de Tamiahua.

En el agua de esta laguna, los grupos coliformes y estreptococos fecales, se presentan abundantemente durante el verano y disminuyen su concentración durante el invierno (Barrera *et al.*, 1988). Se han registrado niveles hasta de 700 coliformes fecales/100 mL en el agua de la laguna en

puntos cercanos a asentamientos humanos y hasta de 6435 estreptococos fecales/100 mL en el agua de los mismos puntos, estas cifras fueron superadas de 2 a 10 veces más en el sedimento (Barrera *et al.*, 1987).

El ostión posee la habilidad de responder rápidamente a cambios en la concentración bacteriológica del agua de su entorno (Wood, 1979), pudiendo presentarse diferencias en las concentraciones de bacterias entre el agua del medio, el sedimento, el ostión y el agua de intervalvas del organismo (Volterra *et al.*, 1980).

La concentración de los microorganismos en el ostión es altamente variable y depende de diversos factores extrínsecos e intrínsecos. En los últimos años se le ha considerado como un agente biológico idóneo de monitoreo, ya que integra muchos efectos de diversos factores en espacio y tiempo, aportando información valiosa sobre la calidad sanitaria del medio que habitan. Entre las características que determinan que los moluscos bivalvos sean utilizados para estos fines, destacan el hecho de ser organismos de hábitos sedentarios fáciles de monitorear y que sus hábitos alimenticios, por filtración, proveen evidencias del estado ambiental de un área (Pelczar *et al.*, 1982).

Debido a que los moluscos son organismos filtradores, al alimentarse, las bacterias coliformes pasan al tracto digestivo. Existen evidencias que muestran que los procesos digestivos no inactivan a estos organismos, por lo que el ostión llega a contener gran cantidad de estas bacterias en las branquias y tracto digestivo, provenientes de muchos litros de agua filtrada (Prieur *et al.*, 1990).

Se piensa que la calidad microbiológica del ostión depende de la calidad microbiológica del medio. Al desarrollarse en un medio contaminado, el ostión puede registrar acumulación de microorganismos y si las condiciones de almacenamiento son deficientes, este recurso puede ser un vehículo de enfermedades gastrointestinales. Por lo tanto, para obtener una mejor determinación de la calidad microbiológica del ostión,

surge la necesidad de realizar investigaciones tanto en agua, en sedimento, como en el ostión de la especie *Crassostrea virginica*.

## **Objetivo General**

Evaluar la calidad sanitaria del ostión (*Crassostrea virginica*) de la laguna de Tamiahua y relacionarla con algunos factores ambientales y el almacenamiento comercial durante un ciclo anual.

## **Objetivos Particulares**

Determinar la calidad sanitaria en ostión recientemente colectado del banco ostrícola y en organismos sujetos a almacenamiento.

Establecer el posible origen de la contaminación en los moluscos analizados en relación a los contenidos de bacterias coliformes fecales y estreptococos fecales.

Evaluar la acumulación de bacterias en el ostión relacionándola con las bacterias registradas en agua y sedimento, analizando la posible influencia de los factores físico-químicos y ciclos estacionales.

Asociar los contenidos de bacterias con la longitud y el peso de los organismos analizados.

## **Área De Estudio**

La Laguna de Tamiahua se localiza en la porción occidental de las costas del golfo de México, en el estado de Veracruz, entre las coordenadas 21°06' de latitud norte y los 97°23' y 97°46' de longitud oeste; la limitan al norte el río Pánuco y al sur el río Tuxpan (Ayala-Castañares *et al.*, 1969) (Figura 1).

Posee una forma alargada en el eje mayor, orientado del noreste al sureste. Tiene una longitud aproximada de 85 Km y una anchura máxima de 18 Km; ocupa un área de 88,000 ha aproximadamente, y es por su extensión la tercera más grande del país, y por la cantidad de información (131 trabajos) es de las más estudiadas del país. Estos trabajos contienen información que cubre aspectos geológicos, biológicos de peces, crustaceos, moluscos, de flora, ecológicos, hidrológicos de productividad, así como aspectos de contaminación, entre otros (Catañeda, O. y F. Contreras, 1994).

La laguna es somera, tiene una profundidad promedio de 2 a 3 metros; el clima es subhúmedo lluvioso en verano y seco en invierno. Se puede decir que existen tres temporadas fácilmente distinguibles que son sequía (marzo a junio), lluvia (julio a octubre) y frío (noviembre a febrero) donde prevalecen fuertes vientos del Norte (Sevilla y Ramírez, 1965). Recibe descargas de numerosos ríos, entre los que se encuentran: la Laja, Cucharas, Carbajal, San Jerónimo, Tancochín, Tampache, la Cienega y Milpas. Dentro de esta laguna existen tres islas: Juana Ramírez, Del Toro y Del Idolo.

Frente a la costa hay una cadena de arrecifes coralinos llamado Cabo Rojo. Actualmente cuenta con dos bocas : una al norte llamada boca de Tampachichi ; y otra al sur, la boca o "Barra de Corazones" por donde

penetran las mareas afectando la salinidad de la porción sur (Castañeda, O. y F. Contreras, 1994).

En hidrología se tienen datos recientes con valores promedio de los parámetros registrados en la laguna de Tamiahua (Botello, A., 1994), que se presentan a continuación :

	Minimo	Máximo
Temperatura	26.5	34 °C
Salinidad	14.42	37.5 o/oo
Oxígeno	2.1	11.7 mL/L
pH	6.81	8.91
Profundidad	0.53	0.54 m

Debido a la gran cantidad de especies comerciales que tiene esta laguna, el estado de Veracruz se encuentra entre los primeros 4 lugares en relación a la explotación pesquera. Entre las especies de mayor volumen capturado se encuentra el ostión *Crassostrea virginica* siendo al respecto, el estado de Veracruz el primer aportador y la laguna de Tamiahua la zona de mayor extracción de este recurso (Secretaría de Pesca, 1990).



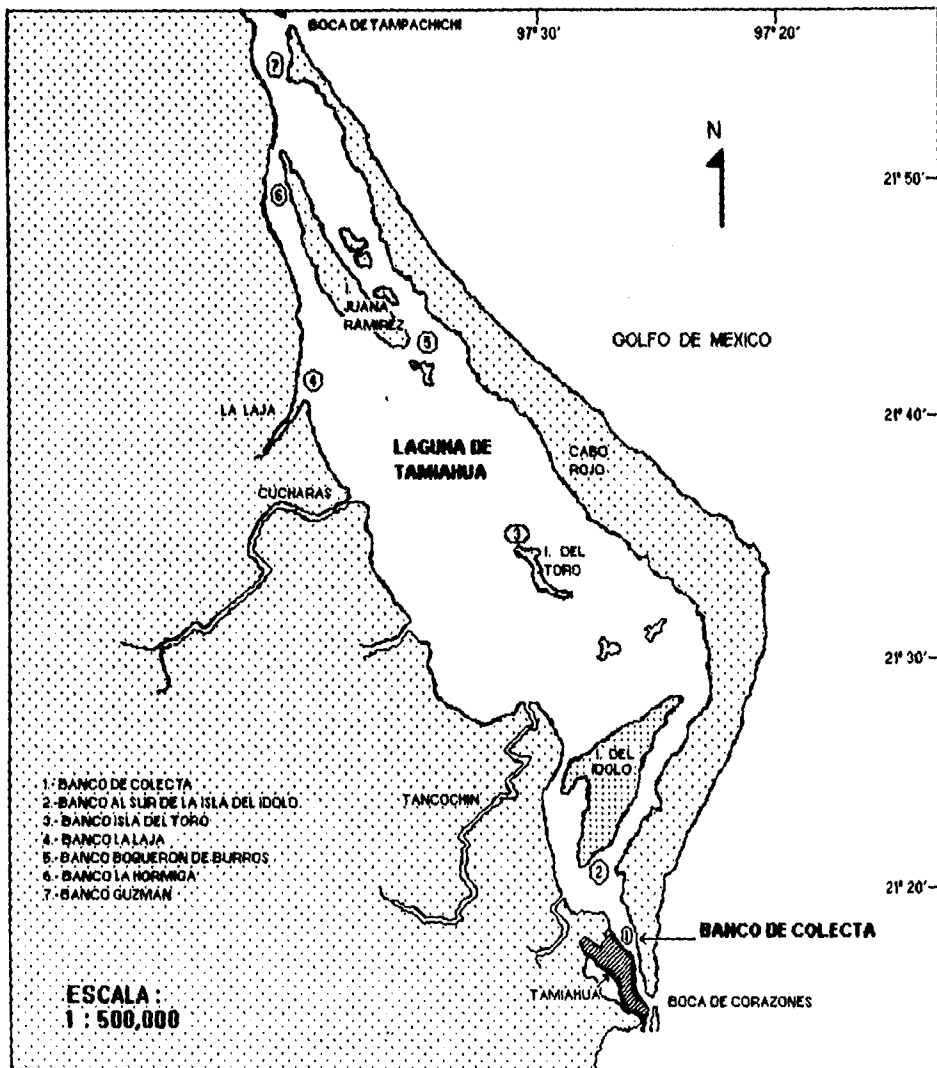


Figura 1.- Laguna de Tamiahua, Ver. y el banco ostrícola de colecta (1).

## **II. Materiales y Métodos**

El procedimiento de análisis de las muestras colectadas de ostión, agua y sedimento requirió varias pruebas exploratorias que permitieron montar la técnica de cultivo de bacterias.

A través de las pruebas exploratorias se establecieron las diluciones adecuadas y se seleccionaron los medios de cultivo, así como el número de organismos a procesar y el tiempo durante el cual se almacenaron los ejemplares.

### **II.1. Colecta de las muestras**

Los muestreos se realizaron durante 1990 en las 3 estaciones climáticas predominantes de la laguna de Tamiahua: secas (mayo), inicio y finales de lluvias (agosto y septiembre) y estación de nortes (noviembre). Los ostiones fueron extraídos del banco ostrícola situado frente a la zona de restaurantes del pueblo de Tamiahua, lugar que está influenciado por el aporte de desechos domésticos (Figura 1).

En cada muestreo se colectaron con ayuda de gafas de extracción, 30 ejemplares de ostión que se transportaron en seco en bolsas denominadas arpillas como comercialmente se realiza. Los ejemplares colectados, fueron analizados individualmente en lotes de 10 organismos antes de que transcurrieran 24 horas desde su colecta, al tercer y al quinto

día, esto con el fin de evidenciar la influencia del almacenamiento sobre los contenidos coliformes.

Paralelamente se colectó una muestra de agua superficial en un frasco ámbar estéril, y transportada en hielo a 4° C, así como una muestra del sedimento asociado al ostión que fue colocada dentro de un frasco estéril con ayuda de una espátula también libre de bacterias.

En el sitio de colecta se registraron los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura y oxígeno disuelto con un oxímetro YSI (54 ARC  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ;  $\pm 0.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ ), el pH con un potenciómetro digital (Corning  $\pm 0.05$ ) y la profundidad con un disco de Secchi ( $\pm 0.50 \text{ cm}$ ).

## **II.2. Análisis Bacteriológico**

### **Preparación de las Muestras de Ostión**

Se lavaron los ejemplares de ostión con un cepillo y agua estériles para eliminar restos de sedimento. Posteriormente se midió la longitud de los organismos desde la parte anterior del umbo de la concha, hasta el extremo posterior de las valvas y se pesaron los ejemplares en condiciones asépticas; se procedió posteriormente a separar las conchas de su contenido para lo cual se siguieron las recomendaciones indicadas por Rosas *et al.* (1985) y APHA (1989). Con un cuchillo esterilizado se separaron las valvas en un punto alejado de la charnela y se cortó el músculo abductor de la concha plana eliminando ésta; se vació la pulpa y el líquido en un frasco estéril, utilizando un recipiente para cada organismo y se volvieron a pesar las conchas para obtener por sustracción el peso del líquido de las intervalvas y tejido .

### **Macerado y Dilución del Ostión**

Una vez desconchados los ostiones y colocados cada uno en un frasco estéril, se procedió al homogeneizado y a la obtención de las diluciones de la siguiente forma.

Para el homogeneizado, el ostión y el líquido intersticial fueron aforados a 50 mL con buffer fosfatado pH 7 (Thatcher y Clarck, 1973). Cada muestra se maceró en un homogeneizador estéril por 60 seg., a 14000 rpm (Thatcher y Clarck, 1973). De manera similar se licuó agua estéril, que fue sembrada posteriormente y que sirvió como testigo para comprobar que el homogeneizador estaba libre de bacterias .

Una vez obtenido el homogenizado de ostión, se realizaron diluciones al 1.0, 0.1 y 0.01 % en el buffer fosfatado, para posteriormente efectuar las siembras en los medios de cultivo.

Las características del buffer utilizado, así como de los medios empleados se señalan en el Anexo.

### **Muestras de agua**

Se tomó de cada muestra de agua 1 mL y se colocó en 9 mL de agua estéril, para la preparación de diluciones al 10 y 1.0 %. Tanto estas, como las muestras iniciales al 100%, se sembraron en los medios de cultivo antes de que transcurrieran 24 hrs. desde su colecta.

### **Muestras de Sedimento**

Se colocó 1 gr de muestra de sedimento en 9 mL de agua estéril, a partir de la cual se prepararon las diluciones al 1.0, 0.1 y 0.01 %. Una vez

obtenidas estas diluciones se procedió a la siembra en los medios de cultivo.

### **Medios de Cultivo para la Cuantificación de Bacterias Coliformes**

Se inocularon series de tres tubos por dilución, con medios de cultivo en dos fases : la fase de enriquecimiento y la fase confirmativa. En la fase confirmativa los microorganismos de interés proliferan activamente, en tanto que los falsos positivos son inhibidos por la presencia de sustancias selectivas antibacterianas adicionadas al medio de confirmación (Hussong *et al.*, 1981)

La secuencia de cultivo aplicada en las pruebas se indica en la Figura 2. También se realizaron siembras de agua estéril proveniente del lavado de los instrumentos que se utilizaron en el homogenizado de ostión, (vasos y espas), así como siembras del buffer y agua estéril de dilución, para comprobar el manejo adecuado de las muestras.

### **Determinación de Coliformes Fecales**

En la fase presuntiva, se inóculo 1 mL de cada dilución en 10 mL de caldo Lactosado por triplicado; se obtuvieron en consecuencia 9 tubos por cada muestra, mismos que se incubaron a 35° C. Los conteos de los tubos con presencia de gas en la campana de Durham se efectuaron a las 24 y 48 hrs. de siembra y la resiembra de los tubos se realizó inmediatamente después de las 48 hrs.

Los tubos positivos de la fase presuntiva fueron inoculados en el medio confirmativo EC (*Escherichia coli*) e incubado a 44 ° C con conteos a las 24 y 48 hrs .

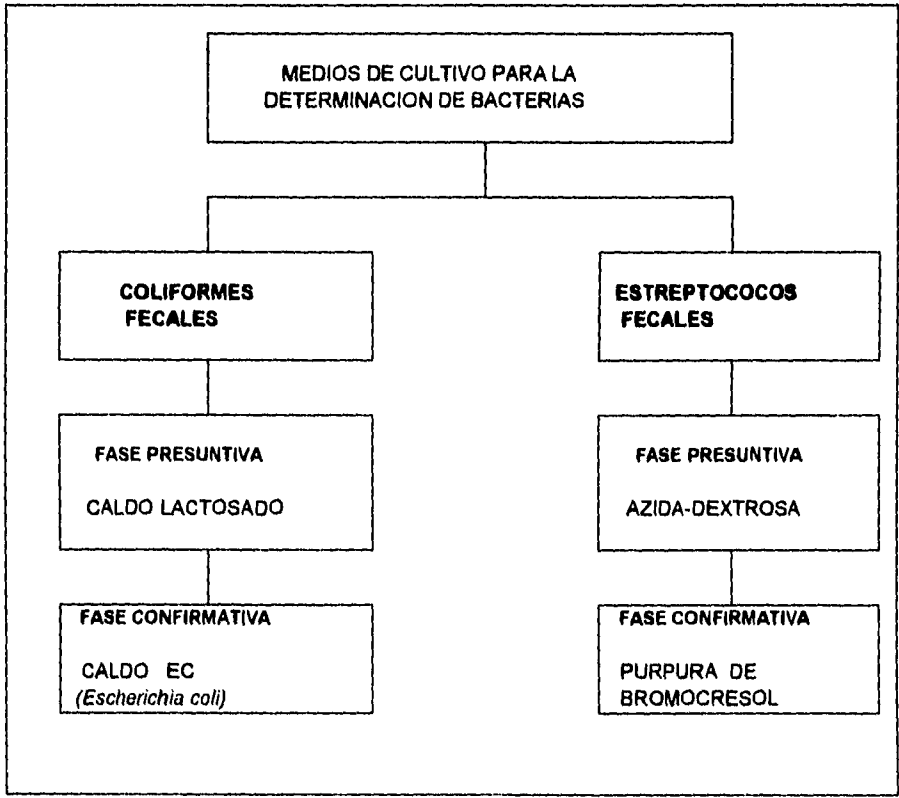


Figura 2. Medios de cultivo utilizados en la técnica del Número Más Probable para coliformes y estreptococos fecales.

### **Determinación de Estreptococos Fecales**

Para la determinación de este grupo, en la fase presuntiva se inocularon 1 mL de cada dilución en caldo azida-dextrosa y se incubaron a 37° C. Los conteos se realizaron a las 24 y 48 hrs de siembra. La resiembra de los tubos positivos se realizó en Purpura de Bromocresol-Azida incubado a 37° C con conteos a las 24 y 48 hrs.

Obtenidos los recuentos de los tubos con crecimiento positivo se cálculo el NMP (Número Más Probable) mediante la fórmula propuesta por APHA (1989).

El NMP para ostión se determino utilizando la expresión :

$$\text{NMP/mL} = \frac{\text{NMP}/100 \text{ mL} (2)}{V}$$

Donde V representa el volumen total en el que fueron homogenizados los moluscos (Volterra *et al.*, 1983). En esta fórmula las bacterias son referidas en mL, pero esta fórmula también permite calcular las bacterias por gramo, toda vez que el número de bacterias en unidad de peso (g) se relaciona con el peso específico (1 g = 1 mL). Además, se ha visto que los resultados referidos en peso o volumen no muestran diferencias significativas (Volterra *et al.*, 1980) y dado las dificultades que representa establecer el volumen exacto de pulpa de ostión, se prefirió determinar el NMP por gramo de ostión analizado.

### **II. 3. Calidad Sanitaria**

La evaluación de la calidad sanitaria se realizó con base en los límites indicados en la legislación mexicana, que solo contempla el grupo de bacterias coliformes para la calidad sanitaria de agua de cultivo de moluscos. El anteproyecto de Norma de la Secretaría de Salud (1993)

indica en el artículo 15, que los moluscos bivalvos frescos, refrigerados y congelados deberán tener un límite máximo de bacterias de 230 NMP/100 g de ostión. Se consideran no satisfactorias las muestras cuando exceden de un NMP de 330 CF/100 g (Vargas y Lizarraga-Partida, 1993).

Respecto a la calidad del agua requerida para cultivo de ostión se consideran adecuadas las aguas cuyo NMP de coliformes fecales en agua no exceda de 14 NMP/ 100 mL y no más del 10 % de las muestras excedan de 49 NMP/ 100 mL para la prueba de dilución decimal de 3 tubos en un ciclo anual (Diario Oficial, 1989). Se considera área restringida aquella cuya agua tenga mediana o promedio geométrico del NMP inferior a 88 bacterias/ 100 mL y no más del 10 % de las muestras exceda de 300 NMP/ 100 mL para la prueba de dilución decimal de 3 tubos en una evaluación de un ciclo anual (Secretaría de Salud, 1994).

Para evaluar el grupo de estreptococos fecales, se utilizó la Norma vigente en Francia que ha establecido como límite máximo permisible en moluscos bivalvos 2500 estreptococos fecales / 100 g (Prieur *et al.*, 1990), ya que dentro de la legislación mexicana no se ha contemplado aún este grupo para el control de la calidad de moluscos bivalvos y agua de zonas ostrícolas.

A la fecha no se ha establecido un límite máximo de bacterias para muestras de sedimento.

El origen de la contaminación se estableció mediante la razón Coliformes Fecales / Estreptococos Fecales (CF/EF) determinadas en los ejemplares analizados. La razón de la relación superior a 4.0 se interpreta como contaminación de origen humano, en tanto que organismos con índices de la relación menores de 0.7 se les atribuye contaminación de origen animal (Wheater *et al.*, 1979).



Las condiciones que influenciaron el proceso de acumulación de bacterias se estimaron mediante el factor de acumulación que se define como :

$$A = B_a / B_w$$

En donde A es el factor de acumulación,  $B_a$  el nivel de bacterias por gramo de ostión y  $B_w$  es el nivel de bacterias por mL del agua donde se desarrollan los moluscos (Cabelli y Hefeernan, 1970).

#### **II.4. Análisis estadístico.**

Se aplicó la contraparte no paramétrica del análisis de varianza para conocer las diferencias entre las concentraciones de bacterias de los diferentes días de análisis y estaciones climáticas, con un límite de confianza del 95%, a través de la prueba de Kruskal-Wallis y pruebas contrastantes de rangos múltiples de Newman-Keuls y Ducans (Steel y Torrie, 1988).

La interrelación entre los contenidos de bacterias en ostión con la longitud y el peso de los organismos, así como con los parámetros físico-químicos de la laguna, se establecieron mediante pruebas de correlación no paramétricas de Spearman (Steel y Torrie, 1988)

### III. Resultados

El NMP (Número más probable) de bacterias coliformes fecales y estreptococos fecales obtenidos en ostión de la laguna de Tamiahua, Ver., se presentan en la Tabla 1. En esta tabla, se incluyen la media geométrica del NMP registrada en organismos analizados antes de las 24 horas desde su colecta (día 1), así como de organismos almacenados tres y cinco días.

La media geométrica más baja del NMP de bacterias coliformes fecales y estreptococos fecales (3.3 y 6.0 respectivamente) se registró en organismos almacenados el primer día después de la colecta, mientras que el más alto (20.7 y 9.8 respectivamente) al quinto día (Tabla 1).

La prueba de Kruskal-Wallis para valorar la influencia del almacenado sobre las concentraciones de bacterias registradas en ostión, indicó que las bacterias coliformes fecales se incrementaron significativamente a mayor tiempo de almacenamiento ( $p < 0.05$ ), en tanto que las concentraciones de estreptococos fecales no sufrieron cambios importantes del primer al quinto día de almacenado ( $p < 0.05$ ) (Tabla 1 y 2).

Las pruebas de contraste de Ducans y Newman-Keuls señalaron específicamente que las concentraciones de coliformes fecales en ostión con menos de 24 hrs. de colecta y hasta con tres días de almacenamiento, no presentaron fluctuaciones importantes en la densidad de bacterias ( $p > 0.05$ ), pero sí se presentaron diferencias significativas entre estos y los organismos almacenados cinco días ( $p < 0.05$ ). El comportamiento del NMP de bacterias en ostión por efecto del tiempo de almacenamiento se visualiza en la Figura 3.

Tabla 1. Número Más Probable de bacterias coliformes y estreptococos fecales registrados en ostión.

No. DE MUESTRA	TIEMPO DE ALMACENADO DEL OSTION	COLIFORMES FECALES (NMP/g)				ESTREPTOCOCOS FECALES (NMP/g)			
		SECAS	LLUVIAS	NORTES		SECAS	LLUVIAS	NORTES	
		MAY	AGO	SEP	NOV	MAY	AGO	SEP	NOV
1	PRIMER DIA (ANTES DE 24 HRS)	< 30	948	< 30	< 30	< 30	5815	< 30	< 30
2		< 30	5252	< 30	< 30	< 30	3249	< 30	< 30
3		41	232	< 30	< 30	< 30	470	< 30	< 30
4		41	650	< 30	< 30	< 30	47	< 30	< 30
5		< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	342	< 30	37
6		< 30	51	< 30	< 30	< 30	550	< 30	< 30
7		< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	76	< 30	198
8		< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	882	< 30	< 30
9		< 30	84	< 30	< 30	< 30	780	< 30	< 30
10		< 30	168	< 30	< 30	< 30	515	< 30	< 30
MEDIA	GEOMÉTRICA	3.3				6			
	DESV. STD.	1.03				1.25			
N-K	y DUCANS	p > 0.05				p > 0.05			
11	TERCER DIA (72 HRS)	< 30	880	< 30	< 30	< 30	215	< 30	< 30
12		< 30	318	< 30	< 30	< 30	1758	< 30	< 30
13		< 30	165	< 30	< 30	< 30	4892	< 30	< 30
14		< 30	135	< 30	< 30	< 30	1738	< 30	< 30
15		< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	1218	< 30	< 30
16		< 30	183	< 30	< 30	< 30	1060	< 30	31
17		< 30	181	< 30	< 30	< 30	615	< 30	33
18		45	< 30	< 30	< 30	304	126	< 30	< 30
19		< 30	108	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30
20		104	45	< 30	< 30	164	45	< 30	< 30
MEDIA	GEOMÉTRICA	3.4				6.6			
	DESV. STD.	0.96				1.26			
N-K	y DUCANS	p > 0.05				p > 0.05			
21	QUINTO DIA (120 HRS)	< 30	4980	< 30	< 30	< 30	107	< 30	< 30
22		33	4840	< 30	< 30	< 30	68	< 30	39
23		< 30	164	< 30	< 30	186	4866	< 30	33
24		35	4568	< 30	< 30	< 30	94	< 30	< 30
25		< 30	4989	< 30	103	< 30	560	< 30	< 30
26		< 30	4910	< 30	106	36	4910	< 30	< 30
27		447	5085	< 30	214	< 30	696	< 30	< 30
28		3145	80	< 30	105	832	567	< 30	< 30
29		172	507	< 30	< 30	< 30	2266	< 30	< 30
30		70	109	< 30	< 30	110	991	< 30	< 30
MEDIA	GEOMÉTRICA	20.7				9.6			
	DESV. STD.	1.45				1.31			
N-K	y DUCANS	p < 0.05				p > 0.05			

N-K = Newman-Keuls

Tabla 2. Efecto del almacenamiento sobre el Número Más Probable de bacterias en ostión.

NMP DE COLIFORMES FECALES		NMP DE ESTREPTOCOCOS FECALES	
PRUEBA	ESTADÍSTICO	PRUEBA	ESTADÍSTICO
KRUSKAL-WALLIS	7.2*	KRUSKAL-WALLIS	0.53
NEWMAN-KEULS DUCANS	ESTADÍSTICO	NEWMAN-KEULS DUCANS	ESTADÍSTICO
DIFERENCIAS ENTRE LOS NMP DEL :		DIFERENCIAS ENTRE LOS NMP DEL :	
DIA 1 VS DIA 3	0.86	DIA 1 VS DIA 3	0.14
DIA 1 VS DIA 5	4.25*	DIA 1 VS DIA 5	0.63
DIA 3 VS DIA 5	5.12*	DIA 3 VS DIA 5	0.77

\* Prueba significativa ( $p < 0,05$ )

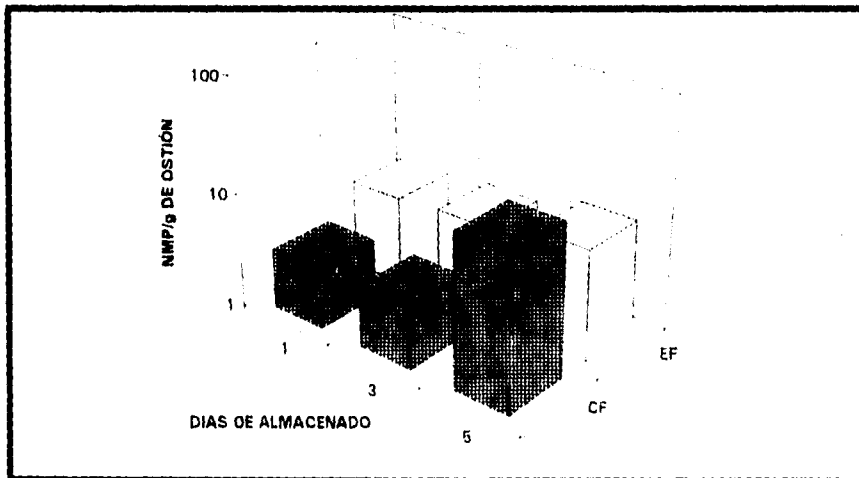


Figura 3. Media geométrica del NMP de bacterias Coliformes Fecales (CF) y Estreptococos Fecales (EF) registrado en ostión analizado durante el primer día de colecta, al tercer y quinto día de almacenado.

El origen de la contaminación determinada a través de la relación de los dos grupos indicadores, coliformes fecales/estreptococos fecales (CF/EF) registrados en ostión se muestra en la Tabla 3. La razón de la relación varió a través de los diferentes días de análisis. En ostiones analizados con menos de 24 hrs. de colecta, la razón indicó que más del 34% de los ejemplares presentaron índices menores de 0.7 por lo que se les atribuyó contaminación de origen animal y solo el 10% de los organismos analizados presentó contaminación atribuible a aportes humanos. En los ostiones analizados con tres días de almacenado el 37% de los ejemplares presentaron una relación  $CF/EF < 0.7$  que permitió atribuir las concentraciones bacterianas a una contaminación animal y solo a un 3% de los ejemplares, contaminación humana. Sin embargo los resultados en organismos con cinco días de almacenado indicaron que a un 30% de los organismos se les pudo atribuir contaminación de origen animal y al 43% contaminación humana. Es decir, a los organismos con menos de 24 hrs. y hasta 3 días de almacenado, se les pudo atribuir contaminación animal, mientras que a los de 5 días de almacenado se les pudo atribuir contaminación humana. Estos resultados se visualizan en la Figura 4.

Los NMP de coliformes y estreptococos fecales del agua y del sedimento asociado al ostión se señalan en la Tabla 4. En la muestra de agua colectada en la estación de secas se registró la concentración más alta de bacterias coliformes fecales (1519 CF/100 mL); en la estación de lluvias se registraron 159 CF/100 mL y a finales de esta misma estación, así como en la estación de nortes no se registraron coliformes fecales en agua. El grupo de estreptococos fecales se registró en el agua de principio de la estación de lluvias 572 NMP/100 mL (en concentraciones superiores que las coliformes fecales 159 CF/100 mL de la misma estación), y no se registraron estreptococos fecales en las otras estaciones.

En las muestras del sedimento asociado al ostión colectado en las diferentes estaciones climáticas, no se registraron los grupos bacteriológicos.

Tabla 3. Relación CF/EF para determinar el origen de la contaminación en ostiones analizados en cada estación.

DIAS DE ALMACENADO	ORGANISMOS ANALIZADOS	RELACION CF/EF			ORIGEN		
		SECAS	LLUVIAS	NORTES	SECAS	LLUVIAS	NORTES
PRIMER DIA	1	*	0.16	*	-	ANIMAL	-
	2	*	1.6	*	-	ND	-
	3	**	0.49	*	HUMANA	ANIMAL	-
	4	**	13.8	*	HUMANA	HUMANA	-
	5	*	**	**	-	ANIMAL	ANIMAL
	6	*	0.09	*	-	ANIMAL	-
	7	*	**	**	-	ANIMAL	ANIMAL
	8	*	**	*	-	ANIMAL	-
	9	*	0.12	*	-	ANIMAL	-
	10	*	0.32	*	-	ANIMAL	-
TERCER DIA	11	*	3.16	*	-	ND	-
	12	*	0.17	*	-	ANIMAL	-
	13	*	0.03	*	-	ANIMAL	-
	14	*	0.07	*	-	ANIMAL	-
	15	*	**	*	-	ANIMAL	-
	16	*	0.17	**	-	ANIMAL	ANIMAL
	17	*	0.29	**	-	ANIMAL	ANIMAL
	18	0.14	**	*	ANIMAL	ANIMAL	-
	19	*	**	*	-	HUMANA	-
20	0.63	1	*	ANIMAL	ND	-	
QUINTO DIA	21	*	46.5	*	-	HUMANA	-
	22	**	71.1	**	HUMANA	HUMANA	ANIMAL
	23	**	0.03	**	ANIMAL	ANIMAL	ANIMAL
	24	**	48.5	*	HUMANA	HUMANA	-
	25	*	8.9	**	-	HUMANA	HUMANA
	26	**	1	**	ANIMAL	ND	HUMANA
	27	**	7.3	**	HUMANA	HUMANA	HUMANA
	28	3.78	0.14	**	ND	ANIMAL	HUMANA
	29	**	0.22	*	HUMANA	ANIMAL	-
	30	0.63	0.1	*	ANIMAL	ANIMAL	-

\* Ausencia de bacterias.

\*\* Presencia de solo uno de los grupos de bacterias.

ND = No determinada (relación CF/EF entre 0.7 - 4.0)

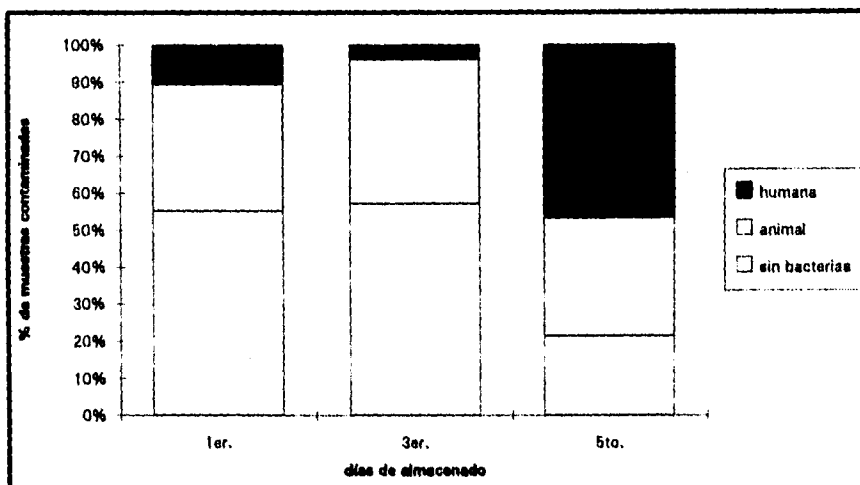


Figura 4. Proporción de la relación CF/EF para determinar el origen de la contaminación presente en ostión *Crassostrea virginica* recién colectado y sujeto a almacenamiento.

Tabla 4. Número Más Probable de bacterias registradas en agua y sedimento en la zona de colecta

BACTERIAS	COLIFORMES FECALES				ESTREPTOCOCOS FECALES			
	SECAS	LLUVIAS		NORTES	SECAS	LLUVIAS		NORTES
	MAY	AGO	SEP	NOV	MAY	AGC	SEP	NOV
AGUA (NMP/100 mL)	1519	159	< 30	< 30	< 30	572	< 30	< 30
SEDIMENTO (NMP/100 gr)	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30	< 30

El factor de bioacumulación que relacionó los contenidos microbiológicos del agua y el ostión se muestran en la Tabla 5. En ésta se aprecia como cada organismo incorporo bacterias de manera diferente con respecto a la concentración de éstas en el agua. Según Perkins *et al.*, (1980) los índices de enriquecimiento en bivalvos con respecto al agua de cultivo varían de 3-16 para coliformes fecales y de acuerdo a Prieur *et al.*, (1990) varía de 10-20 para estreptococos fecales. De acuerdo a esto, al inicio de la estación de lluvias se dio una gran acumulación de bacterias en el ostión con respecto al agua, que superaron incluso las razones indicadas.

Los factores físicoquímicos registrados en la laguna se señalan en la Tabla 6. La temperatura más baja se observó en la estación de nortes (20 °C) y la más alta a principio de lluvias (31°C), el oxígeno disuelto (OD) varió de 6.9 a 8.4 mg/L correspondiendo el valor más bajo a finales de la estación de lluvias y el más alto a la estación de secas. El pH registrado en secas fue el más bajo (5) y el valor más alto (8.3) se registró a inicios de la estación de lluvias. La menor profundidad registrada fue a principios de la estación de lluvias (1m) y la mayor profundidad en la estación de secas (3 m). Los registros por muestreo se aprecian en la Figura 5.

La relación de los factores físicoquímicos y las bacterias (Tabla 7) indicó los siguientes aspectos relevantes. Las coliformes fecales registradas en el agua, mostraron una relación significativa con el oxígeno disuelto ( $r= 0.63$ ;  $\alpha=0.05$ ). En tanto que la concentración de estas bacterias en ostión solo presentaron correlación con el pH ( $r=0.45$ ;  $\alpha =0.05$ ) y la temperatura ( $r= 0.54$ ;  $\alpha=0.05$ ). Se presentó una correlación baja entre los contenidos de bacterias del agua y del ostión ( $r=0.34$ ;  $\alpha =0.05$ ).

Los contenidos de estreptococos fecales en agua se relacionaron con el pH y la temperatura ( $r= 0.77$ ;  $\alpha =0.05$ ). Así mismo, las concentraciones de bacterias en ostión también se relacionaron con el pH ( $r= 0.78$ ;  $\alpha =0.05$ ) y con la temperatura ( $r=0.63$ ;  $\alpha =0.05$ ). En este caso se presentó una fuerte correlación entre los estreptococos fecales de agua y de ostión ( $r=0.91$ ;  $\alpha =0.05$ ).



Tabla 5. Factor de acumulación de bacterias entre el ostión y el agua superficial del banco ostrícola.

ORGANISMO ANALIZADO	RELACION**			RELACION**		
	CF OSTION	/ CF	AGUA	EF OSTION	/ EF	AGUA
	SECAS	LLUVIAS	NORTES	SECAS	LLUVIAS	NORTES
1	*	32	*	*	8	*
2	*	59	*	*	13	*
3	2.5	105	*	*	59	*
4	2.5	145	*	*	82	*
5	*	*	*	*	90	*
6	*	408	*	*	96	*
7	*	*	*	*	136	*
8	*	*	*	*	154	*
9	*	596	*	*	568	*
10	*	3303	*	*	1016	*

\* No determinada

\*\* Factor de acumulación entre 3-16 para CF (Perkins et al., 1980)

\*\* Factor de acumulación entre 10 - 20 para EF (Priour et al., 1990)

Tabla 6. Factores fisicoquímicos de la zona de colecta.

ESTACION	SECAS	LLUVIAS		NORTES
	MAY	AGO	SEP	NOV
PARAMETROS				
TEMPERATURA (°C)	25	31	30	20
OXIGENO DISUELTO (mg / L)	8.4	7.6	6.9	7.8
pH	5	8.3	6.5	8.2
PRDFUNDIDAD (m)	3	1	2.5	2.5

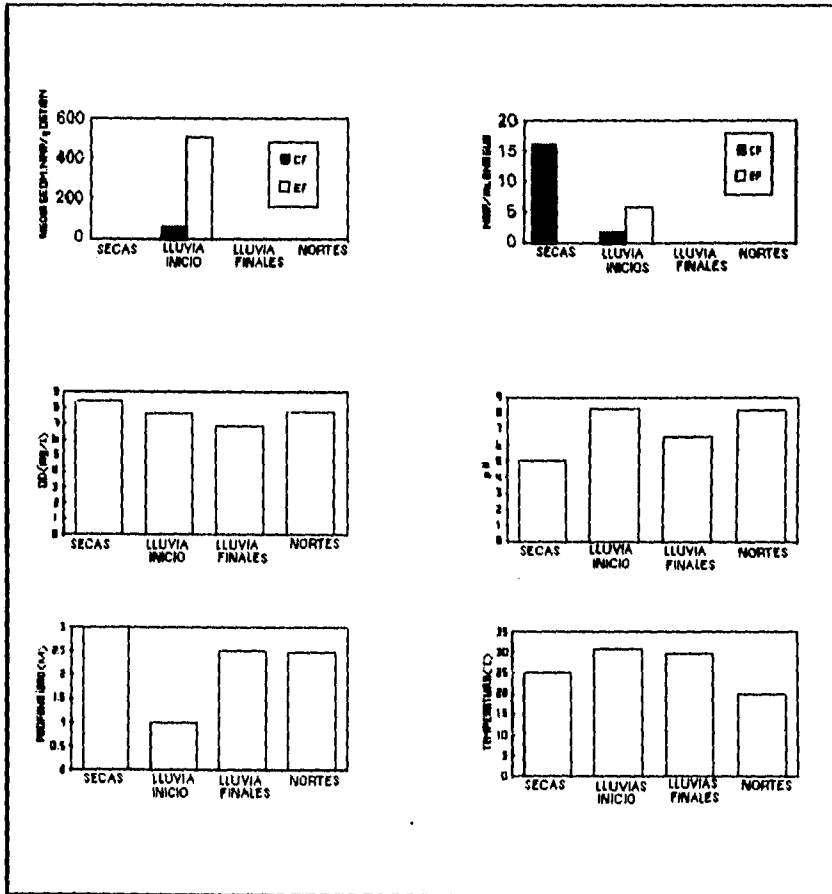


Figura 5. Bacterias coliformes fecales (CF) y estreptococos fecales en ostión, agua y los parámetros físico-químicos medidos en el banco ostrícola.

Tabla 7.

Correlación múltiple entre los factores fisicoquímicos y las bacterias registradas en ostión y agua .

DETERMINACION	pH	TEMPERATURA	OD	PROFUNDIDAD	CFa	CFo	EFa	EFo
pH	1							
TEMPERATURA	0.40*	1						
OD	0.40*	-0.60*	1					
PROFUNDIDAD	-0.72*	-0.63*	0.63*	1				
CFa°	0.34*	0.21*	0.63*	0.33*	1			
CFo°	0.45*	0.54*	-0.06	-0.47*	0.34*	1		
EFa <sup>a</sup>	0.77*	0.77*	0.25*	-0.81*	0.27*	0.69*	1	
EFo <sup>a</sup>	0.78*	0.63*	0.21*	-0.78*	0.18	0.65*	0.91*	1

°CFa y CFo : Coliformes Fecales en agua y ostión respectivamente.

<sup>a</sup>EFa y EFo, Streptococos Fecales en agua y ostión respectivamente.

\*Coeficiente de Spearman, significativo a :

$$\alpha = 0.05$$

El análisis (Kruskal-Wallis) indico una marcada variación estacional de las bacterias en ostión (Tabla 8). Las pruebas de Ducans y Newman-Keuls indicaron que durante el inicio de la estación de lluvias las concentraciones de bacterias coliformes fecales y estreptococos fueron superiores a las otras estaciones climáticas ( $p < 0.05$ ), resultado que se aprecia también en la Figura 6.

La Tabla 9 muestra las características morfométricas del ostión (longitud y el peso) registrado en cada día de almacenado, así como sus medias geométricas. La menor longitud se registró en organismos con cinco días de almacenado y fue de 5.4 cm con un peso respectivo promedio de 6.78 g. Mientras que la longitud y peso más alto se registraron en organismos con menos de 24 hrs. de colecta y fueron de 6.72 cm y 12.8 g respectivamente. La longitud de los ostiones analizados (Tabla 10) presentó diferencias significativas (Kruskal-Wallis), diferencias que se puntualizaron a través de pruebas de contraste y comparación múltiple (Ducans y Newman Keuls). El peso también mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre organismos analizados al primero con respecto a los procesados al tercer y quinto día. Sin embargo las diferencias del peso de los organismos del tercer y quinto día no fueron importantes ( $p > 0.05$ ).

En términos generales, estacionalmente la longitud y el peso de los organismos (Tabla 11) presentó diferencias ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis), las pruebas de contraste y comparación múltiple (Ducans y Newman-Keuls) señalaron que en secas, lluvias y nortes existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La prueba de Spearman no señaló una relación importante entre la longitud, las coliformes y estreptococos fecales ( $r = -0.052$ ;  $\alpha = 0.05$ ), así como tampoco con respecto al peso, coliformes y estreptococos fecales ( $r = -0.064$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

Tabla 6. Variación estacional del Número Más Probable de bacterias en ostión.

NMP DE COLIFORMES FECALES		NMP DE ESTREPTOCOCOS FECALES	
PRUEBA	ESTADÍSTICO	PRUEBA	ESTADÍSTICO
KRUSKAL-WALLIS	10.68*	KRUSKAL-WALLIS	21.86*
NEWMAN-KEULS DUCANS	ESTADÍSTICO	NEWMAN-KEULS DUCANS	ESTADÍSTICO
DIFERENCIAS ENTRE INICIOS DE LLUVIAS Y :		DIFERENCIAS ENTRE INICIOS DE LLUVIAS Y :	
FINES DE LLUVIAS	7.13*	FINALES DE LLUVIAS	8.44 *
SECAS	6.38*	SECAS	8.09*
NORTES	7.03*	NORTES	8.36*

\*Prueba significativa ( $p < 0.05$ )

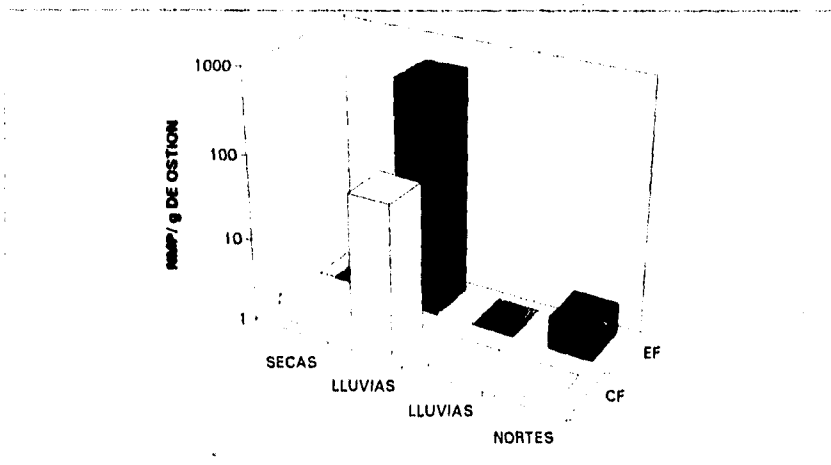


Figura 6. Media Geométrica del NMP de bacterias coliformes fecales (CF) y estreptococos fecales (EF) registrados en ostión durante cada estación.

Tabla 9. Características Morfométricas del ostión de la laguna de Tamiahua, Ver. y su correlación con bacterias coliformes y estreptococos fecales.

No. DE MUESTRA	TIEMPO DE ALMACENADO DEL OSTION	LONGITUD (cm)				PESO (g)			
		SECAS		LLUVIAS		SECAS		LLUVIAS	
		MAY	AGO	SEP	NOV	MAY	AGO	SEP	NOV
1	PRIMER DIA (ANTES DE 24 HRS)	8.5	9	8	8.7	9.2	18.1	11.9	11.3
2		9.9	5.5	5	5	22.8	9.9	14	9.4
3		9.1	7.5	8.5	6	17.5	10.7	15.2	9.1
4		7	8.5	6	6	17.8	16.1	15.3	11.1
5		8	7.5	7	5.5	41.8	9.8	14.8	10.6
6		8	7.5	7	5	16.8	21	25.2	7.3
7		8.5	6	5.5	7	13.1	12	7.2	11
8		9.3	6	6	5.5	19.7	8	10.0	7.4
9		7	7.5	6	4.5	14.3	15	9.5	5.5
10		6.5	6	6	5.5	12	16.5	6.6	20.7
MEDIA	GEOMÉTRICA	6.72				12.6			
	DESV. STD.	0.08				0.17			
COEFICIENTE SPEARMAN		0.25*				0.28*			
COLIFORMES		0.07*				0.01*			
ESTREPTOCOCOS									
11	TERCER DIA (72 HRS)	10.6	6.5	5.5	5.5	18.3	6.6	6.4	6.5
12		8.5	8.3	3.5	5	17.4	13.4	7.8	6.7
13		7.3	6.5	6	5.7	14.1	5.8	13.7	5
14		6.2	6	5.5	6	8.9	12.7	9.1	9
15		10.1	8.3	4	5	12.1	14.1	5	3.2
16		10.7	7.5	5	4.5	9.5	11.8	10.6	1.5
17		6.1	6	4	6	11.4	12.5	6.1	4.8
18		8.3	7.3	5	6	13.3	18.8	8.5	.8
19		6.5	5.5	6.5	5	9.3	10	9	7.8
20		7.1	6	5.5	5.5	4.8	13	4.4	5.1
MEDIA	GEOMÉTRICA	6.15				7.69			
	DESV. STD.	0.11				0.27			
COEFICIENTE SPEARMAN		0.28*				0.18*			
COLIFORMES		0.37*				0.21*			
ESTREPTOCOCOS									
21	QUINTO DIA (120 HRS)	6	5	6	6	6.3	6.8	7.5	4.7
22		7	5.5	5	4	4.6	5.2	9	3.8
23		7	8	6	4.5	13	5.5	10.2	6.1
24		6	5.5	4.5	5	9	2.1	2.1	8.2
25		7	5.5	6	4	12.4	6.9	19.4	4.5
26		6.2	4.5	5.5	5	9.6	6	9.4	5.9
27		6.5	6	5	4.7	7.8	8	6.3	8
28		7.5	5.5	5	5	8	14.7	9.7	5.5
29		6	6	6	5	10.1	9.7	7	5
30		7.5	5	5	4.5	8	7.8	5	2
MEDIA	GEOMÉTRICA	5.54				6.78			
	DESV. STD.	0.07				0.21			
COEFICIENTE SPERMAN		0.08*				0.07*			
COLIFORMES		0.17*				0.07*			
ESTREPTOCOCOS									

\* indice de correlación no significativo ( $p > .05$ ).

Tabla 10. Variación durante el almacenamiento de la longitud (cm) y peso (g) en ostión.

LONGITUD		PESO	
PRUEBA	ESTADÍSTICO	PRUEBA	ESTADÍSTICO
KRUSKAL-WALLIS	15.82*	KRUSKAL-WALLIS	30.87*
NEWMAN-KEULS DUCANS	ESTADÍSTICO	NEWMAN-KEULS DUCANS	ESTADÍSTICO
DIFERENCIAS ENTRE LA LONGITUD DEL :		DIFERENCIAS ENTRE LA LONGITUD DEL :	
DIA 1 VS DIA 3	3.21*	DIA 1 VS DIA 3	6.62*
DIA 1 VS DIA 5	7.74*	DIA 1 VS DIA 5	8.97*
DIA 3 VS DIA 5	4.54*	DIA 3 VS DIA 5	2.35

\*Prueba significativa ( $p < 0.05$ )

Tabla 11. Variación estacional de la longitud (cm) y el peso (g) en ostión de la laguna de Tamiahua .

LONGITUD		PESO	
PRUEBA	ESTADÍSTICO	PRUEBA	ESTADÍSTICO
KRUSKAL-WALLIS	51.9*	KRUSKAL-WALLIS	23.9*
NEWMAN-KEULS DUCANS	ESTADÍSTICO	NEWMAN-KEULS DUCANS	ESTADÍSTICO
DIFERENCIA ENTRE INICIOS DE LLUVIAS Y :		DIFERENCIA ENTRE INICIOS DE LLUVIAS Y :	
FINES DE LLUVIAS	4.67*	FINALES DE LLUVIAS	1.33
SECAS	6.22*	SECAS	4.05*
NORTES	6.63*	NORTES	4.89*

\*Prueba significativa ( $p < 0.05$ )

## IV. Discusión

El empleo de microorganismos indicadores de contaminación como coliformes fecales y estreptococos fecales esta ampliamente difundido por fácil detección, aplicación rutinaria y su uso histórico en investigaciones de calidad sanitaria, así como por la relación que guardan con bacterias patógenas (Hood *et al.*, 1983). La detección de estos grupos indicadores a través del método de tubos múltiples ha sido empleado con mayor frecuencia en un gran número de trabajos experimentales, y los resultados obtenidos por este método han tenido mayor aceptación por su bajo costo y porque pueden compararse fácilmente (Grabow *et al.*, 1990; Bealaeff y Mary, 1993).

En diferentes estudios, así como dentro de la normatividad mexicana se ha empleado el método de tubos múltiples para evaluar la calidad sanitaria de moluscos bivalvos a partir de un homogenizado de 100 g de músculo de estos organismos (Hussong *et al.*, 1981; Rosas *et al.*, 1985; Rodríguez, 1986; Diario Oficial, 1987; González *et al.*, 1988; APHA, 1989; FDA, 1992; Curmier *et al.*, 1993). Sin embargo, la utilización de diferentes cantidades de organismos, 10, 20 organismos ó 25 g de músculo ó incluso diferentes diluyentes y diluciones no afectan los resultados (Volterra *et al.*, 1980). En esta investigación se optó por sustituir el homogenizado de ostiones, por el análisis individual, ya que se consideró que de esta manera se puede discernir sobre el proceso de acumulación en el ostión. Welsh y Sizemore (1985) señalan que la incidencia actual de infecciones en poblaciones naturales de las jaibas *Callinectes sp.* puede ser sólo determinada después de su colecta y realizando el análisis individual de éstos inmediatamente.

El contenido de coliformes fecales registrado en ostión con 24 y 72 hrs de almacenado se considero satisfactorio para el consumo humano, ya



que ninguna de las muestras excedió de un NMP de 230 CF y dado que son menores o iguales de 330 CF/100 g (Vargas y Lizárraga-Partida, 1993), a excepción de los organismos correspondientes al inicio de la estación de lluvias y los analizados con cinco días de almacenamiento los cuales rebasaron los límites máximos permitidos de bacterias (Tabla 1)

Las concentraciones de bacterias de ostión analizado antes de las 24 hrs. de colecta presumiblemente revelan la calidad bacteriológica de los moluscos al momento de la colecta. La comparación de la calidad de estos organismos con la de organismos almacenados permitió evidenciar que existe fluctuación en la densidad de bacterias a través del tiempo de almacenado (Figura 3). Esto coincide con lo reportado por Boury y Borde (1964) que registraron bajas fluctuaciones en la densidad de bacterias en ostión almacenado de 2 a 3 días y un incremento significativo al prolongarse el período de almacenamiento, en donde se consideró que la temperatura tiene gran influencia. Estos resultados pueden haberse debido, a la capacidad que tienen los moluscos de mantener sus valvas cerradas y retener humedad, prolongando así su supervivencia y la de microorganismos que en él se encuentran (Prieur *et al.*, 1990). Por otra parte, el almacenamiento prolongado de los bivalvos aumenta su estrés fisiológico situación que pudo facilitar el incremento bacteriano.

El contenido de estreptococos fecales en los organismos analizados se presentó por debajo del límite de la norma francesa de 2500 EF/100 mL (Prieur *et al.*, 1990), lo cual asegura la inocuidad del consumo de estos moluscos. La resistencia de las estreptococos fecales, ha limitado su uso desde el punto de vista sanitario como indicador ya que este grupo guarda menos relación con las bacterias patógenas, que el grupo coliforme fecal. Sin embargo, este grupo también incluye especies patógenas para el hombre y animales (Austin y Allen, 1985; Braude *et al.*, 1984) y se presenta generalmente en todas las muestras que contienen coliformes fecales (Plusquellec *et al.*, 1983), ya que algunos miembros están

presentes normalmente en las heces de los mamíferos (Thatcher y Clark, 1973).

La relación de los contenidos de bacterias estreptococos fecales con las coliformes fecales, se utiliza para atribuir un posible origen a la contaminación presente (Wheater *et al.*, 1979).

La relación CF/EF en ostiones de 1 y 3 días de almacenamiento señalan contaminación de origen animal, sin embargo la relación CF/EF en ostión con cinco días de almacenado indicó una fuente de contaminación humana, esto fue como resultado del incremento significativo de las concentraciones de bacterias coliformes fecales, así como a la mayor frecuencia de aparición de este grupo en los moluscos analizados (Figura 4). Un resultado similar fue reportado por Wheeler *et al.* (1979) en donde señalaron, que los índices de la relación CF/EF en muestras de agua se incrementaron parcialmente en las primeras 24 hrs debido al aumento en el número de coliformes fecales y un análisis posterior a las 48 hrs indicó que los índices disminuyeron debido a que las coliformes fecales sobrevivieron menos que los estreptococos. Existió un incremento en este índice en algunas muestras a las 120 hrs dependiendo del lugar de donde se habían colectado, ya que unas estaban más contaminadas que otras y la sobrevivencia de las bacterias fue diferente. Gerba y McLeod (1976) constataron que cuando existe una buena cantidad de nutrientes disponibles *E. coli* sobrevive más tiempo y compete más eficazmente contra otras bacterias. Esta podría ser la razón de que las concentraciones de estreptococos registradas en ostiones con 5 días de almacenado, fueran más bajas que las de coliformes fecales, y originaran que los índices de la relación CF/EF aumentaran sugiriendo una fuente de contaminación humana, que bien podría ser, consecuencia de la competencia interbacterial. La sobrevivencia diferencial de las bacterias, así como la influencia de otros factores, pueden afectar los contenidos bacteriológicos del ostión y originar una variación en la relación CF/EF que podría llevar a

interpretaciones equivocadas, si no se toma en cuenta el tiempo de almacenamiento.

Las concentraciones de bacterias obtenidas en ostión con menos de 24 hrs. de almacenamiento, dependen de la eficiencia en el mecanismo de acumulación y depuración, así como de las bacterias presentes en el medio en que se desarrolla (Prieur *et al.*, 1990).

A partir de los resultados obtenidos, el factor de acumulación (Tabla 5) señala índices de enriquecimiento altos en los moluscos, solo al inicio de la estación de lluvias, siendo la diferencia registrada entre bivalvos y agua, de más de 2 ordenes de magnitud para coliformes fecales y menor de 1.5 para estreptococos fecales.

Las bacterias coliformes fecales determinadas en el agua representan un hecho puntual y pueden algunas veces reflejar cambios ambientales asimismo dependen de la frecuencia de los aportes de agua residual. Su concentración varía más fácilmente que las bacterias acumuladas en ostión, menos expuestas a los cambios ambientales. La concentración de bacterias en estos organismos podría corresponder a un estado anterior del agua más contaminado, originando que en ocasiones no exista o sea mínima la correlación de las coliformes en ostión con las bacterias registradas en el agua, en esta investigación la correlación obtenida entre ostión y agua fue de  $r = 0.34 \alpha 0.05$ .

Cabelli y Heffernan (1971) señalan que la acumulación de bacterias en el ostión es un hecho integrado en el tiempo que depende de la duración del período de contaminación y se ha demostrado que dicho proceso, es independiente del medio en un período de 6 a 48 hrs. Por lo tanto los diferentes niveles de contaminación en moluscos bivalvos pueden deberse, tanto a las concentraciones de bacterias fecales en el medio, como al tiempo en que los organismos llevan a cabo el proceso de acumulación, así como a la influencia de los factores que afectan dicho proceso, pudiendo ser esta la causa de las diferencias entre las razones

del factor de acumulación observadas con las recomendadas por otros autores.

El índice de acumulación de bacterias en ostión, tiene diferentes ordenes de magnitud por la diferencia de concentración de bacterias coliformes y estreptococos registradas en agua.

La mayor frecuencia de ostiones con estreptococos y la estrecha relación con las bacterias estreptococos registradas en el agua ( $r = 0.91$ ) parecen indicar que el ostión retiene a estas bacterias más fácilmente que las coliformes. La mayor concentración de estreptococos acumulados en bivalvos, puede deberse a una mayor adaptación a las condiciones hostiles encontradas en el tracto digestivo de los moluscos, lo que amplificaría la relativa resistencia de los estreptococos a varios factores ambientales (Plusquellec *et al.*, 1983).

Los concentraciones de estreptococos fecales en el ostión presentaron más relación con la presencia de este grupo en el agua ( $r = 0.91 \alpha 0.05$ ), así como menos variación durante el almacenado que el grupo coliforme fecal, por lo cual se considera, un indicador de contaminación, más estable en ostión, que permitiría una evaluación de la contaminación del agua con pocas variaciones en el tiempo. Esto concuerda con lo reportado por Plusquellec *et al.* (1983) y Prieur *et al.* (1990) quienes indicaron que los estreptococos fecales son más resistentes a cambios ambientales y establecieron la conveniencia del uso de este grupo de bacterias como indicadoras de contaminación fecal en moluscos bivalvos.

La considerable correlación de los dos grupos de bacterias en el ostión ( $r = 0.65$ ;  $\alpha = 0.05$ ) confirman la presencia simultánea de coliformes fecales y estreptococos. Una alta correlación entre los dos grupos indicadores también ha sido encontrada en diversos estudios epidemiológicos y ha permitido sugerir que los estreptococos fecales son tan buenos indicadores como los coliformes fecales; por este motivo, han

sido incluidos en las evaluaciones de calidad del agua de Estados Unidos, Canada, Australia y Nueva Zelanda (Sinton *et al.*, 1994).

Delatree y Delesmont (1981) consideran que la contaminación en los moluscos puede ser tan variable como la contaminación del agua. La acumulación de bacterias en moluscos bivalvos se puede clasificar en dos grupos: el primero que comprendería a moluscos homogéneamente contaminados con altos niveles de contaminación y el segundo grupo, que estaría constituido por moluscos contaminados con diferentes concentraciones de bacterias que no habrían alcanzado el grado máximo de contaminación del agua.

La relación entre la concentración de bacterias y los cambios de algunos de los factores fisicoquímicos, ha sido demostrada, ya que estos influyen en la distribución, abundancia, estado fisiológico del ostión e incluso en la relación que se establece entre los moluscos bivalvos y bacterias contaminantes presentes en el medio (Sevilla y Ramírez, 1965; Wood, 1961; Wood, 1979).

La relación de las coliformes fecales en el agua, con el oxígeno disuelto, coinciden con lo reportado por Romero y Rodríguez (1982) quienes registraron altas concentraciones de coliformes fecales en áreas donde el contenido de oxígeno disuelto era alto. Sin embargo, la escasa relación entre los contenidos de coliformes en el agua y en el ostión podría deberse a que, como señalan Davies-Colley y Dannison (1994) las coliformes fecales son menos resistentes que el grupo de estreptococos fecales a cambios del medio.

Las concentraciones de estreptococos fecales en el agua parecen ajustarse mejor a los cambios de pH y a la temperatura, relación que podría derivarse de la ya mencionada resistencia del grupo. Curtis (1992) y Sinton *et al.* (1994) han reportado que altas temperaturas pueden actuar sinérgicamente con el pH, ocasionando que las coliformes fecales se vean inactivadas al dañarse su membrana citoplasmática.

Comparativamente el grupo de estreptococos es más resistente en el agua porque presenta menor susceptibilidad a la acción sinérgica del pH y la temperatura y a la depredación por protozoarios que aparentemente consumen las distintas especies de bacterias con diferente eficacia (Curtis *et al.*, 1992).

La relación del pH y la temperatura con el grado de contaminación adquirida por los moluscos, tanto de coliformes como de estreptococos pudo depender en gran parte de la actividad alimenticia del ostión. El pH tiene influencia en el proceso de alimentación de las ostras, existiendo condiciones óptimas entre 6 a 8.5 por debajo o por encima de los cuales el proceso de la filtración cesa (Secretaría de Pesca, 1988). Posiblemente en la estación de secas, a pesar de existir gran cantidad de bacterias en el agua, el pH 5 registrado limitó la concentración de bacterias en ostión (Figura 5). Losanoff y James (1947) han indicado que altas concentraciones de microorganismos e incluso de material particulado limitan la actividad filtradora del ostión; señalan un decremento en el factor de acumulación cuando la densidad de partículas en el agua aumenta y un incremento en la acumulación bacteriana cuando disminuye.

Los valores de la temperatura (20 a 31° C) y el oxígeno disuelto (> 5.0) registrados en el medio, se encontraron dentro de los intervalos señalados como óptimos para el desarrollo de ostión (Bardach, *et al.*, 1992; Environmental Protection Agency, 1973). La temperatura del agua tiene influencia significativa en la actividad fisiológica de los bivalvos (Prieur *et al.*, 1990) donde las consecuencias de los efectos de la temperatura junto con algunos otros factores, se reflejan en los cambios estacionales de contaminación y depuración de estos organismos.

Durante el inicio de la estación de lluvias, las bacterias coliformes fecales y estreptococos fecales fueron más frecuentes y en concentraciones superiores a la estación de secas, finales de lluvias y nortes (Tabla 8; Figura 6). Una variación estacional semejante ha sido

reportada por otros autores, quienes han señalado que los moluscos y el agua de intervalvas contienen mayor número de coliformes durante junio, julio y agosto y menor número durante septiembre y noviembre en diferentes sitios del Golfo de México (Volterra, et al 1983; Watkins y Cabelli, 1985; Ruple y Cuok, 1992). La presente investigación nos indica que existe mayor probabilidad de contraer enfermedades asociadas con la ingestión de mariscos contaminados al inicio de la estación de lluvias.

Los incrementos de bacterias al inicio de las lluvias pueden deberse al aumento del volumen de agua en el alcantarillado que aporta microorganismos fecales y materia fecal humana y animal, que es arrastrada por el agua de lluvia proveniente del área urbana, agrícola y ganadera (López, 1990). Los aportes de coliformes pueden ser posteriormente dispersados por las corrientes de agua de la laguna, desapareciendo en un período de tiempo variable que depende de la mezcla con el agua de mar, de las condiciones fisicoquímicas del medio, la dinámica de las corrientes, los vientos y las mareas (Romero y Rodríguez, 1982; Barrera et al., 1990).

En el área de estudio no se registraron coliformes y estreptococos fecales. En esta zona, el sedimento es de tipo arenoso y como ha sido señalado en la literatura, este substrato no presenta buena adsorción de materia orgánica y de contaminantes que permitan a su vez retener los grupos coliformes (Gerba y Mcleod, 1976). En estudios recientes se ha reportado en las cercanías del banco de colecta bajos contenidos de carbono orgánico (Contreras, 1994) lo cual podría ser la causa de la ausencia de bacterias en sedimento. Sin embargo, consideramos que en futuros estudios se deberían tomar un mayor número de muestras para corroborar los resultados obtenidos en el presente trabajo, debido al carácter probabilístico de la prueba.

En relación a los aspectos morfométricos, los resultados indicaron que la longitud ( $r = -0.052$ ,  $\alpha 0.05$ ) y el peso ( $r = -0.064$ ,  $\alpha 0.05$ ) de los

organismos no mostraron correlación significativa con las concentraciones de bacterias. La longitud (cm) de los organismos analizados del primer al quinto día, indicó que se procesaron organismos de mayor longitud en los primeros días de análisis. La disminución del peso de los organismo pudo estar relacionada con la pérdida de humedad durante el almacenamiento. Sin embargo en este estudio, lo anterior no se pudo demostrar estadísticamente debido al sesgo en el procesamiento de los organismos de mayor longitud al inicio del análisis (Tabla 10).

Las diferencias estacionales de la longitud y el peso de ostión pueden atribuirse al ciclo de vida de los organismos habiendose colectado organismos de mayor talla durante los meses más cálidos (secas y principio de lluvias) en los cuales las condiciones ambientales pudieron favorecer la alimentación y el crecimiento de la especie *Crassostrea virginica*.

Son múltiples las interrelaciones extrínsecas e intrínsecas que los moluscos establecen con el medio durante el proceso de acumulación de bacterias, aspectos que la legislación mexicana en cuanto a normatividad no contempla al establecer los límites máximos permisibles. Estudios regionales a través de monitoreos frecuentes que contemplen la dinámica de los cuerpos de agua usando incluso otros indicadores, como los estreptococos serían útiles para establecer zonas de cría, cultivo o depuración del recurso ostrícola. Es necesario vigilar más severamente el cumplimiento del reglamento sanitario durante la comercialización en cuanto al manejo, conservación y almacenado, previendo de esta manera el impacto de riesgo sobre la salud pública y beneficiando al mismo tiempo el comercio del ostión.



## **V. Conclusiones**

1.-El ostión del banco ostrícola de la laguna de Tamiahua rebasó los límites microbiológicos aceptables para coliformes fecales a principios de la estación de lluvias. No se rebasaron los límites sugeridos para estreptococos fecales en ninguna estación climática.

2.- Las condiciones de almacenado utilizado para el ostión extraído de la laguna, favorecen el incremento en los niveles de bacterias coliformes fecales en ostión después de las 72 hrs.

3.- La concentración de estreptococos fecales no presentó cambios significativos durante el almacenamiento.

4.- La relación CF/EF indicó que el origen de la contaminación en el lugar de colecta fue posiblemente animal en el ostión analizado antes de transcurrir 24 hrs. desde su colecta.

5.- Se presentó una mayor frecuencia de ostiones con estreptococos que con coliformes fecales.

6.- Las bacterias estreptococos fecales en agua y ostión presentaron buena correlación ( $r=0.99$ ;  $\alpha= 0.05$ ) reafirmando la utilización de estos moluscos como buenos indicadores de contaminación.

7.- El pH y la temperatura presentaron mayor correlación con los grupos de bacterias registradas en ostión, posiblemente porque son factores que se relacionan con procesos de la actividad metabólica.

8.- La longitud y el peso de los organismos analizados no mostraron relación con las concentraciones de bacterias registradas.

## VI. Literatura Consultada

- Austin, B. y D.Allen-Austin. 1985. A Review Bacterial Pathogens of Fish. *Jour. of Appl. Bacteriology*, 58.483-506.
- American Public Health Association (APHA). 1989. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. 15ª ed. Diaz de Santos, S.A., Madrid España: 1139 p.
- Ayala-Castañares, A., R. Cruz, A. Jr. Garcia-Cubas y L.R. Segura. 1969. Síntesis de los conocimientos sobre la geología marina de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México. Simp. Intern. Lagunas Costeras. UNAM-UNESCO. 39 - 48.
- Bardach, J., J. Ryter, y W. Clarney. 1992. *Acuacultura*. AGT Editor, México, D.F. : 739 p.
- Barrera, E. G, L. Juárez, G. Segura, y C. Rosas. 1987. Resultados preliminares de las poblaciones de bacterias Coliformes totales Fecales y Estreptococos, su dinámica en los ciclos de mareas y estaciones, en el estero Milpas de la laguna de Tamiahua, Veracruz. II Jornadas Divisionales UAM - I. México, D.F. C-38.
- Barrera, E. G., J. Díaz, F. Martínez, P. Ramírez, E. Ducoing y C. Rosas. 1989. Evaluación de la Calidad Sanitaria en agua y sedimento de la Laguna de Tamiahua, Ver. México. III Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar. Instituto Oceanográfico de Venezuela. Cumaná, Venezuela : 45.
- Barrera, E. G., M. Martín, P. Maciel, V. Vicencio, C. Ducoing, R. Ramírez. 1990. Calidad Sanitaria de los esteros de la Laja y Cucharas de la Laguna de Tamiahua, Ver. X Coloquio de Investigación. ENEP IZTACALA, UNAM. 26 al 28 de noviembre Res.
- Bealiaeff, B. y J. Mary. 1993. The " Most Probable Number" Estimate and its Confidence Limits. *Water Reseach*. 27 (5) : 799 - 805 p.

- Botello, A., V. 1994. "Evaluación Ambiental de las Lagunas Costeras de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tampamachoco, Veracruz para el Aprovechamiento y Conservación de su Biodiversidad". Reporte final del proyecto multidisciplinario. Informe interno. UAM- I. México : 98 p.
- Boury, M. y J. Borde. 1964. la contamination bacterienne des coquillages. In *Pollut. Mar. Micro. Prod. Petrol. Symp. Monaco*. CIESM. 277-284.
- Braude, A., Ch. Davis y F. Joshua. 1984. *Microbiología Clínica*. Ed. Panamericana, México : 909 p.
- Cabelli, V. y W. Heffernan. 1970. Accumulation of *Escherichia coli* by the Northern Quahaug. *Appl. Microbiol.* 19: 239 - 244.
- Cabelli, V. y W. Heffernan. 1971. Elimination of Bacteria by the Northern Quahaug; Variability of the Response of individual animals and development of Criteria. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.* 61: 102 - 108.
- Castañeda, O.L. y F. E. Contreras (Compiladores). 1994. Bibliografía comentada sobre ecosistemas costeros mexicanos. vol III : Golfo de México I. ( De Tamaulipas a Veracruz). CONABIO/ UAM- I / CDELM. México, D.F. : 615 p.
- Curmier, A., S. Chiason y A. Leger. 1993. Comparison of Maceration and Enumeration Procedures for Aerobic Count in Selected Seafoods by Standard Method Petrifilm, Redigel and Isogrid. *Journal of Food Protection.* 56 (3): 249 - 251 p.
- Curtis, T., M. Duncan y A. Silva. 1992. Influence de pH, Oxigen and Humic Substances on ability of Sunlight to Damage Fecal Coliforms in Water Stabilization Pond Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (2): 1335 - 1343.
- Davies- Colley, R., y M.A. Dannison. 1994. Sunligh Inactivation of Enterococci and Fecal Coliforms in Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (3). 2049 - 2058.
- Delattre, J. y R. Delesmont. 1981. Analyse des coquillages peut-elle servir au controle microbiologique du littoral. *Rev. Int. Oceanog. Med.*: 43-44, 11- 16.

- Declerck, D. 1991. Relationship Between The Bacteriological Quality Of Seawater, Sediment And Mussels Of The Belgian Coast. *Revue de Agriculture*. 44 (3) : 507 - 516.
- Diario Oficial de la Federación, 22 de Junio de 1987. Norma Oficial Mexicana para la Detección y Enumeración de Organismos Coliformes, Organismos Coliformes Termotolerantes y *Escherichia coli*. NOM-AA-42-1987: 17p.
- Diario Oficial de la Federación. 13 de Diciembre de 1989. Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. CEE-CCA-001/ 89: 26-36.
- Escobar, N. 1989. Bacteriological Condition of the Magrove Oyster (*Crassostrea rhizophorae guilding*) in the Cienega Grande de Santa Maria, Colombian Caribbean. *Anales del Inst. de Investig. Marinas de Punta Betin, Colombia* : 137 - 152 .
- Environmental Protection Agency: 1973. Water Quality Criteria. Ecological Research Series, Washigton, D.C.: 594.
- Food and Drug Administration (FDA). 1992. National Shellfish Sanitation Program Manual of Operations. *U.S. National Shellfish Program. Shellfish Sanitation FDA*. Washington, D.C. : 10 - 87.
- Gerba, P. y J.S. Mcleod. 1976. Effect of Sediments on the Survival of *Escherichia coli* in Marine Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 32 (1): 114 - 120.
- González, A.S., C. Ruíz y A. Pérez. 1988. Aislamiento de enterobacterias a partir de Ostión recientemente extraido de su banco. VIII Coloquio de Investigacion. ENEP-IZTACALA UNAM. México. C 31.
- Goyal, M.S., Ch. Gerba, y J.L. Melnick, 1979. Human Enteroviruses in Oysters and Overlying Waters. *Appl. and Environ. Microbiol.* 37 (3): 573 - 581.
- Grabow, W., J. Villers, N. Prinsloo, R. Morris y K. Botzenhart. 1990. An Assessment of Methods for the Microbiological analysis of Shellfish. Health, Related, Water Microbiology. *Water Sci. Technol.* 24 (2) : 413 - 416 .

- Hernandez, J. y F. Vargas. 1993. Consideraciones en la Cuantificación de Coliformes Fecales en Aguas de Mar. V Congreso Latin. Amer. de Ciencias del Mar. La Paz, B.C.S. C 46.
- Hood, A.M., G. Ness y N. Blake. 1983. Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 (1): 122 - 126.
- Hussong, D., J. Daware, R. Weiner y R. Calwell, 1981. Bacteria Associated with False - Positive Most Probable Number Coliform Tests Results for Shellfish and Estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 (1) : 35 - 45.
- Loosanoff, V.L. y B.J. Engle. 1947. Effect of Different Concentrations of Microorganisms on the Feeding of Oysters. *O. virginica. Fishery Bulletin.* Washigton. 42 (51): 31 - 54 .
- López, A. P. 1990. Abastecimiento de Agua Potable y Disposición y Eliminación de Excretas. IPN. México, D. F. 295 .
- McJunkin, F. 1988. *Agua y Salud Humana*. Ed. Limusa. México, D.F. 259.
- Merck, E. 1982. *Manual de Medios de Cultivo*. Ed. Merck. Darmstadt : 347 p.
- Pelczar, M., R. Reid. y E. Chan. 1982. *Microbiología*. Mc Graw Hill, México: 741 p.
- Perkins, F., D. Haven, R. Alamo y M. Rhodes. 1980. Uptake and Elimination of Bacteria in Shellfish. *J. Food Prot.* 43: 124- 126.
- Plusquellec, A., M. Beucher y Le Gal. 1983. Enumeration of the Bacterial Contamination of Bivalves in Monitoring the Marine Bacteria Pollution. *Marine Pollut. Bull.* 14: 260 - 262.
- Pontefract, R., F. Bishai, J. Hockin, G. Bergerun y R. Parent. 1993. Norwalk-like viruse associated with a gastroenteritis outbreak folowing oyster consumption. *J. of Food Protecc.* 56 (7): 604 - 607.

- Prieur, D., G. Mevel, J. Nicolas, A. Plusquellec y M. Vigneulle. 1990. Interactions Between Bivalve Molluscs and Bacteria in the Marine Environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28: 277- 352.
- Rodríguez, C.R. y E. Fernández. 1968. Estudios bacteriológicos de la calidad sanitaria de los ostiones consumidos en la ciudad de México. *Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol.* 10: 93 - 100 .
- Rodríguez, S. H. 1986. Bacterias Coliformes en el Procesamiento de Ostiones (*Crassostrea virginica* ) en Tabasco, México. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. UNAM. México.* 13 (1): 455 - 458 .
- Rodopoulou, G. y M. Papapetropoulou. 1992. Pollution indicators along the beaches of Achala. *Acta Microbiologica Hellenica.* 37 (2) : 195 - 209.
- Romero, J. J. y H. S. Rodríguez 1982. Niveles actuales de Contaminación Coliforme en el sistema Lagunar del Carmen Machona, Tabasco. *An. Inst. Cienc. del Mar. y Limnol. UNAM. México.* 9 (1) : 121 - 126.
- Rosas, I., A. Yela y A. Baez. 1985. Bacterias Indicadoras de Contaminación Fecal en Ostión ( *Crassostrea virginica* ) durante su desarrollo y Procesamiento en el Mercado. *Contam. Amb.* 1 : 51 - 64.
- Ruple, A. y F. Cook. 1992. *Vibrio vulnificus* and Indicator Bacteria in Shellstock and Commercially Processed Oyster from the Gulf Coast. *Jour. Food Protecc.* 55 (9) : 667-671.
- Secretaría de Pesca. 1988. Manual Técnico para la Operación de Centros Acuícolas Productores de Ostión. ISBN 968-817-146-8. México, D.F.: 184.
- Secretaría de Pesca. 1990. Anuario Estadístico de Pesca. Dirección General de Programación e Informática, México, D.F. 42 p.
- Secretaría de Salud. 1993. Anteproyecto de Norma para el control de la calidad de moluscos bivalvos. 32 p.
- Secretaría de Salud. 1994. Manual de Procedimientos para el Análisis Microbiológico de Moluscos Bivalvos. México, D.F.: 1 - 22.

- Sevilla, M.L. y R. Ramirez. 1965. Las ostras de México, datos biológicos y planeación de su Cultivo. Inst. Nal. de Invest. *Biol. Pesquera*. 7 : 93 p.
- Sinton, L., R. Davis-Colley y R. Bell. 1994. Inactivation of Enterococci and Fecal Coliforms from Sewage and Meatworks Effluents in Seawater Chambers. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (2) 2040 - 2048.
- Splitter, P., S. Cruz y J. Rodríguez. 1989. La selección del tamaño de las partículas alimenticias por el ostión *Crassostrea nizophorae*. *Revista De Investigaciones Marinas*. 10 (1): 63 - 70.
- Steel, R. y J. Torrie. 1988. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. McGraw-Hill. Mexico, D.F.: 621 p.
- Thatcher, F. y D. S. Clarck. 1973. *Análisis Microbiológico de los alimentos*. Ed. Acribia, España: 267 p.
- Vargas, G. y L. Lizárraga-Partida. 1993. Manual de Prácticas de Laboratorio del Curso Bacteriología Marina. Comunicaciones Académicas, Serie Ecología. CICESE. Ensenada B.C. Mex. : 31 p.
- Volterra, L., F. Aulicino, E. Tosti, y M. Zicarelli. 1980. Bacteriological Monitoring of Pollution in Shellfish: Methodological Evaluation. *Water, Air and Soil Pollution*. 13: 399- 410.
- Volterra, L., G. Piccininno, E. Palliola, F. Aulicino y M. Gianfranceschi. 1983. Environmental Fecal Pollution and Concentration Power of the Clam *Chamelea gallina*. Istituto Superiore di Sanità. Roma Italia. 415-421.
- Watkins, W.D. y V.C. Cabelli 1985. Effect of Fecal Pollution on *Vibrio parahaemolyticus* Densities in an Estuarine. *Environment. Appl. and Environ Microbiol.* 49 (5). 1307 - 1313 p.
- Welsh. P. C. y R. Sizemore. 1985. Incidence of bacteremia in stressed and unstressed population of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (2) : 420 - 425 .
- Wheater, D. W., D. Mara y J. Oragui. 1979. Indicator System to Distinguish Sewage From Stormwater Run-off and Human from Animal Faecal

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Material. In: James, A. y L. Evinson (Eds) *Biological Indicators of Water Quality*. John Wiley and Sons. 21-1 - 21-27.

Wood, P.C. 1961. The Production of Clean Shellfish. *Royal Society of Health Journal*. 81 (3): 72 - 83.

Wood, P.C. 1979. Public Health Aspects of Shellfish from Polluted Water In: James, A. y L. Evison (Eds). *Biological Indicators of Water Quality*. John Wiley y Sons. us:13 - 1 - 13- 17.



ANEXO

## **BUFFER DE FOSFATOS ESTERIL.**

(Thatcher, F. y Clarck, 1973)

### **SOLUCION A .**

Pesar 80 g de cloruro de sodio ( NaCl ).

2 g de cloruro de potasio (KCl ).

2 g de fosfato de potasio monobásico ( KH PO ).

14.4 g de fosfato de sodio dibásico ( Na HPO . 2 H O )

Disolver en 800 ml de agua destilada o bidestilada.

### **SOLUCION B .**

Pesar 0.5 g de cloruro de calcio ( CaCl ).

Disolver en 500 ml de agua bidestilada.

### **SOLUCION C .**

Pesar 0.5 de cloruro de magnesio ( MgCl ).

Disolver en 500 ml de agua bidestilada.

**PREPARACION :** Esterilizar por separado , durante 10 min. y dejar enfriar.

Para obtener un litro mezcle las siguientes soluciones :

80 ml de sol. A

100 ml de sol. B

100 ml de sol. C

720 ml de agua bidestilada.

**CALDO LACTOSADO.**

( Thatcher y Clarck, 1973)

**COMPOSICION :**

Peptona de caseína 5.0 g/l

Extracto de carne 3.0 g/l

Lactosa 5.0 g/l

Agua destilada 1000 mL.

**PREPARACION :** Disolver 13 g/l o mas, distribuir 10 mL en tubos de ensayo provistos de campanitas de Durham y esterilizar en autoclave.

**EMPLEO :** Mezclese muestras de 1 ml, 10 ml o 100 ml en las cantidades determinadas de caldo-lactosa. Incubación : de 24 hasta 48 Hrs. a 35° C.

**CALDO *Escherichia Coli* (EC) .**

(Merck, E. 1982; Thatcher y Clarck, 1973)

**COMPOSICION.**

Peptona de Caseína 20.0 g/l

Lactosa 5.0 g/l

Mezcla de sales biliares 1.5 g/l

Cloruro de sodio 5.0 g/l

Dipotasio Hidrogenofosfato 4.0 g/l

Potasio dihidrogenofosfato 1.5 g/l

Agua destilada 1000 mL.

**PREPARACION :** Disolver 37 g/l, o bien , 74 g /l, distribuir 10 mL. en tubos provistos de campanas de Durham , y esterilizar en autoclave.

**EMPLEO :** El material sometido a investigación se incorpora directamente al caldo de concentración sencilla si la cantidad a sembrar es pequeña (aproximadamente 1 ml ) o al caldo de concentración doble si las cantidades a sembrar son mayores , con el fin de que la concentración final del caldo sea la normal. Incubación : 48 Hrs. a 37° C y/o a 44° C.

## **CALDO AZIDA-GLUCOSA**

(Merck, E. 1982)

### **COMPOSICION .**

**Peptona de caseína 15.0 g/l**

**Extracto de carne 4.8 g/l**

**Glucosa 7.5 g/l**

**Cloruro de sodio 7.5 g/l**

**Azida de sodio 0.2 g/l**

**Agua destilada 1000 mL.**

**Para ensayo previo orientativo de enterococos y para enriquecimiento selectivo de los mismos.**

**PREPARACION :** disolver 35 o 70 gr, por litro distribuir y esterilizar, no recalentar.

**EMPLEO :** La producción de enturbamiento durante la incubación a 37° C por 24 o 48 hrs., permite sospechar la presencia de enterococos, en este caso se resiembró en caldo purpura de bromocresol-azida, si no se presenta turbidez alguna puede desecharse con seguridad la presencia de enterococos.

## **CALDO PURPURA DE BROMOCRESOL AZIDA .**

(Merck, E. 1982)

### **COMPOSICION.**

**Peptona de caseína 10.0 g/l**

**Extracto de levadura 10.0 g/l**

**Dextrosa 5.0 g/l**

**NaCl 5.0 g/l**

**Fosfato de Potasio monobásico 2.7 g/l**

**Fosfato de Potasio dibásico 2.7 g/l**

**Azida de sodio 0.5 g/l**

**Purpura de bromocresol 0.032 g/l**

**Agua destilada 1000 mL.**

**Para confirmar presencia de enterococos, la utilización ha sido prevista , sobre todo en conexión con ensayo previo de caldo azida-glucosa.**

**PREPARACION : Disolver 13 g/l , repartir en tubos y esterilizar 15 min. a 115° C.**

**EMPLEO : La azida de sodio inhibe a la generalidad de la flora acompañante que hubiera podido desarrollarse en ensayos previos, los enterococos fermentan la glucosa que contiene este medio, produciendo ácido, lo que se hace patente por el viraje a amarillo que sufre el purpura de bromocresol que actúa como indicador de pH. Incubación : 48 Hrs. a 37° C.**