

00344



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

10

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“REDUCCIÓN DE LA PRESENCIA DE *Vibrio cholerae* POR BACTERIVORÍA DE PROTOZOO-PLANCTON EN EL MEDIO ACUÁTICO”.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
M A E S T R A E N C I E N C I A S  
(BIOLOGÍA DE SISTEMAS Y RECURSOS ACUÁTICOS)

P R E S E N T A :  
BIOL. MARÍA ELENA MARTÍNEZ PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA

MÉXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

El presente trabajo se desarrollo en los laboratorios de Bacteriología y Ecología Acuática del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, U.N.A.M. Formando parte del proyecto titulado "Posición de *Vibrio cholerae* en un circuito microbiano: Datos ambientales versus un estudio experimental. Apoyado por DGAPA, clave IN216796l.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## AGRADECIMIENTOS

Al comité revisor por sus comentarios y sugerencias:

Dra. Patricia Bonilla Lemus  
Dra. Ma. del Rosario Sánchez Rodríguez  
Dra. Lydia Mota de la Garza  
Dr. Alfonso Lugo Vázquez  
Dr. Miroslav Macek  
Dr. Pedro Ramírez García  
M. en C. Carlos Eslava Campos

Con mi especial agradecimiento al Dr. Miroslav Macek por haberme mostrado cada una de las técnicas utilizadas en el trabajo, por su asesoría en el manejo de los datos y por su ayuda invaluable en la ejecución total del trabajo por escrito.

Agradezco al Dr. Alfonso Lugo Vázquez y al M. en C. Angel Duran Díaz por la realización del análisis estadístico.

## DEDICATORIA

Con todo cariño a mis padres Luis y Ma. del Carmen por el amor y apoyo incondicional que siempre me han brindado

GRACIAS

TEJIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
Lista de abreviaturas	í
Índice de Figuras	ii
Índice de Tablas	iv
<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>ANTECEDENTES</b>	3
<b>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS</b>	13
<b>OBJETIVOS</b>	14
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	15
A. Experimentos de campo	15
Área de estudio	15
B. Experimentos de laboratorio	25
Microcosmos	25
<b>RESULTADOS</b>	33
Mediciones de campo	33
Microcosmos	48
<b>DISCUSIÓN</b>	65
Limnología de La Laguna de Mecoacán	65
Actividad depredadora: tasas de eliminación de bacterias	67
Bacterioplancton	71
Microcosmos	73
Actividad depredadora de <i>Cyclidium glaucoma</i>	73
Desarrollo de <i>V. cholerae</i> O1 en microcosmos	76
<b>CONCLUSIONES</b>	79
<b>Literatura citada</b>	81

## Lista de abreviaturas

i

<b>DAPI</b>	(4',6-diamidino-2 fenilindol) Sigma Chemical Co, USA
<b>DTAF</b>	(5-(4 ,6-dichlorotriazin-2-yl-aminofluorescein).
<b>FLB</b>	Fluorescently Labelled Bacteria (Bacterias marcadas con fluorescencia)
<b>GRASING (G)</b>	Tasa de Alimentación poblacional $\text{cel ml}^{-1} \text{d}^{-1}$
<b>IFA</b>	Inmunofluorescence antibody, anticuerpos inmunofluorescentes
<b>NFH</b>	nanoflagelados heterotrófos
<b>TCBS</b>	Agar Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-Sacarosa
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>UPTAKE (U)</b>	Tasa de alimentación por un individuo $\text{cel cel}^{-1} \text{h}^{-1}$
<b>XLD</b>	Agar Xilosa-Lisina- Desoxicolato.

	página
<b>Figura 1.</b> Circuito microbiano dentro de la red trófica del plancton (de acuerdo con Vrba et al. 1996).	5
<b>Figura 2.</b> <i>Vibrio cholerae</i> en circuito microbiano dentro de la red trófica del plancton (modificado de Macek et al. 1997).	5
<b>Figura 3.</b> Localización de las estaciones en la Laguna de Mecoacán.	18
<b>Figura 4.</b> Esquema general del trabajo de campo en la Laguna de Mecoacán.	19
<b>Figura 5.</b> Esquema general de los trabajos realizados para obtener la estimación de la tasa de eliminación de <i>V. cholerae</i> O1.	20
<b>Figura 6.</b> <b>a. Izquierda:</b> Colonias de <i>Vibrio cholerae</i> sobre agar TCBS. <b>Derecha:</b> <i>Vibrio cholerae</i> O1. Inmunofluorescencia (IFA), inmersión, 100×.	
<b>b. Izquierda.</b> Bacterias teñidas con DAPI (azul) y <i>Vibrio cholerae</i> FLB (DTAF; verde-amarillo). Filtros para la fluorescencia de DAPI y DTAF (combinado), inmersión 100 ×. <b>Derecha:</b> Cadena de <i>Vibrio cholerae</i> dividido pero no separado bajo condiciones adversas en el microcosmos. Tinción DAPI y DTAF (FLB). Epifluorescencia, inmersión, 100 ×.	22a
<b>Figura 7.</b> Esquema general de los experimentos realizados en laboratorio con el uso de microcosmos.	26
<b>Figura 8.</b> <b>Arriba:</b> <i>Cyclidium glaucoma</i> . Epifluorescencia (DAPI), inmersión, 100 ×, <b>Abajo:</b> <i>C. glaucoma</i> con bacterias teñidas (FLB) preparadas de <i>V. cholerae</i> (izquierda) y <i>Salmonella typhimurium</i> (derecha) ingeridas. Filtros para la fluorescencia de DAPI y DTAF (combinado), inmersión 100 ×.	29
<b>Figura 9.</b> Dimensiones de una bacteria y cálculo de su volumen.	31
<b>Figura 10.</b> Parámetros físico-químicos en la Laguna de Mecoacán, Tabasco: <b>a.</b> Enero, <b>b.</b> Abril, <b>c.</b> Junio, <b>d.</b> Agosto.	35
<b>Figura 11.</b> Bacterias totales (BT), <i>Vibrio cholerae</i> O1 (IFA) y eliminación diaria de bacterias totales y de <i>V. cholerae</i> en la Laguna de Mecoacán.	41
<b>Figura 12.</b> Distribución de aislamientos del género <i>Vibrio</i> en la Laguna de Mecoacán.	42
<b>Figura 13.</b> Bacterias totales (BT) y eliminación diaria de bacterias totales en el Lago de Alchichica, Puebla.	46
<b>Figura 14. Ensayo 1:</b> Con <i>C. glaucoma</i> con y sin quitina; <b>a.</b> Bacterias totales (BT) y de <i>C. glaucoma</i> <b>b.</b> Tasa de alimentación individual (U) y poblacional (G) de <i>C. glaucoma</i>	49
<b>Figura 15. Ensayo 1:</b> Bacterias totales (BT, cel ml <sup>-1</sup> ).	50



<b>Figura 16. Ensayo 2</b> Con ciliados en presencia y ausencia de quitina a. Bacterias totales y <i>C. glaucoma</i> (cel ml <sup>-1</sup> ) b. Tasa de alimentación individual (U) y poblacional (G) de <i>C. glaucoma</i>	51
<b>Figura 17. Ensayo 2:</b> a. Bacterias totales (BT, cel ml <sup>-1</sup> ), b. <i>V. cholerae</i> O1 (IFA, cel ml <sup>-1</sup> ); c. <i>V. cholerae</i> cultivable (TCBS, UFC ml <sup>-1</sup> )	53
<b>Figura 18. Ensayo 3:</b> a. Con <i>V. cholerae</i> : Bacterias totales (BT, cel ml <sup>-1</sup> ), <i>V. cholerae</i> O1 (IFA, cel ml <sup>-1</sup> ), <i>V. cholerae</i> cultivable (TCBS, UFC ml <sup>-1</sup> ), flagelados (cel ml <sup>-1</sup> ) y <i>C. glaucoma</i> (cel ml <sup>-1</sup> ); b. Con <i>S. typhimurium</i> . Bacterias totales (BT, cel ml <sup>-1</sup> ), <i>S. typhimurium</i> cultivable (XLD, UFC ml <sup>-1</sup> ), flagelados (cel ml <sup>-1</sup> ) y <i>C. glaucoma</i> (cel ml <sup>-1</sup> ).	55
<b>Figura 19. Ensayo 4:</b> Con ciliados en el agua filtrada por 0.2 µm y por 1.2 µm a. Bacterias totales (BT, cel ml <sup>-1</sup> ) y <i>C. glaucoma</i> (cel ml <sup>-1</sup> ) b. Tasa de alimentación individual (U) y poblacional (G) de <i>C. glaucoma</i>	57
<b>Figura 20. Ensayo 4:</b> a. Bacterias totales (BT, cel ml <sup>-1</sup> ); b. <i>V. cholerae</i> O1 (IFA, cel ml <sup>-1</sup> ), c. <i>V. cholerae</i> cultivable (TCBS, UFC ml <sup>-1</sup> )	58
<b>Figura 21. Ensayo 4:</b> Con ciliados en el agua filtrada: a. Por 0.2 µm y b. por 1.2 µm. Bacterias totales (BT, cel ml <sup>-1</sup> ), <i>V. cholerae</i> O1 (IFA, cel ml <sup>-1</sup> ), cultivable (TCBS, UFC ml <sup>-1</sup> ), flagelados y <i>C. glaucoma</i> (cel ml <sup>-1</sup> ).	59
<b>Figura 22. Ensayo 5:</b> Con ciliados, con y sin quitina a. Bacterias totales y <i>C. glaucoma</i> (cel ml <sup>-1</sup> ) b. Tasa de alimentación individual (U) y poblacional (G) de <i>C. glaucoma</i>	61
<b>Figura 23. Ensayo 5:</b> a. Bacterias totales (BT, cel ml <sup>-1</sup> ), b. <i>V. cholerae</i> O1 (IFA, cel ml <sup>-1</sup> ); c. <i>V. cholerae</i> cultivable (TCBS, UFC ml <sup>-1</sup> ).	62
<b>Figura 24. Ensayo 5:</b> Con ciliados a. con quitina y b. sin quitina Bacterias totales (BT), <i>V. cholerae</i> O1 (IFA), cultivable (TCBS, UFC ml <sup>-1</sup> ), flagelados y <i>C. glaucoma</i> (cel ml <sup>-1</sup> ).	63
<b>Figura 25.</b> Distribución de volumen bacteriano (diámetro equivalente esférico, ESD, µm) en diferentes microcosmos y de <i>V. cholerae</i> teñido (FLB)	64
<b>Figura 26.</b> Análisis de conglomerados de las estaciones en la Laguna de Mecoacán, basado en los parámetros fisicoquímicos.	66
<b>Figura 27.</b> Tasas de eliminación vs. a. Bacterias totales (BT) y vs b <i>V. cholerae</i> O1 (IFA) en la Laguna de Mecoacán	70
<b>Figura 28.</b> Tasa de crecimiento específica de <i>C. glaucoma</i> (d <sup>-1</sup> ) vs. a. Bacterias totales (BT, cel ml <sup>-1</sup> ) y b. <i>V. cholerae</i> cultivable (CFU ml <sup>-1</sup> ).	74

**Tablas:**

ív

	página
<b>Tabla 1</b> Lago de Alchichica: profundidades seleccionadas en cada muestreo	21
<b>Tabla 2</b> Material y equipo utilizado para el conteo microbiológico y tasas de alimentación, tanto de muestras ambientales como de microcosmos en laboratorio.	23
<b>Tabla 3</b> Características de los microcosmos.	27
<b>Tabla 4</b> Parámetros fisicoquímicos medidos <i>in situ</i> en la Laguna de Mecoacán.	34
<b>Tabla 5</b> Tasa de eliminación y parámetros microbiológicos en la Laguna de Mecoacán	40
<b>Tabla 6</b> Tasa de eliminación y parámetros microbiológicos en el Lago de Alchichica	45
<b>Tabla 7</b> Comparación de datos obtenidos en la Laguna de Mecoacán en el presente trabajo y los reportados por Cortes <i>et al.</i> (2000).	65
<b>Tabla 8</b> Análisis de varianza de una vía. Experimentos de campo, análisis entre estaciones y entre muestreos.	68
<b>Tabla 9</b> Matriz de correlación de los parámetros microbiológicos, tasas de eliminación y fisicoquímicos, medidos en la Laguna de Mecoacán	69
<b>Tabla 10</b> Análisis de varianza de la tasa de crecimiento del día 2, de bacterias totales (DAPI), <i>V. cholerae</i> cultivable (TCBS) <i>V. cholerae</i> O1 (IFA) en los diferentes microcosmos.	78

## RESUMEN

Se estimó *in situ* la posible eliminación de la bacteria patógena *Vibrio cholerae* O1 del ambiente acuático salobre (Laguna de Mecocacán, Tabasco y Lago de Alchichica, Puebla). Los datos se compararon con los obtenidos en laboratorio en microcosmos preparados con agua de la Laguna

Los parámetros microbiológicos y físico-químicos se analizaron tanto en la época de lluvias como de estiaje, de enero de 1997 a agosto del mismo año, con un total de 4 muestreos, en cinco estaciones seleccionadas de la Laguna de Mecocacán; el lago atalasoalino Alchichica (aparentemente sin *V. cholerae* O1 autóctono) se muestreó como lugar de referencia. Para estimar la tasa de eliminación de *V. cholerae* O1 se empleó el método de eliminación de bacterias marcadas con fluorescencia (FLB). El número de bacterias totales teñidas con DAPI y de *V. cholerae* O1 teñidos con inmunofluorescencia, fueron cuantificadas con el microscopio de epifluorescencia.

Tanto en la Laguna de Mecocacán como en el Lago de Alchichica, la tasa de la posible eliminación de *V. cholerae* O1 fue de  $10^{-1} \text{ d}^{-1}$ , las bacterias totales se encontraron en ambos cuerpos de agua en concentraciones de  $10^6$  a  $10^7 \text{ cel ml}^{-1}$ . En la Laguna de Mecocacán los números de *V. cholerae* O1 fueron de  $10^1$  a  $10^2 \text{ cel ml}^{-1}$ . El método de inmunofluorescencia, fue el único medio por el cual se pudo comprobar la presencia y cuantificar *V. cholerae* O1 en la Laguna durante todo el periodo de estudio, el método de filtro de membrana sobre medio de cultivo TCBS y el uso de hisopos de Moore, no mostraron su presencia.

En laboratorio con el uso de microcosmos, se estudiaron las interacciones entre *V. cholerae* O1 y el ciliado bacterívoro: *Cyclidium glaucoma* (aislado del Lago de Alchichica) así como el comportamiento de esta bacteria en microcosmos en presencia / ausencia de otras bacterias y protozoos de la Laguna y en presencia / ausencia de quitina. Se utilizó *V. cholerae* O1 como fuente principal de materia orgánica en concentraciones iniciales de  $10^6$  a  $10^7 \text{ cel ml}^{-1}$ . Aunque los ciliados no fueron capaces de crecer con *V. cholerae* O1 como única fuente de alimento, su eliminación de bacterias (estimada por el método directo de FLB) fue importante (una alimentación por ciliado hasta  $10^3 \text{ cel cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y poblacional de  $10^6 \text{ cel ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Por otro lado, la posible competencia con otras bacterias fue el mecanismo más probable de eliminación de *V. cholerae*. La eliminación de *V. cholerae* O1 fue evaluada utilizando el conteo de unidades formadoras de colonias en agar TCBS mientras el método de inmunofluorescencia no resultó lo suficientemente adecuado para el conteo de *V. cholerae* total en los cultivos en laboratorio. La mayor supervivencia de *V. cholerae* se observó en microcosmos con el agua previamente esterilizada por filtración con quitina, mientras que la menor se observó en microcosmos con el agua sin tratamiento (con bacterias y protozoos de la Laguna), con quitina y con *C. glaucoma*. La adición de quitina a los microcosmos permitió el mejor crecimiento de bacterias diferentes a *V. cholerae* O1 aparentemente quitinolíticas.

La tasa de eliminación de *V. cholerae* O1 tanto en el ambiente natural como en los microcosmos fue alta aunque la actividad depredadora de los protozoos explica solo una parte de su eliminación. El factor que más influyó en la supervivencia de *V. cholerae* O1 en el ambiente acuático, fue la aparentemente competencia con otras bacterias.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## SUMMARY

Possible *in situ* elimination of pathogenic bacteria *Vibrio cholerae* O1 from the brackish aquatic environment (Mecoacán Lagoon, Tabasco and Alchichica Lake, Puebla) was estimated. The *in situ* measured data were compared with those obtained in the microcosms prepared from the Lagoon water.

Four times, during both rainy and dry season (January to August, 1997), microbiological and physical-chemical parameters were analysed in five selected points in the estuarine Mecoacán Lagoon, athalassohaline Alchichica Lake (seemingly without autochthonous *V. cholerae* O1) was sampled as referential one. Disappearance of fluorescently labelled bacteria (FLB), prepared from *V. cholerae* O1 was evaluated. Total number of bacteria and that of *V. cholerae* were evaluated using an epifluorescence microscopy in the preparations stained with DAPI and via indirect immunofluorescence, respectively.

The possible elimination rate of *V. cholerae* O1 in both Mecoacán Lagoon and Alchichica Lake, was found in an order of magnitude of  $10^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Total bacterial numbers in both water bodies were found between  $10^6$  and  $10^7 \text{ cells ml}^{-1}$  meanwhile *V. cholerae* O1 numbers (in Mecoacán Lagoon) between  $10^1$  and  $10^2 \text{ cells ml}^{-1}$ . During the whole study, the immunofluorescence method was the only possibility to verify and quantify the presence of *V. cholerae* O1 in the Lagoon. Filter method on TCBS agar and Moore's swabs did not show its presence.

In microcosms, *V. cholerae* behaviour and its interaction with a bacterivorous ciliate, *Cyclidium glaucoma* (isolated from Alchichica Lake) were studied in different treatments prepared from the Lagoon water, with/without natural bacteria assemblage in the presence/absence of chitin. An addition of harvested *V. cholerae* O1 in the numbers of  $10^6$  to  $10^7 \text{ cells ml}^{-1}$  was the major organic matter source. Although the ciliates were not able to grow upon *V. cholerae* O1 as the sole source of feed, its direct elimination was important (uptake to  $10^6 \text{ cells cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and grazing rate of  $10^6 \text{ cell ml}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). On the other hand, possible competition with other bacteria seemed to be the most probable mechanism of *V. cholerae* elimination. The *V. cholerae* O1 elimination was quantified based on colony forming units on a TCBS agar because the immunofluorescence method did not result appropriate in the microcosms. Maximum persistence of *V. cholerae* O1 was observed in the microcosms with filter-sterilised water and with chitin meanwhile the minimum one was observed in the microcosms without treatment, with chitin and with *C. glaucoma*. The chitin addition caused the apparent development of other bacteria than *V. cholerae* O1, seemingly chitinolytic, in the microcosms.

The elimination rate of *V. cholerae* O1 both in the natural environment and in the microcosms was observed to be important even though the ciliate feeding activity could explain only a part of the observed elimination. As the main factor that could affect the survival of *V. cholerae* O1 in the aquatic environment, apparent competition with other bacteria was found.

## ANTECEDENTES

La relación que existe entre microorganismos fagótrofos (como protozoos) y el bacterioplancton se ha venido estudiando ampliamente desde la introducción de la hipótesis de la existencia de un circuito microbiano (*microbial loop*) dentro de la cadena trófica del plancton, citada por Azam *et al.* (1983) derivada de la idea original de Pomeroy (1980). Los protozoos del nanoplancton de 2-20  $\mu\text{m}$  en tamaño (Porter *et al.* 1985) aparentemente son los mayores consumidores del bacterioplancton tanto en el mar (Sherr *et al.* 1986; Sherr & Sherr 1987) como en el ambiente dulceacuícola (Šimek *et al.* 1990a, b, 1995). El mecanismo de depredación de los protozoos sobre las bacterias patógenas es importante como un mecanismo biológico de eliminación de las bacterias en un medio natural.

### Circuito microbiano

Hasta principios de los años setentas se tenía la idea de que cada ecosistema es un sistema dinámico que contenía productores y consumidores con relaciones definidas, determinado por el flujo de energía en un sentido vertical y regeneración de nutrientes (mineralización) en el otro, el cual se iniciaba con la luz solar e importaba energía a niveles tróficos superiores (Fenchel 1987) y se reciclaba por descomponedores (arqueas, bacterias y hongos). Sin embargo, con la introducción del concepto de "*microbial loop*" o circuito microbiano (Pomeroy 1980; Azam *et al.* 1983), se aceptó que el carbono orgánico no solo es transportado en un único sentido hacia niveles tróficos superiores sino que también circula dentro de este circuito (Figura 1), en este circuito las bacterias son capaces de usar un alto porcentaje de exudados del fitoplancton y de reciclar materia particulada o disuelta producida por otros microorganismos (Tamminen *et al.* 1984). Por otro lado la mayor parte de la materia orgánica derivada de los productores primarios no puede ser utilizada directamente por los heterótrofos saprótrofos. Los microorganismos holozóicos pueden ingerir la materia orgánica particulada de las células, tanto de bacterias y de productores primarios como cianobacterias y algas (Fenchel 1987, Šimek *et al.* 1990a), como de productores secundarios (protozoos, etc.). Sin embargo, la producción bacteriana puede no entrar a la cadena principal por perderse por varios mecanismos, como muerte celular, lisis viral y sedimentación; parte de la materia orgánica particulada, materia fecal de copépodos, exuvias de crustáceos y materia de otros organismos muertos se depositan en el fondo (Weinbauer & Suttle 1999), o bien puede ser

utilizada mediante la depredación por protozoos (Sherr *et al.* 1986, 1987; Šimek *et al.* 1990a, b).

*V. cholerae*, puede formar parte de los procesos del circuito microbiano dentro de la cadena trófica del plancton (Figura 2) como una bacteria autóctona de las comunidades bacterianas costeras, capaz de crecer en aguas no contaminadas (revisión en Colwell 1984; Colwell *et al.* 1985). La habilidad para utilizar sustratos como fuente de carbono como la quitina permite a *V. cholerae* y a otros vibriones crecer o sobrevivir aun si el ambiente es adverso (Guthrie & Cofie 1991; Macek *et al.* 1996). Las sustancias poliméricas, particularmente los polisacáridos (almidón, celulosa y quitina) pueden ser utilizadas mediante una hidrólisis por ectoenzimas microbianas como  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucosidasa y de la  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa (Hoppe 1983, Vrba *et al.* 1992). *V. cholerae* se encuentra en el ambiente colonizando caparazones quitinosos de crustáceos entre otros (Kaneko & Colwell 1975; Huq *et al.* 1983, 1984; Tamplin *et al.* 1990) Los rotíferos filtradores pueden también ser colonizados por vibriones (Muroga & Yasunobu 1987; Tamplin *et al.* 1990; Huq *et al.* 1990) Los vibriones pueden crecer en el tracto digestivo de copépodos (Sochard *et al.* 1979; Huq *et al.* 1984, Tamplin *et al.* 1990) y con los paquetes fecales de copépodos y exuvias se pueden sedimentar en el fondo donde entran a la red alimentaria del bentos. Durante el ciclo anual de los cuerpos de agua estratificados, incluyendo los estuarios, los crustáceos (copépodos) se mueven entre el fondo y la zona epilimnética y pueden distribuir los vibriones en la columna de agua (Kaneko & Colwell 1975).

La relación de *V. cholerae* con algas y cianobacterias del fitoplancton no se ha especificado, pero se ha observado la colonización de algunas especies por ejemplo *Anabaena variabilis*, *Phacus* sp. etc. (Huq *et al.* 1990 ; Tamplin *et al.* 1990; Islam *et al.* 1990, 1994).

### **Ubicación de protozoos en el circuito**

La alimentación del zooplancton es un importante proceso en la ecología de las comunidades acuáticas, al remover partes de la producción primaria (cianobacterias y algas) de bacterias y reciclando nutrientes para el crecimiento del fitoplancton (Margalef 1983) Por otra parte, los ecólogos no pensaron en la importancia del papel del llamado “picoplancton” (0.2 a 2  $\mu$ m; Porter *et al.* 1985). Hasta los años 80, se consideraba imposible el crecimiento de los protozoos dependiente de la bacterivoría en el ambiente pelágico y oligotrófico (Fenchel

Figura 1. Posición de los microorganismos en el circuito microbiano dentro de la red trófica del plancton (de acuerdo con Vrba *et al.* 1996)

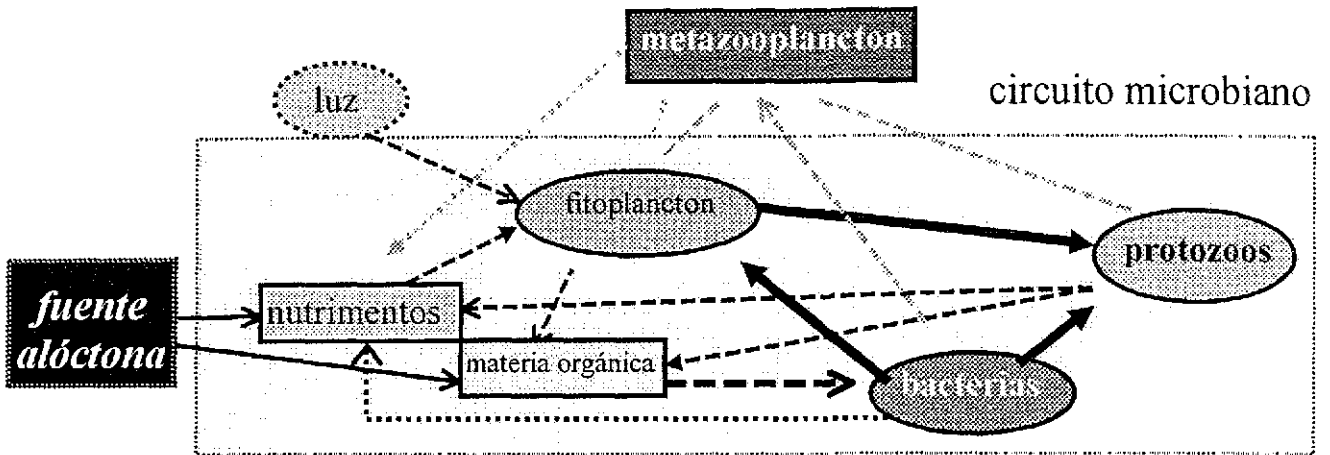
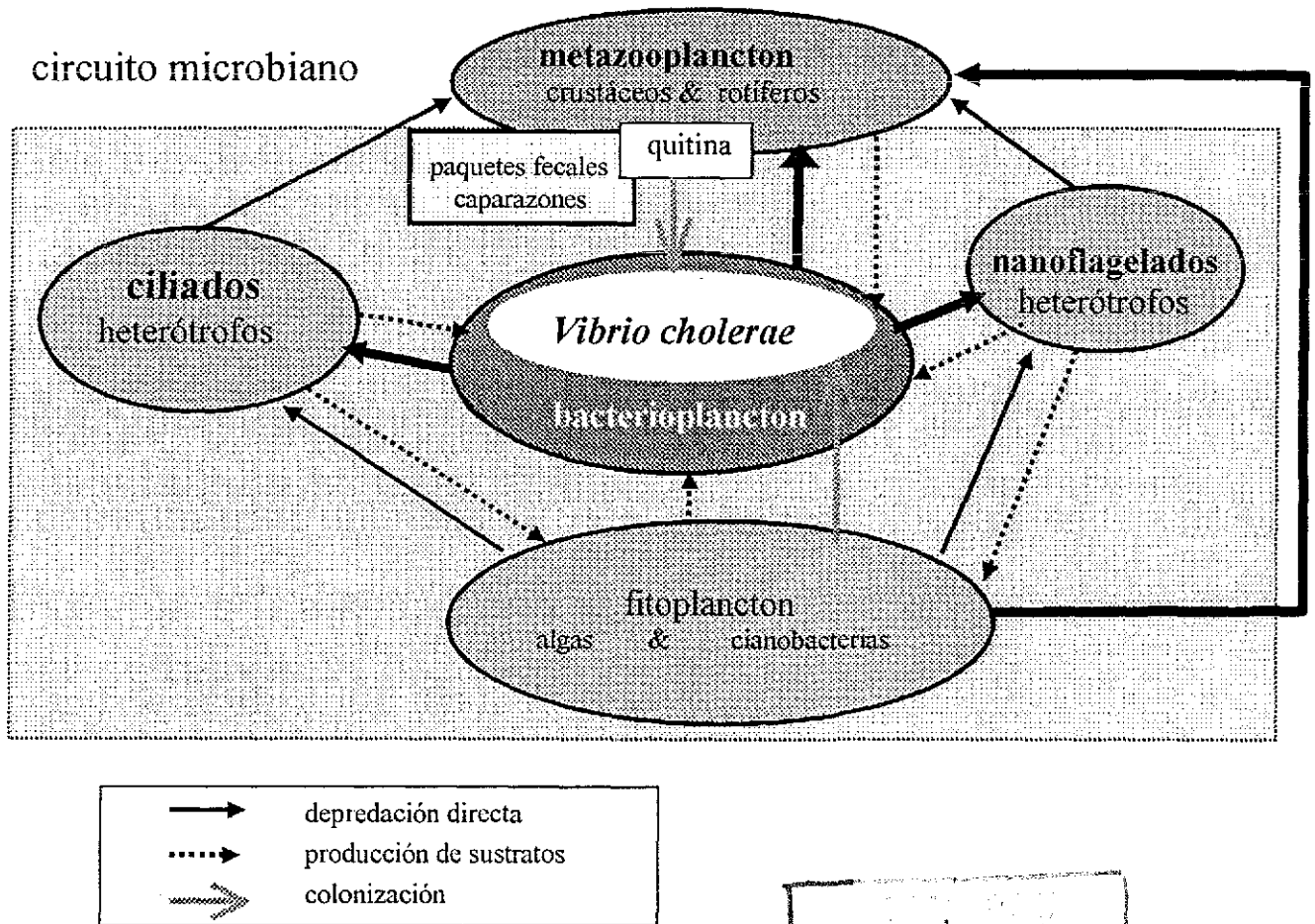


Figura 2. *Vibrio cholerae* en circuito microbiano dentro de la red trófica del plancton (modificado de Macek *et al.* 1997)



FALTA LE CREAR

1986, 1987) Por otro lado, se demostró la importancia de los ciliados en el circuito microbiano marino (Sherr *et al.* 1986) y posteriormente en ambientes dulceacuícolas de un moderado estado trófico (Müller 1989, Šimek *et al.* 1990a; Müller *et al.* 1991) Muchos autores han de mencionado que los protozoos muestran una alimentación efectiva, solo cuando pueden explorar espacios con alimento abundante o en estratos donde se concentra este alimento en la columna de agua, tales como la termoclina u oxiclina (Fenchel 1987; Fenchel *et al.* 1990). La capacidad de los ciliados para explorar estos espacios se ha considerado como el único mecanismo de su persistencia en tales ambientes (Fenchel 1980, 1986, 1987). En los 90's, usando bacterias marcadas fluorescentemente (FLB) fue propuesto y posteriormente confirmado el crecimiento de ciliados en concentraciones de picoplancton ( $< 2 \mu\text{m}$ ) de  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  cels  $\text{ml}^{-1}$  en ambientes dulceacuícolas (Sherr & Sherr 1987; Šimek *et al.* 1996).

Recientemente se ha considerado al nanozooplancton (2 a 20  $\mu\text{m}$ ) y microzooplancton (20 a 200  $\mu\text{m}$ ) (Porter *et al.* 1985) que incluye a los nanoflagelados heterotrófos (NFH), ciliados y rotíferos entre otros, como los componentes más importantes de la red alimentaria planctónica a través de su actividad de bacterivoría (Sherr & Sherr 1987; Beaver & Crisman 1989; Šimek *et al.* 1990a, 1996, González *et al.* 1992; Iriberrí *et al.* 1994). Los protozoos fagotróficos intervienen tanto en el reciclamiento de nutrientes dentro del circuito microbiano (Figura 1) como en el proceso de transferencia de carbono orgánico desde el nivel bacteriano, sirviendo a su vez, como presas para organismos de niveles tróficos más altos constituyendo un eslabón en la cadena alimenticia acuática (Jack & Gilbert 1997). Entre los bacterívoros más importantes en el ambiente marino se encuentran los flagelados (Fenchel 1987), mientras que en el ambiente dulceacuícola se encuentran los ciliados (Šimek *et al.* 1990a, b; 1995)

Los protozoos, cuyo papel ecológico se ha descrito ampliamente, se encuentran en diversos hábitats naturales y son frecuentemente cosmopolitas (revisión en Beaver & Crisman 1989; Foissner *et al.* 1999). Su distribución depende de que las características físicas y químicas del medio se mantengan dentro de los límites tolerables. Entre los factores de mayor importancia se tienen la temperatura, oxígeno, pH, y salinidad. Dentro de los protozoos, existen especies que habitan preferentemente ambientes salinos o bien de agua dulce, sin embargo, existen formas que se encuentran en ambos tipos de agua, hay formas que se pueden transferir directamente de agua dulce a marina como es el caso de *Cyclidium glaucoma*, entre otros protozoos (Sleigh 1979). Otro factor de importancia, es la disponibilidad de nutrimentos



esenciales o necesidades nutritivas generales de los protozoos. La mayoría de los protozoos que se alimentan de diversas bacterias, tienen una dieta variada aunque se ha visto que algunos prefieren ciertas bacterias o bien crecen mejor con diferentes especies de bacterias; algunas bacterias son tóxicas para diferentes protozoos (Curds & Vandyke 1966; Fenchel 1980, 1986; Sanders 1988; Gurijala & Alexander 1990; Macek *et al.* 1993, Šimek *et al.* 1994).

### **Alimentación de protozoos**

La alimentación de los protozoos puede llevarse a cabo por: a) saprotrofia; en donde los nutrimentos necesarios pueden ser obtenidos a través de la materia orgánica disuelta en forma de moléculas o complejos, pasando a través de la membrana celular, b) alimentación holozóica; ingestión directa de partículas, las especies poseen mecanismos especializados para la búsqueda, captura e ingestión de un determinado tipo de materia nutritiva o por medio de diversos sistemas de “pesca” que tiene como resultado la colecta de una mezcla de partículas de entre las cuales pueden seleccionar las de su preferencia. Los métodos de captura pueden ser por filtración (tamización) activa, por una corriente de agua producida por los cilios o flagelos que es un posible mecanismo de concentración y selección de partículas (Sleigh 1979; Fenchel 1986). El consumo de bacterias que realizan los ciliados se lleva a cabo generalmente por este último tipo de alimentación y constituye la forma principal de alimentación de los organismos de vida libre

Como resultado del reciente interés en las redes alimenticias microbianas en ecosistemas acuáticos, se han usado una gran variedad de técnicas para estimar *in situ*, la alimentación holozóica de protozoos. Se han investigado las tasas de alimentación de organismos bacterívoros en una amplia variedad de ambientes planctónicos y bajo diferentes condiciones (Fenchel 1986; Lee & Soldo 1992; Marrasé *et al.* 1992; Sherr & Sherr 1993). Para estimar las tasas de alimentación se puede evaluar la disminución en la concentración de la presa análoga (Salat & Marrasé *et al.* 1994; Straškrabová *et al.* 1999), o bien, cuantificar el número de partículas análogas marcadas con fluorescencia dentro de los bacterívoros. En este último método, se han utilizado una gran variedad de partículas alimenticias, naturales o artificiales (revisión en Fenchel 1980, 1986), partículas fluorescentes (Børsheim 1984; Šimek *et al.* 1990a). Posteriormente se han utilizado organismos teñidos con fluorescencia como bacterias, picocianobacterias y algas (Sherr *et al.* 1987; Lee, & Soldo 1992; Sherr & Sherr 1993; Balczon & Pratt 1995). Entre los fluorocromos más usados en la tinción de estos

microorganismos se encuentra DTAF (5-(4, 6-dichlorotriazin-2-yl-aminofluorescein, Sherr *et al.* 1987)

Algunos investigadores han mostrado que los ciliados sólo seleccionan partículas alimenticias por sus características físicas como tamaño, forma y superficie (Fenchel 1980, 1986, Sanders 1988; Macek *et al.* 1993; Šimek *et al.* 1994). La capacidad de selección está sujeta a debate. Recientes estudios han sugerido que, particularmente los flagelados, pueden discriminar mejor el tipo de alimento (Balczon & Pratt 1995). Los ciliados se consideran como consumidores de bacterias dispersas, agregadas y que se encuentran colonizando partículas (Albright *et al.* 1987).

### ***Vibrio cholerae* en el circuito microbiano**

El estudio de la ecología de *V. cholerae* ha producido controversias entre los investigadores clínicos, los epidemiólogos y los ecólogos microbianos. En los años anteriores a los setentas se pensaba que la supervivencia de esta bacteria estaba asociada a su adaptabilidad a una variedad de hospederos que le permitían su sobrevivencia extraintestinal por cortos periodos. Durante los últimos veinte años se ha mostrado que *V. cholerae* es común en aguas marinas costeras y salobres. Sin embargo, son pocos los estudios sobre los mecanismos que favorecen la existencia de *V. cholerae* y el papel del plancton en su eliminación o crecimiento en el ambiente natural. Una forma de llevar a cabo dichos estudios es mediante el uso de microcosmos en laboratorio con cultivos puros.

A finales de los setentas y principios de los ochentas se pensaba que *V. cholerae* era incapaz de sobrevivir por largo tiempo extraintestinalmente. Sin embargo, se ha demostrado que a diferencia de algunos otros patógenos humanos, *V. cholerae* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en ambientes extraintestinales del ser humano, especialmente en aguas marinas y salobres (Singleton *et al.* 1982, Brayton *et al.* 1987, Colwell & Spira 1992). Esta característica es un factor importante en su epidemiología y de relevancia para las regiones donde el organismo es endémico (Huq *et al.* 1990). Información reciente indica que *V. cholerae* (incluyendo O1) es una especie estuarina con un ciclo de vida libre adaptado a condiciones fisicoquímicas y biológicas de este ambiente, así como la posibilidad de adaptación en el tracto intestinal humano y de organismos poiquilotérmicos (Harris *et al.* 1993); de crustáceos (Sochard *et al.* 1979, Huq *et al.* 1983, 1984), rotíferos (Muroga & Yasunobu 1987), bivalvos

(Hood *et al.* 1983a) y peces (Sanchez 1991) Así salen a la luz nuevas explicaciones en la epidemiología del cólera, *V. cholerae* no es una bacteria fecal típica y en presencia de otras bacterias desaparece rápidamente y no puede sobrevivir por largos periodos de tiempo en agua residual (Oragu *et al.* 1993; Sato *et al.* 1995).

Varios autores han estudiado *in vitro* la sobrevivencia y crecimiento de *Vibrio cholerae* O1 toxigénico en agua bajo variaciones de salinidad, pH, temperatura, etc. (recopilación en Colwell 1984). *V. cholerae* O1 crece en un pH entre 7.6 a 8.6 y una temperatura entre 18° y 40°C, mientras que su ámbito de salinidad común se encuentra entre 15 y 25 ‰, parámetro que influye notablemente en la distribución y sobrevivencia de *Vibrio* spp. en el ambiente. (Singleton *et al.* 1982; Sanchez 1991; Colwell & Spira 1992; Sakazaki 1992).

Las especies del género *Vibrio* son comunes tanto en el plancton como en el bentos en las zonas costeras (Noble *et al.* 1990). *V. cholerae* no requiere concentraciones altas de Na<sup>+</sup>, y puede encontrarse también en aguas dulces (e.g., Huq *et al.* 1990). Las investigaciones iniciadas por Colwell y colaboradores en la zona endémica de la Bahía de Chesapeake (costa del este de Los Estados Unidos), han permitido determinar que *V. cholerae* y otros vibriones patógenos pueden aclimatarse a condiciones medioambientales aparentemente poco favorables (Kaneko & Colwell 1975, Colwell *et al.* 1977; Xu *et al.* 1984; Brayton *et al.* 1987; Huq *et al.* 1990; Colwell & Spira 1992). Los vibriones bajo ciertas condiciones pueden agregarse en grupos (flóculos) lo que les confiere una mayor resistencia (Clark *et al.* 1994; Macek *et al.* 1997). Se ha encontrado que bacterias entéricas y posiblemente también vibriones pueden resistir la desinfección química del agua al sobrevivir dentro de protozoos (King *et al.* 1988; Barker & Brown 1994).

La distribución de *V. cholerae* en el mar, relacionada con el zooplancton no se ha documentado totalmente utilizando solo métodos de cultivo selectivos (Huq *et al.* 1984, 1990, Venkateswaran *et al.* 1989b, Tamplin *et al.* 1990). El aislamiento de las bacterias en medios selectivos ha sido universalmente aplicado para su detección en el agua, aunque no permiten detectar las bacterias viables pero no cultivables sobre medios estándar. Entre los medios selectivos comúnmente utilizados para cultivar *V. cholerae* se encuentra el agar Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-Sacarosa (TCBS), preparado por Kobayashi *et al.* (1963; Sakazaki 1992); también se ha recomendado agar McConkey, aunque en éste no crecen todas las cepas de *V. cholerae* (Sakazaki 1992). Para concentrar la muestra ambiental se utilizan dos procesos

distintos *in situ* con el uso de hisopos de Moore (Sanchez 1991) y con el método de filtro de membrana (Venkateswaran *et al.* 1989a).

### ***Vibrio cholerae* viable no cultivable.**

En condiciones de falta de nutrientes, la bacteria puede adquirir una forma redonda y reduce su tamaño. En tal estado *V. cholerae* no forma colonias lisas y redondas, sino rugosas. Generalmente en estas condiciones pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (Colwell *et al.* 1985; Colwell & Spira 1992; McKay 1992).

Después de discusiones sobre la llamada viabilidad de bacterias se llegó a lo siguiente: considerando su estado fisiológico, las bacterias se han clasificado en dos tipos (Roszak & Colwell 1987): a) Cultivables: células capaces de formar colonias en medios estandarizados y b) No cultivables: células que no crecen en medios selectivos. Se ha demostrado que las bacterias no cultivables pueden estar metabólicamente activas sin perder su posible patogenicidad (Colwell *et al.* 1985), este hecho ha sido un tema a discusión para el empleo de técnicas que permitan la detección de estas formas bacterianas. Las células no cultivables solo pueden enumerarse por métodos de conteo directo con el uso del microscopio (Roszak & Colwell 1987). La presencia de formas viables pero no cultivables se ha demostrado en el estudio de bacterias patógenas como *Salmonella enteritidis* (Roszak *et al.* 1984), *Escherichia coli* (Xu *et al.* 1982) y algunos *Vibrio* spp. (Xu *et al.* 1982, 1984; Tamplin *et al.* 1982; Colwell *et al.* 1985).

En el ambiente en que habitan las bacterias, existen factores que influyen notablemente en la transformación de forma cultivable a no cultivable. Entre los factores fisicoquímicos se tiene la luz, especialmente la ultravioleta que no necesariamente produce la lisis de las bacterias, ya que pueden permanecer morfológicamente intactas después de 5 días y en su mayoría metabólicamente activas aunque no cultivables (Fujioka *et al.* 1981, Barcina *et al.* 1986, 1989), la salinidad es un factor importante para las bacterias de ambiente dulceacuícola, del mar y de *V. cholerae*, microorganismo típico de agua salobre (Venkateswaran *et al.* 1989a, b). Las temperaturas extremas se han relacionado con la disminución de bacterias cultivables (Barcina *et al.* 1986). Algunos vibriones marinos responden a la falta de nutrientes en el agua, con un aumento en el número de células significativamente más pequeñas y que tienen una morfología cocoide diferente de las típicas. Si estas pequeñas

células se enfrentan a bajas temperaturas y/o a altas salinidades, rápidamente pasan a un estado no-cultivable, pero permanecen viables y potencialmente patógenas (Xu *et al.* 1982; Colwell *et al.* 1985, revisión en McKay 1992). *V. cholerae* pierde su capacidad para crecer en medios selectivos principalmente cuando la contaminación del agua no es reciente. Entre los factores biológicos se ha demostrado que uno de los principales en la disminución del número total de bacterias en el ambiente acuático es la depredación por protozoos (Mallory *et al.* 1983; Sherr *et al.* 1987, Šimek *et al.* 1990a; Macek *et al.* 1997) que en el caso de *V. cholerae* se puede relacionar también con la pérdida de la capacidad de crecer en medio de cultivo. También afecta la producción de toxinas por las mismas bacterias (Singleton *et al.* 1982, McDonnell *et al.* 1984, Sato *et al.* 1995). Sustancias antibióticas producidas por otras bacterias y algas han sido reportadas como causantes de la disminución del número de bacterias cultivables (Curds & Vandyke 1966; González *et al.* 1992), aunque no de bacterias totales (Munro *et al.* 1987). El papel de los bacteriófagos en el desarrollo de las bacterias en el agua se ha estudiado durante los últimos años sin embargo no se han reportado como causantes del estado no cultivable de las bacterias (García-Lara *et al.* 1991).

#### **Métodos directos de cuantificación de *Vibrio cholerae*.**

La patogenicidad de las especies de *Vibrio*, ha generado un ímpetu considerable para obtener métodos más precisos en su enumeración, aislamiento e identificación para aclarar y entender como y porqué vías afecta a la salud pública. Investigaciones anteriores han concluido que los indicadores convencionales de calidad del agua no reflejan la presencia de *V. cholerae* en ambientes marinos y estuarios (Colwell *et al.* 1977; Hood *et al.* 1983b; Xu *et al.* 1982; Huq *et al.* 1984, Brayton *et al.* 1987; Venkateswaran 1989a; Huq *et al.* 1990; Colwell & Spira 1992) y que las concentraciones de esta bacteria son afectadas por variables como la profundidad del cuerpo de agua o el ciclo de mareas (Koh *et al.* 1994). Se ha demostrado que los métodos estandarizados basados en cuenta en placa aunque son útiles para la bioindicación de la calidad del agua, no son lo suficientemente eficientes para estimar el número de bacterias totales. El análisis de muestras ambientales, requiere técnicas que puedan tanto aislar como identificar por métodos bioquímicos, diferentes especies de bacterias así como detectar sus formas viables pero no cultivables (Singleton *et al.* 1982; McDonnell *et al.* 1984; McKay 1992; Macek *et al.* 1997). *V. cholerae* O1 puede detectarse en la forma no

cultivable utilizando la técnica de conteo directo (microscópico) utilizando el método indirecto con anticuerpos fluorescentes (Xu *et al.* 1984), o bien directo (Tamplin *et al.* 1990), utilizando un anticuerpo O1 marcado con fluorescencia. Este método fue revisado y adoptado por Brayton & Colwell (1987) para las formas inmunopositivas y significativamente viables.

## JUSTIFICACIÓN

Aunque se ha estudiado ampliamente el papel de protozoos como importantes bacterívoros en el medio acuático, en nuestro País es poco conocido. El papel de los organismos planctónicos que se alimentan de manera importante de bacterias potencialmente patógenas no se conoce y en particular en la eliminación de *V. cholerae* O1 en el ambiente acuático.

El ambiente acuático es para el hombre una fuente importante de abastecimiento de alimento y recreación y la capacidad de los organismos patógenos para sobrevivir en estos medios representa un gran problema de salud pública. El estudio de *V. cholerae* en América Latina es de gran interés, pues ha provocado varias epidemias en estos países por lo que es importante la investigación de sus aspectos ecológicos y de su distribución ambiental. Sobre el comportamiento en el ambiente de *V. cholerae* todavía faltan datos en América Latina aún cuando ha habido epidemias muy serias en algunos países y ha sido frecuente detectar el vibrión en aguas costeras de México.

## HIPÓTESIS

1. La alimentación de los protozoos es uno de los procesos importantes en la eliminación de *V. cholerae* O1 del ambiente acuático.
2. En el ambiente, especialmente en el ambiente salobre o costero, *V. cholerae* O1 se comporta como otros vibriones no patógenos usando particularmente quitina como una fuente de nutrimento, compitiendo así, con otras bacterias quitinolíticas.

## OBJETIVO GENERAL

Estimar el impacto de la bacterivoría de *Cyclidium glaucoma* sobre *V. cholerae* O1 como un posible mecanismo de control de la abundancia de esta bacteria en el ambiente acuático

## OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar la posible tasa de eliminación de *V. cholerae* O1 en el ambiente acuático sobre (Laguna de Mecoacán, Tabasco)
  - 1.1. Comparar los valores de la tasa de eliminación obtenidos en un ambiente con *V. cholerae* autóctono (Laguna de Mecoacán) con los evaluados en un lago atalasohalino (Alchichica, Puebla), tomado como referencia, debido a la posible ausencia de esta bacteria.
2. Estimar el impacto de la bacterivoría de *Cyclidium glaucoma* y protozoos nativos sobre *V. cholerae* O1 como un mecanismo de control de la abundancia de esta bacteria en microcosmos montados en laboratorio con agua de la laguna de Mecoacán.
  - 2.1. Evaluar la tasa de alimentación individual y poblacional de ciliados sobre *V. cholerae* O1 en microcosmos en presencia de otras bacterias y con / sin quitina como sustrato / nutrimento, así como en la presencia o ausencia de bacterívoros nativos.
3. Conocer el crecimiento de *V. cholerae* O1 cultivable, inmunopositivo y bacterias totales en microcosmos con diferentes características: con / sin quitina como sustrato / nutrimento y con / sin *Cyclidium glaucoma* y bacterívoros y bacterias presentes en el agua de la Laguna de Mecoacán



## MATERIAL Y MÉTODOS

Para cubrir los objetivos propuestos, el trabajo de investigación se dividió en dos partes: Experimentos de campo (A) y de Laboratorio (B)

### A EXPERIMENTOS DE CAMPO

1. Laguna de Mecoacán, Tabasco. Se estimó: La tasa de eliminación de *Vibrio cholerae* O1, conteo e identificación de *Vibrio cholerae* cultivable y *Vibrio cholerae* O1 totales (inmunopositivos), bacterias totales, flagelados y clorofila
2. Lago de Alchichica, Puebla. Tomado como lugar de referencia debido a que las características fisicoquímicas del lugar pueden teóricamente apoyar la supervivencia de *Vibrio* spp. ya que no ha sido reportada su presencia. Se analizó la tasa de eliminación de *Vibrio cholerae* O1 para conocer si en este ambiente puede ser eliminada por bacterivoría

### ÁREA DE ESTUDIO

#### Laguna de Mecoacán

El sistema lagunar de Mecoacán se ubica al noreste de la zona litoral del Edo. de Tabasco, en el litoral del Golfo de México y entre los meridianos 93°04' y 93°14' y los paralelos 18°16' y 18°26', forma parte del cuerpo deltáico de los ríos Grijalva y Usumacinta. Tiene un área aproximada de 5168 ha. Mide 11.5 km de norte a sur y 7 km en su parte más ancha. Su conexión con el mar (Golfo de México), es de aproximadamente 400 m, es permanente y se conoce con el nombre de "Dos Bocas". La profundidad oscila entre 0.30 y 2.30 m con un promedio de 1 m. El canal de acceso al mar registra algunos tramos con honduras de 1m y se localiza al norte presentando una profundidad máxima (durante la marea) hasta de 6 m. Al norte de la laguna desemboca el río Escarbado (15 m de ancho), el cual sirve de enlace con el río González que llega al Golfo de México. Al sureste se localiza el río Cucuxchapa (15 m de ancho), el río Seco desemboca al noreste de la laguna, con un ancho aproximado de 100 m.

El tipo de clima según Köppen modificado por García (1973) es tropical lluvioso. La época de lluvias en la región se presenta durante los meses de junio a noviembre, siendo menor el resto del año (López-Hernández *et al.* 1997). La temperatura promedio es de 25.8 °C a 27.8 °C. Inciden fuertes vientos con dirección norte-noroeste llamados "nortes" que afectan la zona costera.

El aporte principal de materia orgánica proviene del manglar que rodea a la laguna, así como del lirio acuático arrastrado por los ríos que desembocan en la misma, además, también introducen lirio las corrientes provenientes de otros ríos que desembocan al mar, como es el caso del río González. La vegetación predominante son los manglares, *Rizophora mangle*, *Avicenia nitida* y *Lagunaria racemosa*, además de un tipo de popal (*Mucarelia*) y en el mismo transecto se encuentra vegetación hidrófita emergente y selva mediana subperennifolia (López-Hernández *et al.* 1997)

La Laguna de Mecoacán es utilizada para la pesca, como vía de comunicación por los habitantes de la región, para la recreación y se desarrollan actividades productivas como la agricultura de temporal, plantaciones perennes de cocos, huertos familiares y ganadería (López-Hernández *et al.* 1997). Es de gran importancia económica por la explotación de ostión, almeja, robalo, camarón, lisa y pargo, entre otros, que representa la fuente principal de ingresos para las poblaciones circundantes (Cortés *et al.* 2000)

Este cuerpo de agua recibe aportaciones directas de drenaje del poblado de Cuauhtémoc, el río González recibe del drenaje de los poblados de Jalapita (cercano al cruce de un oleo gasoducto) y del poblado de Chiltepec, en su desembocadura. Este sistema lagunar ha sido fuertemente impactado pero ha demostrado tener la capacidad de regenerarse de manera natural por un proceso relativamente lento. La explotación petrolera en esta zona ya ha sido evaluada pero se desconoce su impacto sobre la flora y fauna, sin embargo, los lugareños mencionan que ha disminuido la pesca (López-Hernández *et al.* 1997)

### **Lago de Alchichica**

El lago de Alchichica pertenece a un grupo de 6 lagos maar-cráter que son conocidos en la región con el nombre de axalapazcos (Arredondo *et al.* 1984) localizados en el Valle Oriental en el límite este del eje neovolcánico, entre los estados de Tlaxcala, Puebla y Veracruz. Es un lago atalashalino y el más grande de los seis en área superficial y volumen. Está localizado entre las coordenadas geográficas 19°24'13" y 19°25'10" N y 97°23'52" y 97°24'04" O. Se encuentra a una altura de 2345 m s.n.m. con una profundidad media de 38.55 m y una máxima de 64 m (Arredondo *et al.* 1983), por lo cual es considerado como el lago más profundo en México, con un área de superficie de 1.81 km<sup>2</sup>, 1733 m de longitud máxima. El área está caracterizada por un clima árido, con una precipitación promedio anual no mayor de 400 mm (Alcocer *et al.* 1993), con dos estaciones de lluvias separadas por dos de secas,

una larga a la mitad del año, en la época fría y otra corta, a la mitad de la época lluviosa (Arredondo *et al.* 1984) La temperatura del agua es templada, es un lago atalashalino, alcalino y con concentración saturada de oxígeno disuelto en la superficie (Alcocer *et al.* 1993). Lugo (2000), determinó las siguientes características fisicoquímicas. salinidad de 6.0 a 7.4 g l<sup>-1</sup>, pH de 8.6 a 9.2, temperatura de 19.5 a 23.5 °C y oxígeno disuelto de 0.0 a 7.8 mg l<sup>-1</sup>.

## EXPERIMENTOS

### Laguna de Mecoacán

Las muestras se tomaron durante un periodo de un año (1997). Se realizaron 4 muestreos: 2 en la época de lluvia (junio y agosto) y 2 en la de estiaje (enero, abril). Fueron seleccionadas 5 estaciones (Figura 3):

#### Estación Localización

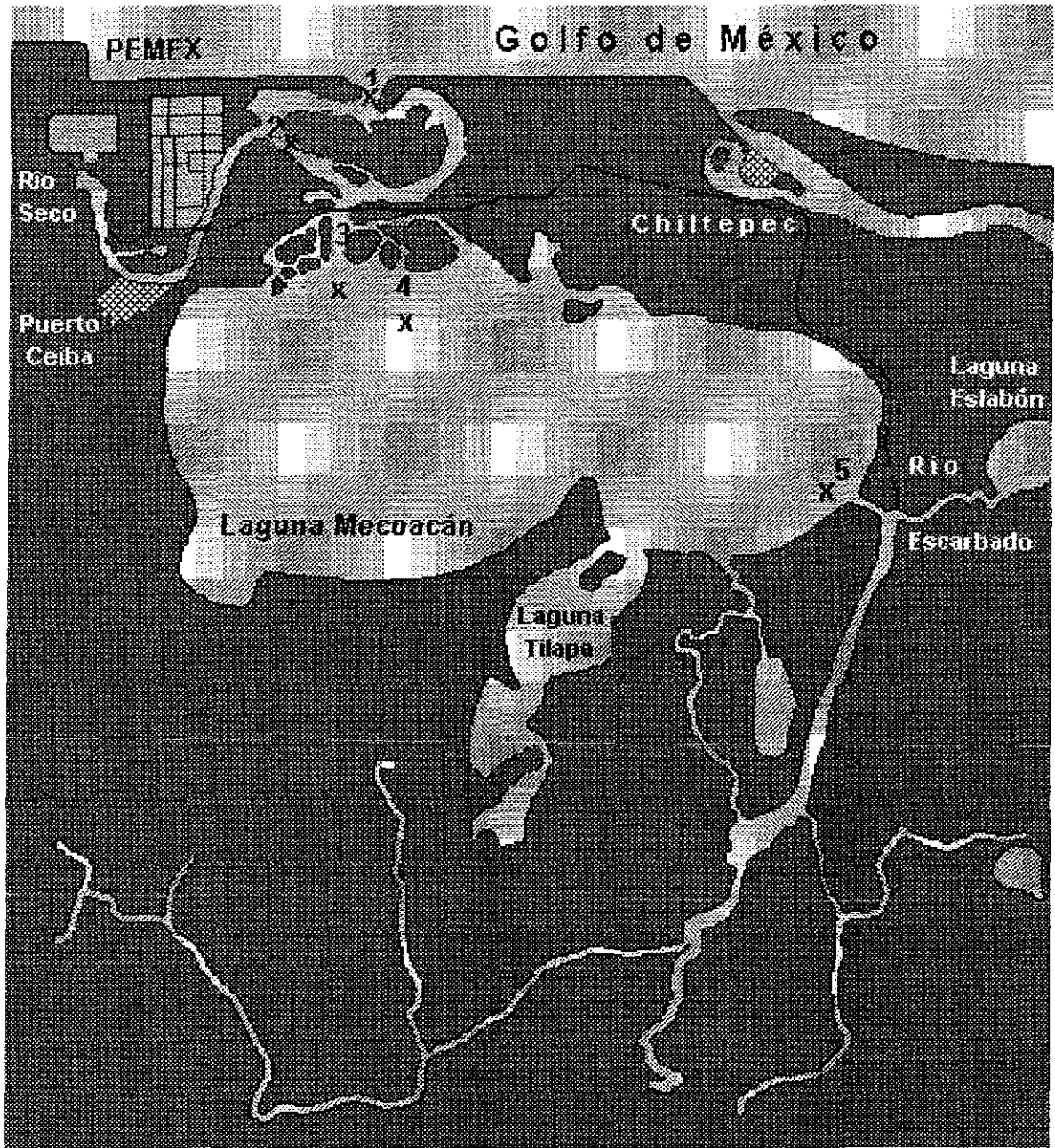
1. Salida al mar (Golfo de México)
2. Estación de PEMEX (el Canal)
3. Salida de la Laguna (cerca del canal)
4. Laguna, punto en donde se representan las condiciones de la laguna
5. Entrada del Río Escarbado, hacia la laguna donde hay interacción entre agua dulce que además proviene de la Laguna Eslabón y se conecta con otros ríos.

En las estaciones de mayor profundidad se tomaron muestras a diferentes profundidades, estas estaciones fueron la 2 (PEMEX): 2s (superficie), 2h (haloclina), 2f (fondo) y la 4 (Laguna): 4s (superficie) y 4f (fondo). En total, 8 muestras de 5 estaciones.

#### Análisis de parámetros físico-químicos

Los parámetros fisicoquímicos que se midieron *in situ* fueron: temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH, analizados con un Salinómetro y un Oxímetro (Yellow-spring Instruments, USA) y potenciometro (Hanna Instruments HI8314). Las muestras de agua de cada una de las profundidades, se tomaron con una botella Niskin de 6 litros

INSTITUTO MEXICANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
FALDA DE ORGEN



- Estaciones:**
- 1. Salida al Mar (Golfo de México)
  - 2. Estación de PEMEX (canal)
  - 3. Salida de La Laguna (cerca del canal)
  - 4. Laguna punto donde se representan las condiciones de la Laguna
  - 5. Entrada del Río Escarbado, hacia la Laguna

**Figura 3.** Localización de las estaciones en la Laguna de Mecoaacán

## Análisis microbiológicos

El trabajo general realizado en la Laguna de Mecoacán para cuantificar e identificar *Vibrio cholerae* cultivable y *Vibrio cholerae* O1 totales (inmunopositivos), bacterias totales, flagelados y clorofila, se presenta en la Figura 4.

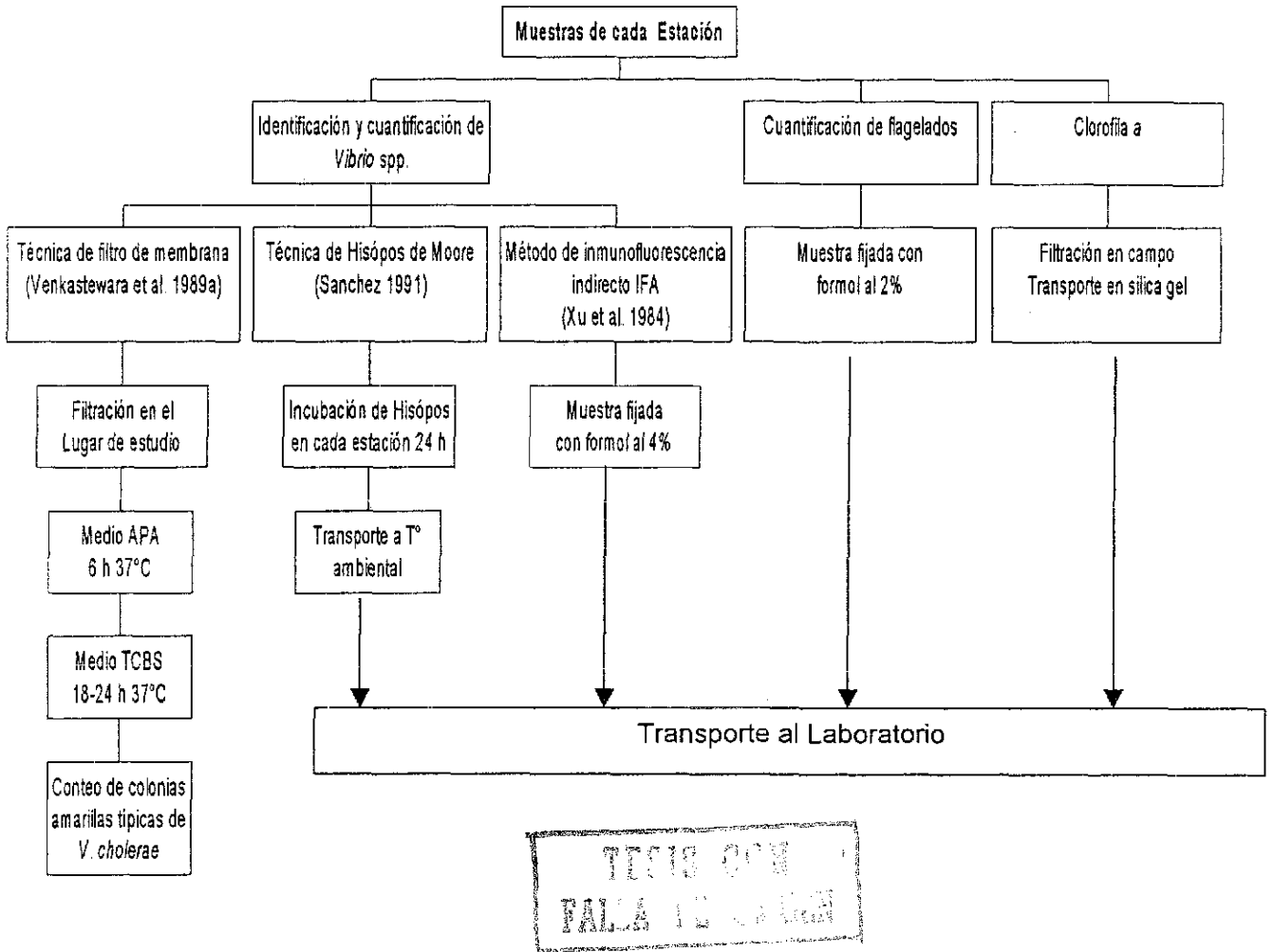


Figura 4. Esquema general del trabajo de campo en la Laguna de Mecoacán

El trabajo llevado a cabo para la estimación de la tasa de eliminación en la Laguna de Mecoacán y Lago de Alchichica se muestra en la Figura 5.

## TASA DE ELIMINACIÓN (Laguna de Mecoacán y Lago Alchichica)

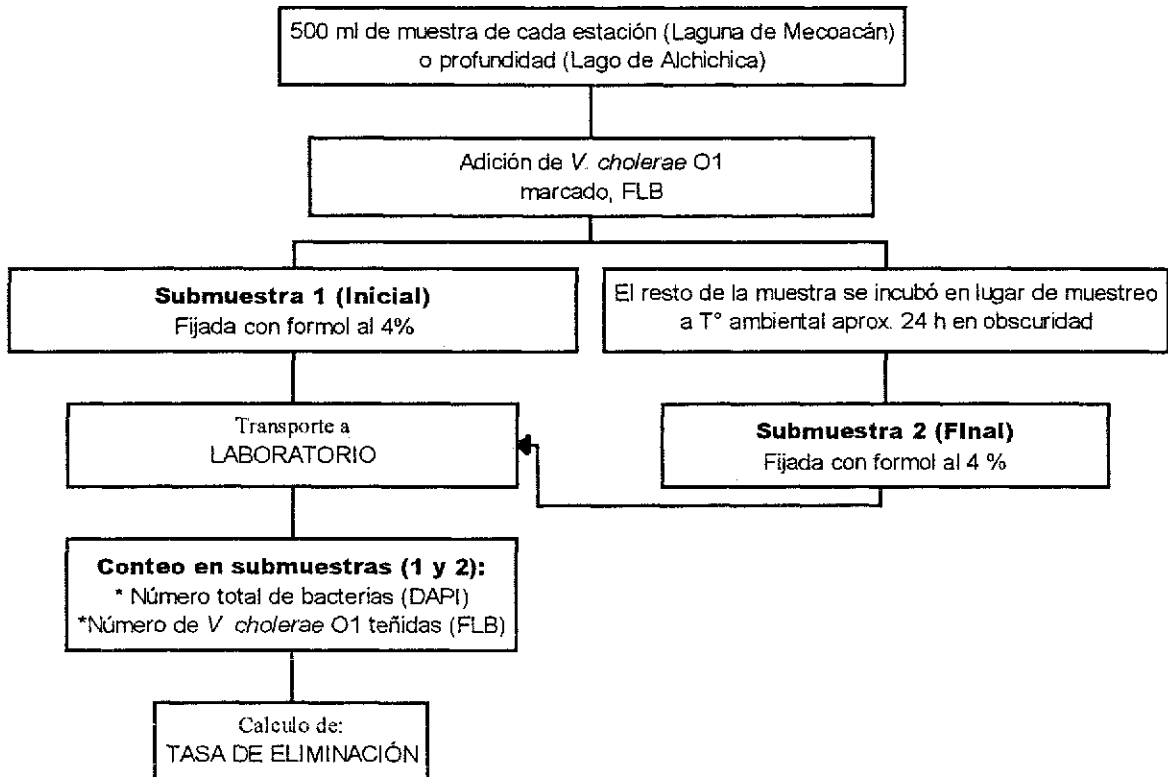


Figura 5. Esquema general de los trabajos realizados para obtener la estimación de la tasa de eliminación de *V. cholerae* O1.

### Lago de Alchichica

Las muestras se tomaron a diferentes profundidades en una estación localizada en el centro del lago donde se encuentra la mayor profundidad (Tabla 1), las profundidades seleccionadas fueron: superficie y de acuerdo a la profundidad del disco de Secchi desde la medio, hasta 3 profundidades (9 a 21 m).

MUESTREO	Profundidad	MUESTREO	Profundidad
1 FEBRERO (1997)	Superficie	2 MAYO (1997)	Superficie
	½ Secchi = 2 m		1 Secchi = 3 m
	1 Secchi = 4 m		2 Secchi = 6 m
	2 Secchi = 8 m		3 Secchi = 9 m
			20 m
3 AGOSTO (1997)	0.5 Secchi = 3.5m	4 ENERO (1998)	Superficie
	1 Secchi = 7 m		1 Secchi = 7 m
	1½ Secchi = 10 m		1½ Secchi = 10 m
	2 Secchi = 14 m		2 Secchi = 14 m
	3 Secchi = 21 m		3 Secchi = 21 m

Tabla 1. Lago de Alchichica: profundidades seleccionada en cada muestreo

ESTIMACIÓN DE LA TASA DE ELIMINACIÓN DE *V. CHOLERA*E O1 (FLB) EN LA LAGUNA DE MECOACÁN Y LAGO DE ALCHICHICA

#### Preparación de *Vibrio cholerae* O1 marcado con fluorescencia (FLB)

Para medir las tasas de eliminación bacteriana en campo y/o de alimentación de protozoos con *V. cholerae* O1 en los experimentos en microcosmos, se usó *V. cholerae* O1 aislada de la Laguna de Mecoacán en los laboratorios del Instituto Mexicano de Tecnología de Agua (IMTA). Esta bacteria fue marcada con fluorescencia (Fluorescently Labelled Bacteria; FLB), teñida con 5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl)-aminofluoresceín (DTAF, Sigma Chemical Co., USA) de acuerdo a la técnica de Sherr *et al.* (1987), se precultivaron de la siguiente manera: La cepa bacteriana se inoculó en 10 ml de medio (caldo triptonado al 1% preparado en agua salobre de la laguna esterilizada por 15 min a 121°C), se incubó por 6 h a 37°C. El cultivo se agregó a 250 ml del mismo caldo y se incubó de 15-18 h a 37°C (Macek *et al.* 1997) Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación (10,000 × g por 10 min). El paquete bacteriano se suspendió en 10 ml de una solución de 0.05 mol l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 0.85% NaCl (pH 9), se adicionaron 2 mg de DTAF y se incubó en un baño de agua a 60°C por 2 h. La incubación fue seguida mínimo por 3 lavados con centrifugación en la misma solución salina amortiguadora-fosfatada y resuspendida en una solución de pirofosfato tetrasodio (0.02 mol l<sup>-1</sup> Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-NaCl 0.85%) Alícuotas de bacterias teñidas se congelaron a -18°C en viales de plástico para ser utilizadas posteriormente para medir las tasas de eliminación en campo y la tasa de alimentación en microcosmos en concentraciones finales de 1%-10% de la concentración de las bacterias totales.

### Medición de la tasa de eliminación

Las células de *V. cholerae* O1 marcadas (FLB) se adicionaron a 500 ml de la muestra tomada en cada una de las estaciones en concentraciones de 1 a 10 %, del número total de las bacterias de la Laguna de Mecoaacán ( $10^6 - 10^7$  cel ml<sup>-1</sup>). Se tomó una submuestra (inicial) y se fijó con formalina a un 2 % como concentración final. El resto de la muestra viva se incubó en la oscuridad en la laguna por 24 horas posteriormente se fijó la submuestra (final) (Straškrabová *et al.* 1999). En el laboratorio se analizaron estas submuestras (inicial y final) contando los números de bacterias totales (DAPI) y bacterias marcadas FLB (Figura 6b izquierda). Para calcular la eliminación de número de bacterias se usó la ecuación de Salat y Marrasé (1994):

$$G = \frac{N_{FLB,0} - N_{FLB,t}}{t} \times \frac{N_0 + N_t}{N_{FLB,0} + N_{FLB,t}} \quad [\text{cel ml}^{-1} \text{ d}^{-1}]$$

donde la tasa de eliminación (*grazing rate; population grazing*)  $G$  [cel ml<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>] son las bacterias eliminadas durante la unidad de tiempo;  $t$  [d] es el tiempo de incubación,  $N_0$  y  $N_t$  [cel ml<sup>-1</sup>] son números totales de las bacterias en tiempo 0 (inicial) y tiempo  $t$  (final),  $N_{FLB,0}$  y  $N_{FLB,t}$  son los números de las bacterias marcadas (FLB) en tiempo 0 y tiempo  $t$ , respectivamente. Se calculó la tasa de eliminación  $E$  [d<sup>-1</sup>]

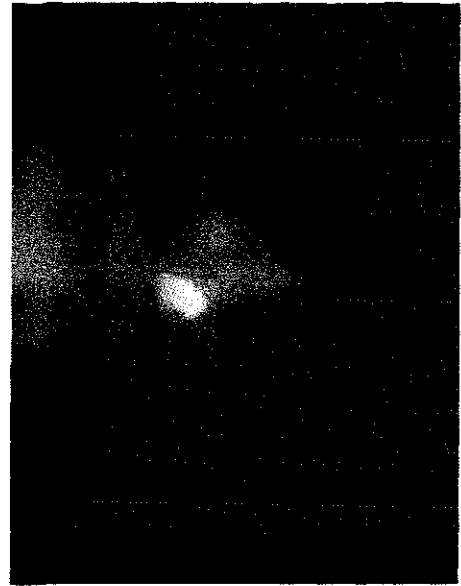
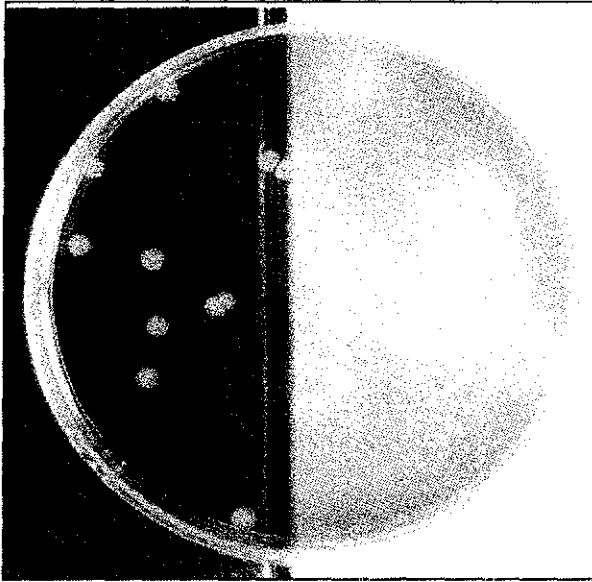
$$E = \frac{G}{N_0} \quad [\text{d}^{-1}]$$

donde  $G$  [cel ml<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>] representa las bacterias eliminadas durante la unidad del tiempo y  $N_0$  [cel ml<sup>-1</sup>] es el número total de las bacterias en tiempo cero (0).

### Medición de la tasa de crecimiento de bacterias

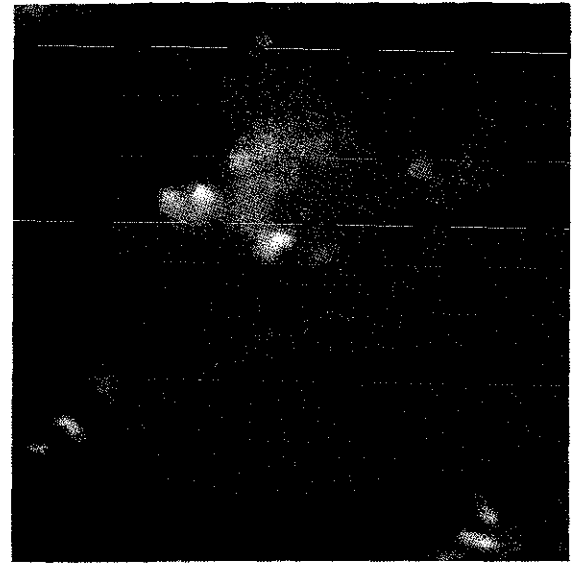
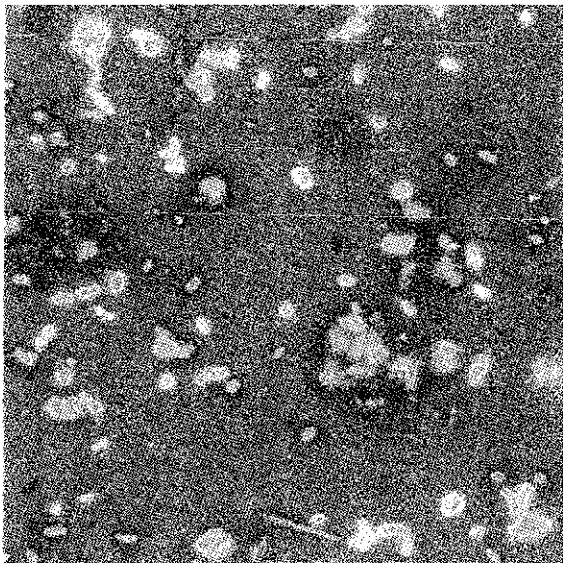
Con la finalidad de conocer la tasa de crecimiento de las bacterias totales de la Laguna de Mecoaacán en ausencia de bacterívoros y la influencia de éstos en la eliminación y crecimiento de estas bacterias, en el mes de junio (muestreo 3), se tomaron muestras de las estaciones, la submuestra (inicial) se fijó con formaldehído a una concentración final de 2 %. De la muestra se filtraron 10 ml de agua a través de membranas de 1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (para eliminar a los posibles bacterívoros) y se colocaron en incubación por 24 h en el lugar de estudio (submuestra final). Después de este tiempo se fijaron de igual manera y se contaron las bacterias de ambas submuestras usando la técnica de DAPI descrita adelante. La tasa de





**Figura 6a. Izquierda:** Colonias de *Vibrio cholerae* sobre agar TCBS

**Derecha:** *V. cholerae* O1. Inmunofluorescencia (IFA), inmersión, 100× .



**Figura 6b. Izquierda:** Bacterias teñidas con DAPI (azul) y *V. cholerae* FLB (DTAF; verde-amarillo). Filtros para la fluorescencia de DAPI y DTAF (combinado), inmersión, 100 ×

**Derecha:** Cadena de *Vibrio cholerae* dividido pero no separado bajo condiciones adversas en el microcosmos. Tinción DAPI y DTAF (FLB). Epifluorescencia, inmersión, 100 × .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

crecimiento específica  $\mu$  [ $d^{-1}$ ] se calculó

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} \quad [d^{-1}]$$

Donde  $N_t$  es el número total de bacterias en tiempo (t) y  $N_0$  es el número total de bacterias al tiempo cero (0), durante la unidad de tiempo t [d]

#### ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

Para la estimación de la tasa de alimentación y cuantificación microbiológica tanto de muestras ambientales como de microcosmos en laboratorio, se utilizó el material y equipo que se muestran en la Tabla 2.

Conteo de Microorganismos	Tinción	Material	Equipo
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bacterias totales</li> <li>▪ Flagelados</li> <li>▪ <i>V. cholerae</i> FLB ingeridas dentro de <i>C. glaucoma</i></li> </ul> Por el método de Porter y Feig (1980)	DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol Sigma, USA)	Membranas de policarbonato tamaño de poro de 0.2 , 1.2 ó 2 $\mu$ m (Poretics, Alemania), previamente teñida a negro (Negro Irgalan o Negro Clorazol).	Microscopio de epifluorescencia Zeiss, Germany, con juego de filtros de excitación UV (G365 FT395 LP420), para la observación de fluorescencia con DAPI y Naranja de Acridina (AO) – FITC, usando el objetivo de inmersión 100 $\times$
<i>V. cholerae</i> O1 teñidas, FLB (Fluorescently Labelled Bacteria), Sherr <i>et al.</i> (1987)	DTAF; Sigma, USA 5-(4,6-dichlorotriazin-2-yl)-aminofluorescein		
Número directo de <i>V. cholerae</i> O1 por inmunofluorescencia (Xu <i>et al.</i> 1984)			
<i>Vibrio cholerae</i> cultivable ambiental y <i>V. cholerae</i> O1 en microcosmos (Venkateswaran <i>et al.</i> 1989 <sup>a</sup> )		Membranas estériles (tamaño de poro de 0.45 $\mu$ m; Millipore, USA) Agar TCBS (DIFCO, USA)	Equipo de filtración Millipore, USA ( $\varnothing$ 47 mm)

Tabla 2. Material y equipo utilizado para el conteo microbiológico y tasas de alimentación, tanto de muestras ambientales como de microcosmos en laboratorio.

#### Aislamiento, identificación y cuantificación de *Vibrio cholerae* cultivable.

Para la cuantificación de *V. cholerae* cultivable, se tomaron las muestras de agua de cada una de las estaciones y en el campo se siguió el método de filtro de membrana de Venkateswaran *et al* (1989a), es importante mencionar que este trabajo se realizó en un laboratorio montado de manera provisional en el lugar de muestreo. La muestra se concentró filtrando 3 diferentes volúmenes desde 1 ml hasta 100 ml, con la finalidad de obtener un crecimiento cuantificable de las colonias características de *Vibrio* sp sobre TCBS, las

membranas se colocaron sobre agar preparado con agua peptonada alcalina (1% de peptona, 1% de NaCl, pH 8.86). Después de 6 h de incubación a 37°C se colocó la membrana en agar TCBS y se cultivaron a 37°C por 18-24 h después del lo cual las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) típicas, con centro amarillo se contaron (Figura 6a izquierda). Sin embargo, al no obtenerse resultados positivos se decidió utilizar hisopos de Moore estériles (Sanchez 1991) para concentrar los vibrios, colocándolos en cada una de las estaciones por un período de 24 horas. Se transportaron en medio Amies protegidos de la luz y a temperatura ambiente para ser analizados en el laboratorio en donde se realizaron las pruebas bioquímicas y serológicas necesarias para su identificación (Sanchez 1991)

#### **Cuantificación directa de *Vibrio cholerae* O1 (IFA).**

Para la estimación del número total de *V. cholerae* O1 se tomaron las muestras en botella de polipropileno (Nalgene) de 125 ml, se fijaron con formalina (concentración final al 4%) y se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente para ser analizadas. Se utilizó el método indirecto de inmunofluorescencia descrito por Xu *et al* (1984). En el laboratorio se tomaron cinco mililitros de cada muestra y se filtró a través de una membrana de 0.2 µm. Esta membrana se colocó dentro de una cámara húmeda (a 55°C por 15 minutos) para fijar las bacterias. Se agregó 25 µl de una mezcla de *V. cholerae* O1 antisuero Poly y de Bacto-FA-Rodamina-Isotiocianuro a una dilución final de 1:5 y 1:20, respectivamente (ambas DIFCO, USA) y se incubó por 1 h en una cámara húmeda a 35 °C. La membrana se lavó con una solución amortiguadora de fosfatos (pH 9) sobre un papel filtro absorbente. A la membrana se le adicionó una gota de solución de Bacto-FA-Mounting-Fluid pH 9 (Difco, USA). Bajo el microscopio se contaron las células bacterianas con una fluorescencia verde concentrada en la periferia de la célula (Figura 6a)

#### **Cuantificación del número directo de bacteria totales y flagelados**

El número de bacterias totales se cuantificó como número directo. Las muestras se fijaron en el campo con formalina (a una concentración de 2% final) y se transportaron al laboratorio para ser analizadas. Las bacterias se concentraron por filtración de 1 a 5 ml de la muestra en membranas con tamaño de poro de 0.2 µm, se tiñeron con DAPI (Porter & Feig 1980) y se contaron las células color azul usando el microscopio de epifluorescencia (Figura 6b).

Los flagelados presentes se cuantificaron usando la misma técnica (tinción con DAPI), filtrando 5 a 10 ml de la muestra sobre el filtro de membrana de poro 0.2  $\mu\text{m}$ .

## B. EXPERIMENTOS DE LABORATORIO

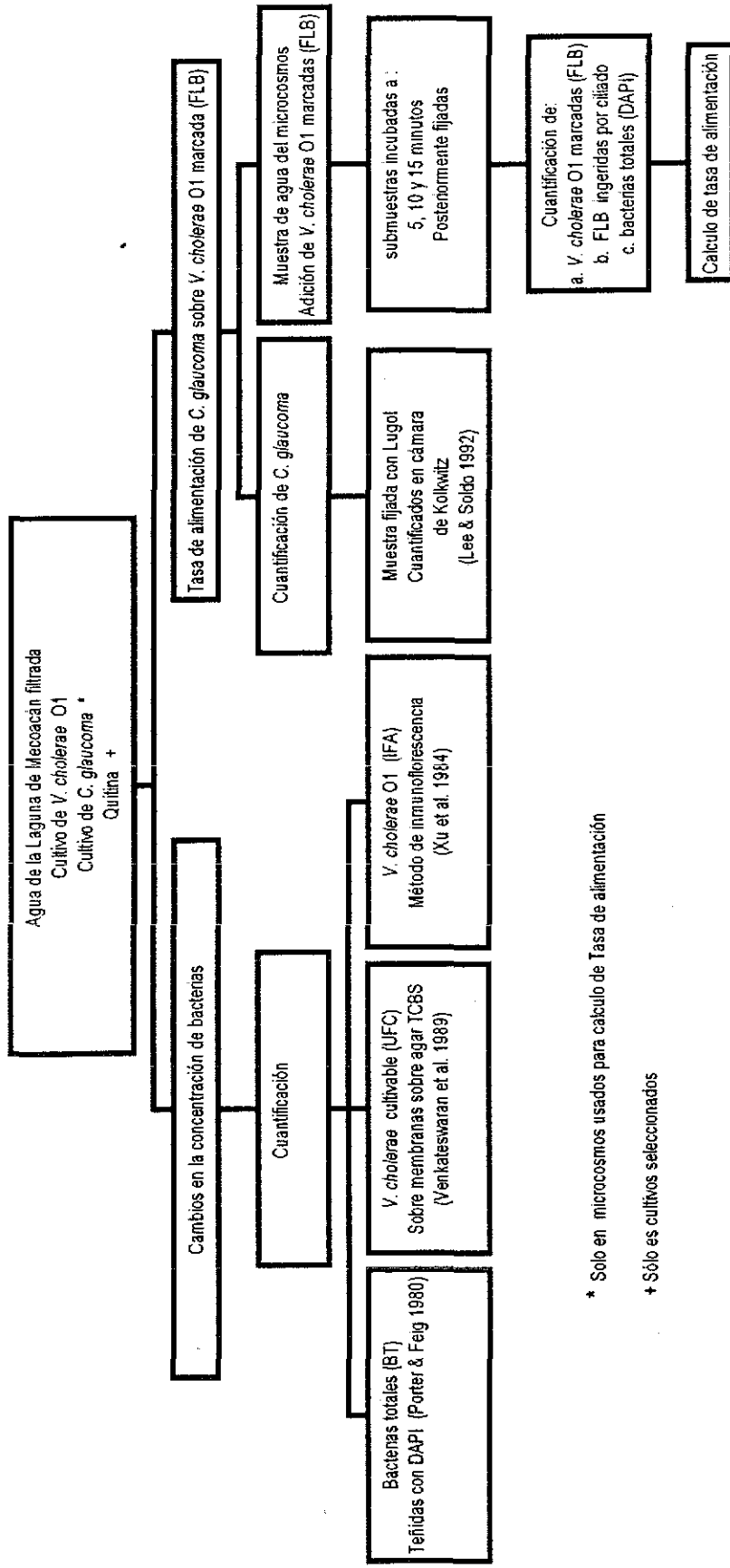
El trabajo general de los experimentos realizado en el laboratorio para la estimación de la tasa de alimentación de *C. glaucoma* sobre *V. cholerae* O1 y cuantificación de microorganismos con el uso de microcosmos se muestra en la Figura 7.

### Montaje de Microcosmos

Los experimentos en el laboratorio se manejaron como sistemas batch (microcosmos), tratando de simular las condiciones del ambiente natural controlando la temperatura. El agua de los microcosmos se aireó usando un agitador magnético a 200 rpm aprox. y manteniendo la temperatura a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  (temperatura promedio de la Laguna). A estos sistemas se les adicionó un cultivo de *V. cholerae* O1 como la principal fuente de materia orgánica. Se usaron matraces Erlenmeyer de 2.0 litros, esterilizados, a los que se adicionó agua salobre de la Laguna de Mecoacán (salinidad de  $18 \text{ g l}^{-1}$  y pH de 8.8). Se agregó un cultivo de *V. cholerae* O1 y para la estimación de la tasa de alimentación de *C. glaucoma* se añadió además a sistemas elegidos un cultivo de este ciliado. El agua de la Laguna fue filtrada con diferentes tamaño de poro de membrana de acuerdo a las características deseadas en cada microcosmos (Tabla 3):

1. Filtrada con membranas de policarbonato de 2 o 1.2  $\mu\text{m}$  de poro: con bacterias de la laguna, eliminando depredadores.
2. Filtrada con membranas de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$ , para ver el comportamiento de *V. cholerae* O1: sin depredadores y sin otras bacterias provenientes de la laguna.

A microcosmos seleccionados se les adicionó quitina extraída de camarones del lugar (de acuerdo con Guthrie y Cofie 1991). Las características de los microcosmos de cada ensayo se muestran en la (Tabla 3).



\* Solo en microcosmos usados para calculo de Tasa de alimentación

+ Sólo es cultivos seleccionados

Figura 7. Esquema general de los experimentos realizados en el laboratorio con el uso de microcosmos

ENSAYO	AGUA FILTRADA $\mu\text{m}$	CULTIVO <i>Vibrio cholerae</i>	BACTERIAS DEL AGUA	FLAGELADOS DEL AGUA	CULTIVO <i>Cyclidium glaucoma</i>	QUITINA
1	0.2	si	no	no	no	si
	0.2	si	no	no	no	no
	2.0	si	si	si	si	si
	2.0	si	si	si	si	no
	2.0	si	si	si	no	no
2	0.2	si	no	no	no	si
	0.2	si	no	no	no	no
	1.2	si	si	si	si	no
	1.2	si	si	si	si	si
	2.0	si	si	si	no	no
3	0.2	si	no	no	si	no
	0.2	<i>Salmonella typhimurium.</i>	no	no	si	no
4	0.2	si	no	no	si	no
	1.2	si	si	si	si	no
	1.2	si	si	si	no	no
5	0.2	si	no	no	no	si
	1.2	si	si	si	si	si
	1.2	si	si	si	no	no
	1.2	si	si	si	si	no
	1.2	si	si	si	no	si

Tabla 3. Características de los microcosmos.

#### CULTIVOS UTILIZADOS

##### Bacterias

Se usó un cultivo de *Vibrio cholerae* O1 El Tor aislado de la laguna de Mecoacán (IMTA) y un cultivo de *Salmonella typhimurium* (FES Iztacala). El procedimiento de precultivo se realizó de la misma manera como ya se describió para la tinción de bacterias (FLB). Las células se cosecharon por centrifugación ( $10,000 \times g$  por 10 min), se resuspendieron en el agua esterilizada de la laguna y se adicionaron proporcionalmente (en concentraciones de  $10^6$  a  $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ) a los microcosmos.

##### Ciliados

Para medir las tasas de alimentación en los microcosmos montados en el laboratorio, fue utilizado un cultivo de *Cyclidium glaucoma* MUELLER 1773, aislado del agua del Lago de

Alchichica y fue mantenido en “medio de grano” (1 grano de trigo por cada 10 ml de agua de la laguna de Mecoacán). Fue identificado en vivo y teñido por la técnica de tinción de protargol (Foissner *et al.* 1994, 1999). Antes del montaje de los microcosmos, los ciliados fueron precultivados durante 2 días en el mismo medio; se adicionaron 40 ml del cultivo en concentraciones de  $10^3$  a  $10^4$  cel ml<sup>-1</sup> a los microcosmos que se seleccionaron para evaluar las tasas de alimentación de *Cyclidium glaucoma* sobre *V. cholerae* O1 (Tabla 3)

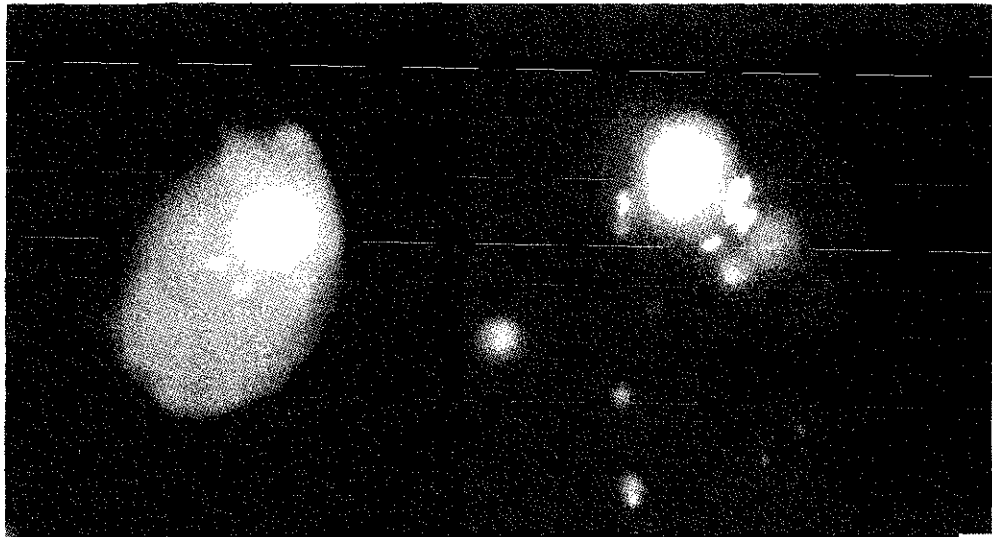
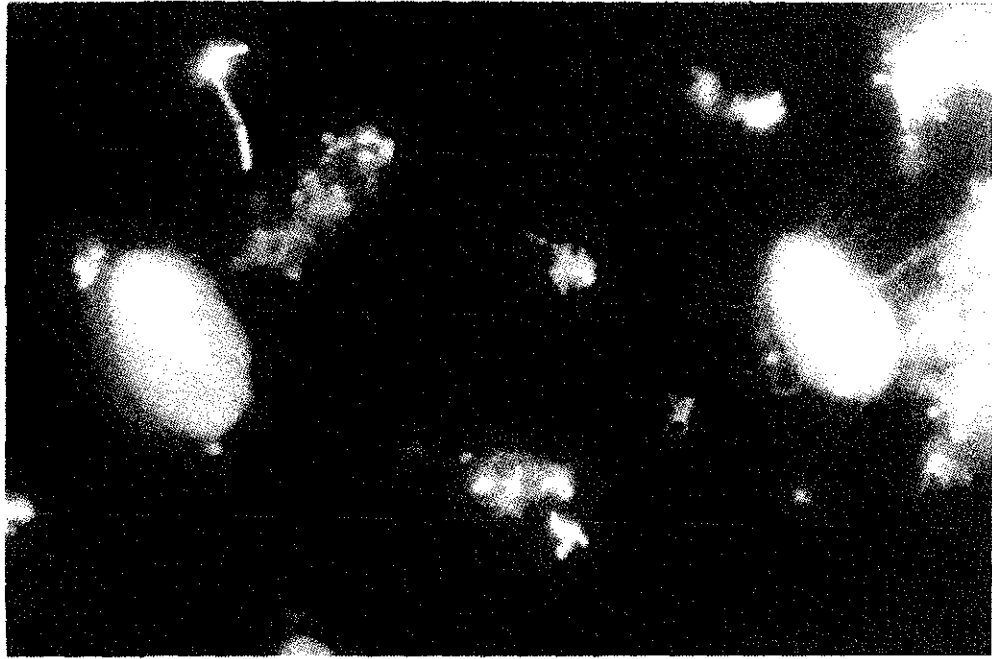
Con el objetivo de conocer si existe selectividad de *C. glaucoma* en cuanto a su tipo de alimento y tamaño de la presa (bacteria), en el ensayo 3 se montaron 2 microcosmos (Tabla 3) con agua de la Laguna de Mecoacán libre de protozoos y bacterias. A un microcosmos se le agregó un cultivo de *V. cholerae* O1 y al otro un cultivo de *Salmonella typhimurium* como la principal fuente de materia orgánica

#### **Tasa de alimentación de *Cyclidium glaucoma* sobre *V. cholerae* O1**

Para evaluar la tasa de alimentación de *Cyclidium glaucoma* sobre *V. cholerae* teñido (Sherr *et al.* 1987; Lee & Soldo 1992; Sherr & Sherr 1993), Los vibriones marcados con DTAF (FLB) se prepararon como ya se mencionó para el análisis de eliminación de bacterias en las muestras ambientales. Se tomaron 20 ml de muestra del microcosmos, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 50 ml y se dejaron por 10 minutos sin movimiento. Las bacterias marcadas (FLB) fueron homogeneizadas y agregadas para obtener la misma concentración en todos los matraces (1%-10% de la concentración bacteriana total). Posteriormente se incubaron a 3 diferentes periodos (5, 10 y 20 minutos) y se fijaron como ya se mencionó. De 1 a 5 ml de la muestra se filtraron sobre membranas de 2 µm tamaño de poro y se tiñeron con DAPI (Figura 8 arriba). Se enumeraron las bacterias marcadas (FLB) ingeridas en  $\geq 50$  ciliados (Sherr *et al.* 1987; Šimek *et al.* 1995) de cada una de las tres muestras tomadas a diferente tiempo de exposición usando el microscopio de epifluorescencia y DTAF, fluorescencia verde-amarillo (Figura 8 abajo) Las mediciones se hicieron desde el día 1 después de que se montó el microcosmos, hasta finalizar el experimento (día 3 o 4)

Se calcularon los siguientes parámetros:

a. Tasa de filtración (*clearance* o *clearance rate*)  $F$  [nl cel<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>] que es el volumen filtrado por una célula por unidad de tiempo (Fenchel 1986); se calculó de acuerdo al número promedio de bacterias teñidas (FLB) ingeridas por los ciliados  $n_{FLB}$  [cel cel<sup>-1</sup>], concentración de FLB  $N_{FLB}$  [cel ml<sup>-1</sup>] en el matrás y el tiempo de exposición  $t$  [h]



**Figura 8. Arriba:** *Cyclidium glaucoma*. Epifluorescencia (DAPI), inmersión, 100×

Abajo: *C. glaucoma* con bacterias teñidas (FLB) preparadas de *V. cholerae* (izquierda) y *Salmonella typhimurium* (derecha) ingeridas. Filtros para la epifluorescencia de DAPI y DTAF (combinado), inmersión, 100×

11-15 CON  
FALLA LE ORIGEN



$$F = \frac{n_{FLB}}{N_{FLB} \times t} \quad [nl \text{ cel}^{-1}h^{-1}]$$

b. Tasa de alimentación de un protozoo, alimentación individual (*uptake rate*)  $U$ ,  $cel \text{ cel}^{-1}h^{-1}$  como número de células (bacterias) ingeridas por una célula (un protozoo) por unidad de tiempo se calculó usando la tasa de filtración  $F$  [ $nl \text{ cel}^{-1}h^{-1}$ ] y del número de bacterias totales  $N$  [ $cel \text{ ml}^{-1}$ ]

$$U = F \times N \quad [cel \text{ cel}^{-1}h^{-1}]$$

c. Tasa de eliminación (*grazing rate; population grazing*)  $G$  [ $cel \text{ ml}^{-1}d^{-1}$ ] la cuál se calculó del promedio aritmético de la tasa de alimentación individual de un protozoo  $U$  [ $cel \text{ cel}^{-1}d^{-1}$ ] en dos mediciones consecutivas ( $U_1$  y  $U_2$ ) y del promedio geométrico del número de protozoos  $N_{prot}$  en dos mediciones (Macek *et al.* 1997)

$$G = \frac{U_1 + U_2}{2} \times \sqrt{N_{prot,1} \times N_{prot,2}} \quad [cel \text{ ml}^{-1}d^{-1}]$$

## ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

### Cuantificación directa de bacterias totales

El número de bacterias totales se determinó como número directo usando tinción con DAPI. La muestra de cada microcosmos se fijó con formalina al 2% como concentración final y se siguió la técnica como ya se describió anteriormente para las muestras ambientales

### Cuantificación de *Vibrio cholerae* O1 cultivable

Para la cuantificación de *V. cholerae* cultivable se utilizó el método de filtro de membrana en medio TCBS. Se realizaron 3 diluciones (elegidas de acuerdo al conteo de las colonias obtenidas el día anterior de cada microcosmos) con el agua de la laguna (esterilizada por filtración) y se filtraron a través de filtros de membrana estériles (tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ). Los filtros se colocaron sobre cajas Petri con agar TCBS y se cultivaron a 37 °C por 18-24 h, después de lo cual se contaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) típicas, con centro

amarillo se contaron (Figura 6a izquierda) Como representativos se tomaron las diluciones con los números que abarcaron de 10 a 100 UFC por filtro

### Cuantificación directa de *Vibrio cholerae* O1 (IFA)

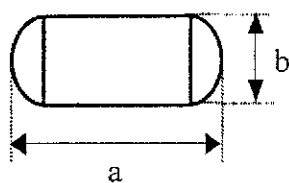
Se utilizó el método indirecto descrito por Xu *et al* (1984) revisado por Brayton & Colwell (1987). La muestra tomada del microcosmos se fijó con formalina (al 2%) y se siguió la técnica como ya se describió para el análisis de las muestras ambientales

### Número de protozoos

El número de ciliados se determinó por conteo directo en las muestras preservadas con una solución de Lugol al 1 %, decoloradas con tiosulfato y postfijadas con formaldehído al 5% (Sherr & Sherr 1993). Los ciliados se enumeraron en cámaras de sedimentación de Kolkwitz (Lee & Soldo 1992). Los flagelados se contaron usando DAPI, como ya se describió.

### Medición del biovolumen de bacterias

Para conocer las dimensiones de las células bacterianas teñidas (FLB) que se utilizaron en los experimentos tanto en laboratorio como en campo y del cultivo de *V. cholerae* O1 para el montaje de los microcosmos, en el ensayo 1, se tomaron fotografías con el microscopio de epifluorescencia. En las impresiones (tamaño carta) se midió el tamaño de una célula en sus ejes más cortos y más largos de la bacteria (Psenner 1993). Se midieron un total de 50 bacterias de cada muestra, el volumen de la célula bacteriana se calculó de la siguiente manera (Figura 9).



$$V = (\pi/4) \times [(b^2 \times a) - (b^3/3)]$$

Donde a = largo  
b = ancho

**Figura 9.** Dimensiones de una bacteria y cálculo de su volumen

Para la descripción de la distribución del biovolumen, se calculó el diámetro esférico equivalente, como el diámetro de una esfera del mismo volumen.

## Análisis estadísticos

Con los datos obtenidos se realizaron los siguientes análisis estadísticos:

- 1 Análisis de conglomerados con los parámetros fisicoquímicos obtenidos en la Laguna de Mechoacán, con el objeto de formar grupos de estaciones que compartieran características semejantes en los parámetros. Los datos fueron transformados a logaritmos a excepción del pH, para eliminar las unidades diferentes y normalizar su distribución (Statistica versión 4.5 (1993)
- 2 Se realizó un análisis de correlación con el uso del paquete estadístico Statgraphics versión 5.0 (1991), para establecer relaciones entre parámetros fisicoquímicos, concentración de bacterias, flagelados, clorofila y tasas de eliminación.
- 3 Con la finalidad de conocer si existe diferencias significativas entre los parámetros medidos bacterias totales (DAPI), Tasa de eliminación de bacterias totales, número de *V. cholerae* O1 totales (IFA), Tasa de eliminación de *V. cholerae* O1 totales (IFA), flagelados y clorofila, se realizó un análisis de varianza de una vía con el uso del programa SPSS para Windows versión 10.0.1 (1999).
- 4 Se relacionó la tasa de eliminación ambiental de bacterias vs. la concentración de bacterias totales (BT) y vs. la concentración de *V. cholerae* O1 (IFA)
- 5 Se relacionó las tasas de crecimiento de *C. glaucoma* vs. a) concentraciones de bacterias totales (BT) y b) *V. cholerae* O1 (IFA).
- 6 Se relacionaron los datos de la tasa de crecimiento de *C. glaucoma* obtenidos de los microcosmos vs. concentración de bacterias totales y vs. *V. cholerae* O1 cultivable (UFC). Se graficaron los valores de los 3 días en que estuvieron en incubación en el microcosmos.
- 7 Se realizó un análisis de Anova con los conteos de bacterias totales (BT), *V. cholerae* O1 inmunopositivo (IFA) y *V. cholerae* O1 cultivable (TCBS) de los microcosmos para conocer si existen diferencias significativas entre el comportamiento de densidad en estas bacterias en los diferentes microcosmos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS

### Laguna de Mecoacán

#### Características fisicoquímicas de la Laguna de Mecoacán

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* en la Laguna de Mecoacán se presentan en la Tabla 4. Durante el período de estudio la Laguna mostró diferentes valores de acuerdo a la localización de las estaciones de muestreo (Figura 5).

Comparando los parámetros fisicoquímicos por estación durante el año de estudio se puede observar que los valores de pH variaron de 7.5 hasta 8.9, los más bajos siempre se encontraron en la estación 5 (entrada del río) y los más altos en la estación 1 (desembocadura al mar) por donde, durante la marea alta, entra agua del mar a la Laguna (Tabla 4) El parámetro que mostró variaciones considerables entre las estaciones durante el año de estudio, fue la salinidad, la cual tuvo valores entre 3‰ (estación 5) >30 ‰ (estaciones 1 y 2). Los promedios calculados a lo largo del año en este parámetro muestran que la estación 5 (entrada del río) presentó el valor más bajo (5.4‰) y el más alto en la estación 2 hasta 30.9‰ y en la estación 1 con 28.3‰. En la estación 2 en donde se analizaron 3 profundidades, se puede observar la presencia de una haloclina bien definida (Figura 10a,b,c,d) encontrándose valores más altos hacia el fondo (2f).

Los valores más bajos de Oxígeno Disuelto (OD) se observaron en enero (Tabla 4) Comparando los promedios obtenidos, en cada una de las estaciones, los valores más altos se registraron en las estaciones 2s (6.1 mg l<sup>-1</sup>) y el más bajo en las estaciones 4f con 4.4 mg l<sup>-1</sup>.

En cuanto a la temperatura del agua se puede observar que los valores en general se registraron entre 23°C y 30.7 °C, con un promedio anual de 27.6 °C. Por otro lado, la temperatura no tuvo variaciones considerables en cada una de las estaciones, tampoco se observó la formación de una termoclina, en las estaciones en donde se encontró una mayor profundidad (estación 2, hasta 6 m de profundidad y estación 4, hasta 2m).

#### Análisis microbiológico

##### Eliminación de *Vibrio cholerae* O1 *in situ*

La bacterivoría medida utilizando *V. cholerae* O1 marcado con fluorescencia, (FLB) se presenta en la Tabla 5, Figura 11. En enero, en las estaciones 2h, 3 y 4s, no se detectó ingestión bacterias del tamaño de *V. cholerae* O1.

Parámetro	Muestreo	Estación 1		Estación 2		Estación 3		Estación 4		Estación 5	Promedio muestreo
		1	2	2s	2h	2f	Estación 3	4s	4f		
pH	1	8.0	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.7	7.7	7.5	7.8
	2	8.1	8.3	8.2	8.1	8.1	8.1	8.3	8.3	8.1	8.2
	3	8.4	8.7	8.7	8.7	8.7	8.5	8.7	8.7	8.3	8.6
	4	8.8	8.9	8.7	8.7	8.7	8.8	8.7	8.9	8.7	8.8
	<b>Promedio</b>	<b>8.3</b>	<b>8.4</b>	<b>8.3</b>	<b>8.3</b>	<b>8.3</b>	<b>8.3</b>	<b>8.4</b>	<b>8.4</b>	<b>8.1</b>	<b>8.3</b>
Temperatura °C	1	24.0	23.0	22.5	22.5	23.5	23.0	24.0	23.5	23.0	23.3
	2	30.5	30.7	27.8	27.8	26.1	30.6	30.5	30.7	30.7	29.7
	3	25.0	29.0	26.0	26.0	25.0	32.0	32.0	32.0	29.0	28.7
	4	28.8	29.6	26.0	26.0	25.0	29.1	29.8	30.0	31.0	28.3
	<b>Promedio</b>	<b>27.1</b>	<b>28.1</b>	<b>25.6</b>	<b>25.6</b>	<b>24.9</b>	<b>28.7</b>	<b>29.1</b>	<b>29.1</b>	<b>28.4</b>	<b>27.6</b>
O.D. mg l-1	1	3.6	3.8	2.9	2.9	3.0	4.0	3.8	3.0	3.2	3.4
	2	5.8	7.5	6.3	6.3	4.3	7.1	7.6	6.4	6.2	6.4
	3	6.6	6.3	6.2	6.2	5.7	5.1	5.6	5.4	4.4	5.7
	4	6.8	6.8	2.7	2.7	3.6	4.3	6.0	2.6	5.0	4.7
	<b>Promedio</b>	<b>5.7</b>	<b>6.1</b>	<b>4.5</b>	<b>4.5</b>	<b>4.2</b>	<b>5.1</b>	<b>5.8</b>	<b>4.4</b>	<b>4.7</b>	<b>5.1</b>
Salinidad 0/00	1	34.0	21.0	27.0	27.0	33.0	21.0	18.0	18.0	6.0	22.3
	2	22.2	18.8	25.3	25.3	28.9	19.2	18.7	18.8	3.1	19.4
	3	33.0	14.5	31.5	31.5	33.5	14.5	12.0	12.0	9.5	20.1
	4	24.0	18.5	28.0	28.0	28.0	15.0	16.0	20.5	3.0	19.1
	<b>Promedio</b>	<b>28.3</b>	<b>18.2</b>	<b>28.0</b>	<b>28.0</b>	<b>30.9</b>	<b>17.4</b>	<b>16.2</b>	<b>17.3</b>	<b>5.4</b>	<b>20.2</b>

Muestreo : 1 = Enero 2 = Abril 3 = Junio 4 = Agosto

Estación : s = Superficie h = Haloclina f = Fondo

Tabla 4. Parámetros Físicoquímicos medidos *in situ* en la Laguna de Meacoacán

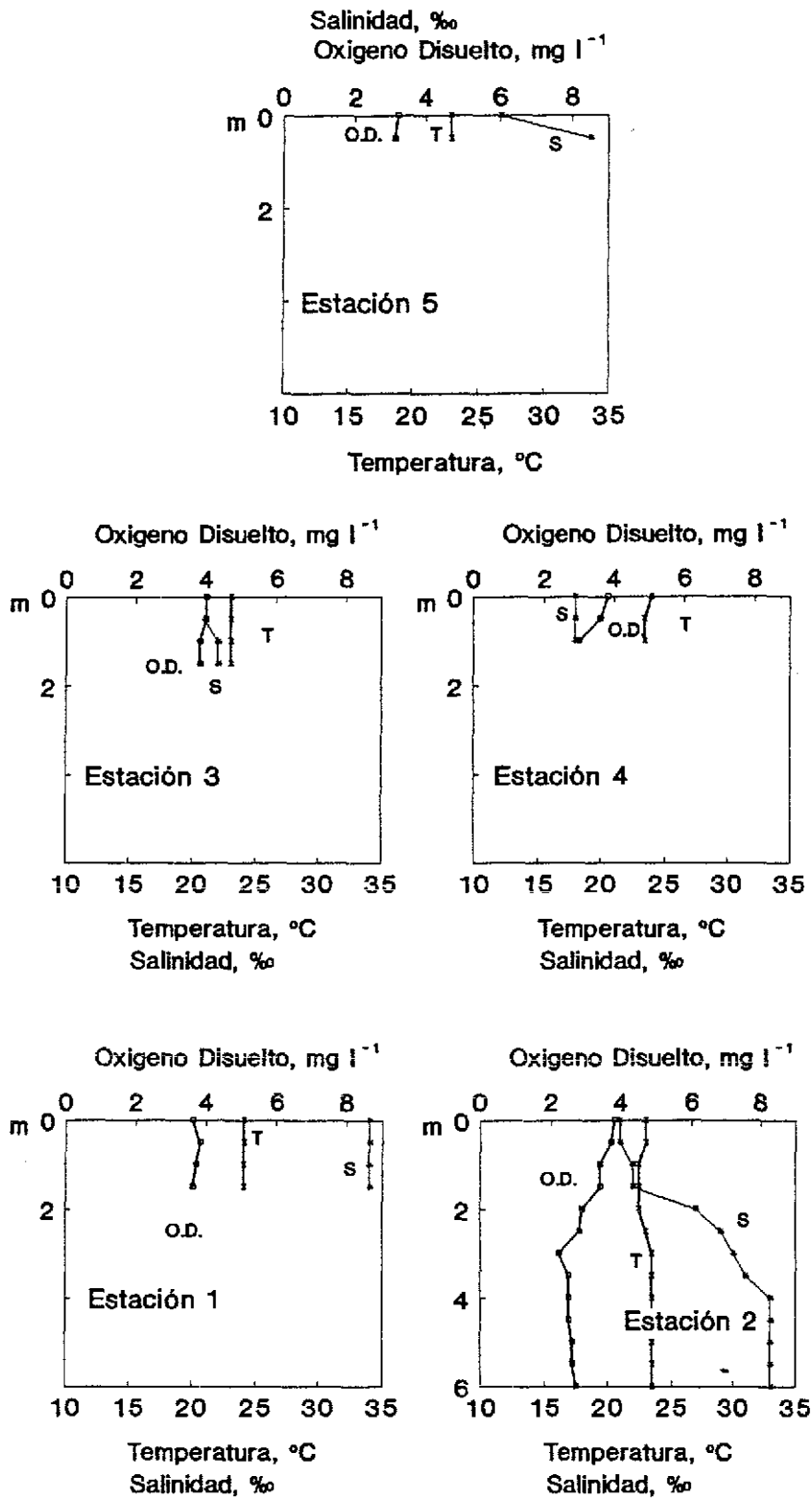


Figura 10. Parámetros físico-químicos en la Laguna de Mecoacán, Tabasco: a. Enero,

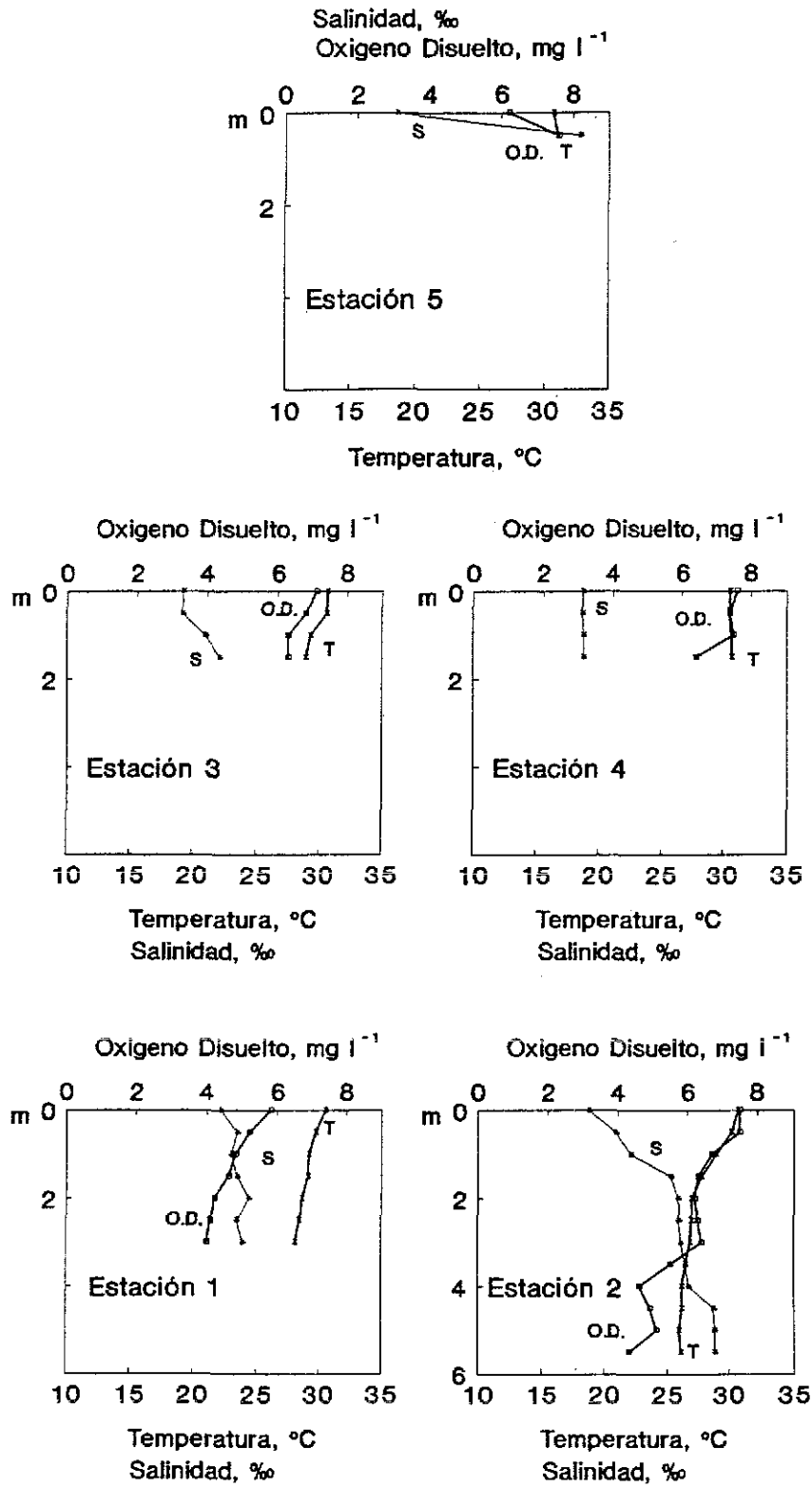


Figura 10. Parámetros físico-químicos en la Laguna de Mecoaacán, Tabasco: b. Abril

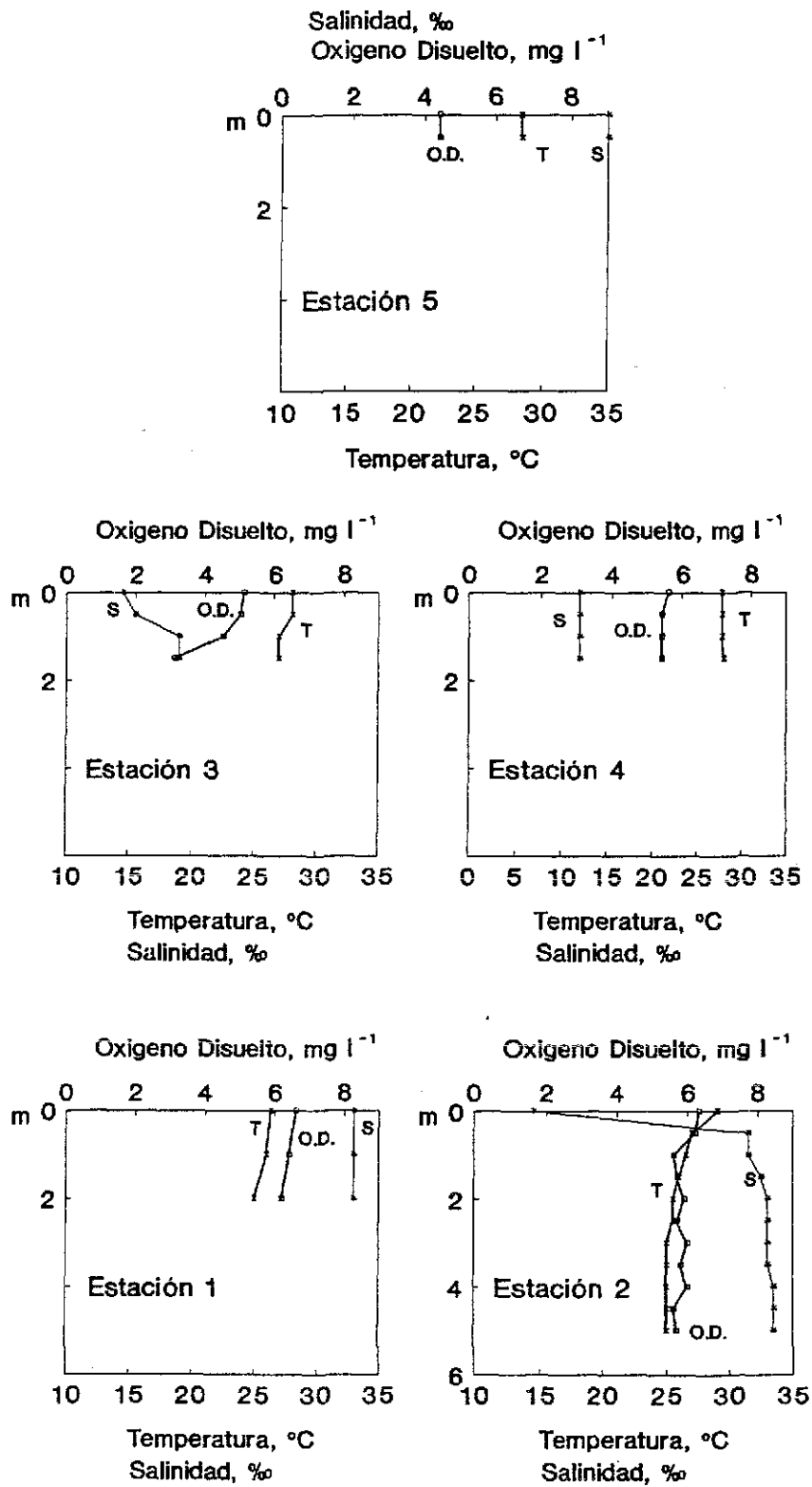


Figura 10. Parámetros físico-químicos en la Laguna de Mecoacán, Tabasco: c. Junio



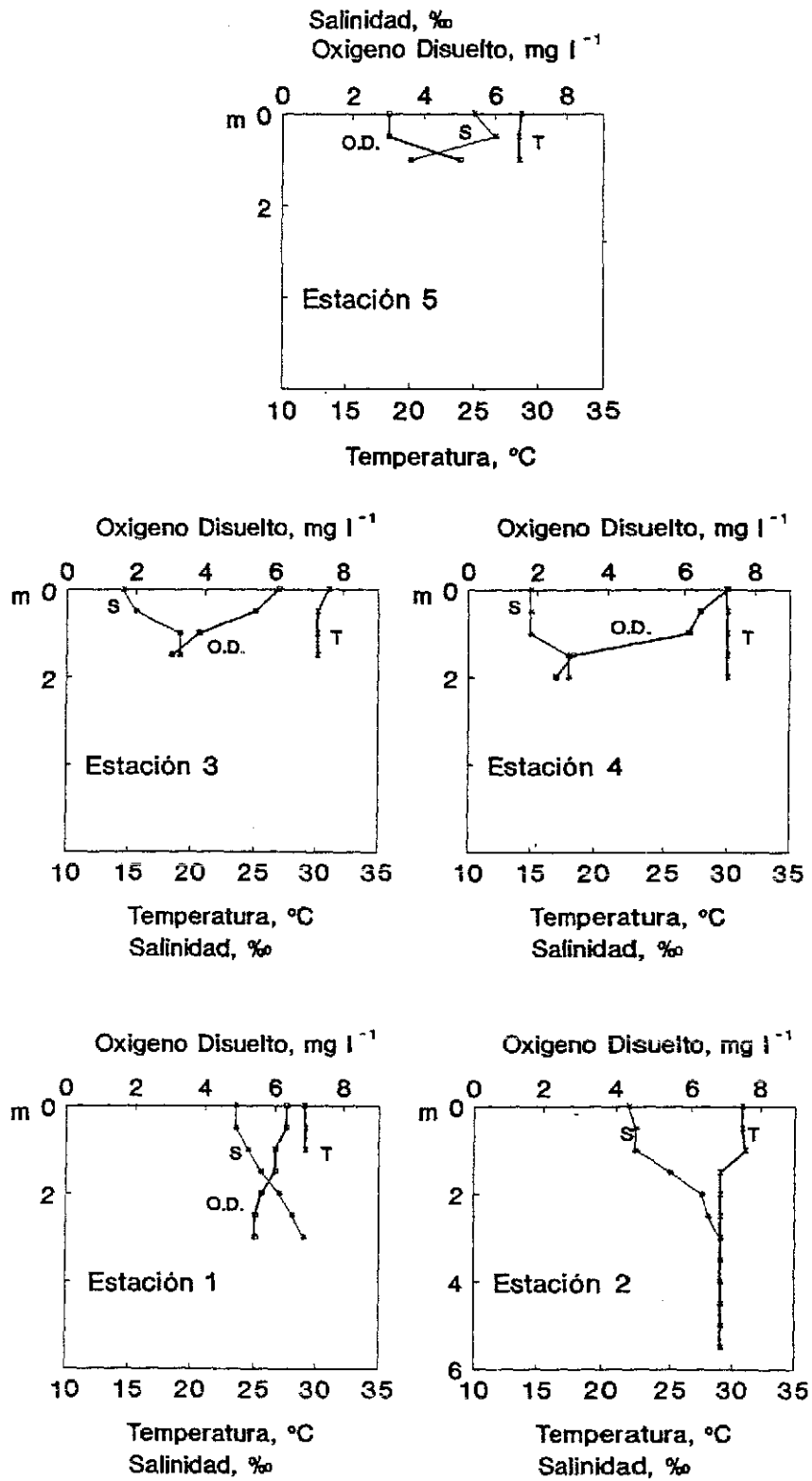


Figura 10. Parámetros físico-químicos en la Laguna de Mecocacán, Tabasco: d. Agosto

La menor eliminación de células se observó en la estación 2f con  $8.7 \times 10^3$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$  y con una tasa de eliminación de  $0.04 \text{ d}^{-1}$ , lo cual indica que 4 % de la población total presente en esta estación es eliminada cada 24 horas. En las estaciones 2s, 4f y 5 la ingestión de bacterias fue en un orden de magnitud de  $10^4$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$  y sus tasas de eliminación de  $0.2 \text{ d}^{-1}$  a  $0.3 \text{ d}^{-1}$ . La mayor ingestión de bacterias, se encontró en la estación 1 ( $1.5 \times 10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) con una tasa de eliminación de  $0.6 \text{ d}^{-1}$ , es decir, más de la mitad de la población presente al tiempo inicial en que se tomó la muestra; después de 24 horas fue eliminada.

En abril la eliminación más baja de bacterias ( $9.9 \times 10^4$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) se encontró en la estación 3 y una tasa de eliminación poblacional de  $0.3 \text{ d}^{-1}$ . En las estaciones restantes el número de bacterias eliminadas se cuantificaron en órdenes de  $10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ . En la estación 2s, se encontró el valor más alto ( $3.1 \times 10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), con una tasa de eliminación de  $2.6 \text{ d}^{-1}$ . En el tercer muestreo (junio), los valores fueron ligeramente inferiores en relación al muestreo de abril. El número de bacterias ingeridas varió desde  $3.3 \times 10^4$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$  hasta  $4.2 \times 10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$  (estación 2f y estación 4 f, respectivamente)

En agosto, en todas las estaciones la ingestión de bacterias se encontró en el mismo orden con  $10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ , sin embargo, los valores más altos se registraron en las estaciones 1 y 2h con  $8.8 \times 10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$  y  $9.4 \times 10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$  respectivamente, El valor más bajo se encontró en la estación 2f ( $2.5 \times 10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). La tasa de eliminación fue menor a la encontrada en abril y junio, las cuales variaron de  $0.4 \text{ d}^{-1}$  (estación 5) hasta  $0.67 \text{ d}^{-1}$  (estación 2h) que fue la más alta registrada en ese mes.

### **Aislamiento de *Vibrio cholerae***

Con el método de cultivo sobre membrana en el medio selectivo TCBS de Venkateswaran *et al.* (1989a), en ninguno de los muestreos se aisló y por lo tanto no se cuantificó *V. cholerae* en su forma cultivable aún cuando se filtraron diferentes volúmenes de agua de cada una de las estaciones, (1 a 100 ml) con el propósito de obtener el volumen necesario que permitiera el conteo de *V. cholerae*, sin embargo, se observó el crecimiento de otras bacterias con características diferentes a las de *Vibrio* sobre TCBS.

Con el método de hisopos de Moore (Sanchez 1991), fue posible el aislamiento de cepas cultivables de diferentes especies del género *Vibrio*. Se obtuvieron un total de 39 cepas

Muestreo	Estación No.	Bacterias Totales cels ml <sup>-1</sup>	Bacterias	Bacterias	Tasa de	V. cholerae O1	Ingestión	*	*
			Ingeridas cels ml <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Ingeridas cels ml <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Eliminación d <sup>-1</sup>	IFA cels ml <sup>-1</sup>	IFA cels ml <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Flagelados cels ml <sup>-1</sup>	chl <sub>a</sub> µg l <sup>-1</sup>
1 ENERO	1	6.0 E6	1.5 E5	3.6 E6	0.59	170	99	1200	1.33
	2s	5.0 E6	4.9 E4	1.2 E6	0.23	160	36	290	0.98
	2h	6.0 E6	ND	ND	ND	370	ND	270	0.78
	2f	5.0 E6	8.7 E3	2.1 E5	0.04	200	8	170	0.05
	3	6.0 E6	ND	ND	ND	300	ND	90	2.41
	4s	6.0 E6	ND	ND	ND	240	ND	160	1.15
	4f	6.0 E6	7.2 E4	1.7 E6	0.29	240	67	400	1.86
	5	7.0 E6	6.5 E4	1.6 E6	0.22	340	76	500	1.48
	Promedio	5.9 E6	3.1 E4	7.4 E5	0.12	250	21	3900	1.3
2 ABRIL	1	6.1 E6	1.4 E5	3.4 E6	0.56	190	110	600	1.5
	2s	2.8 E6	3.1 E5	7.5 E6	2.6	40	110	290	1.5
	2h	5.8 E6	1.1 E5	2.6 E6	0.45	62	28	4900	0.62
	2f	4.2 E6	1.5 E5	3.6 E6	0.85	47	40	1000	0.58
	3	7.0 E6	9.9 E4	2.4 E6	0.34	99	34	3300	0.72
	4s	5.9 E6	2.1 E5	4.9 E6	0.84	74	62	1200	1.2
	4f	6.1 E6	1.8 E5	4.4 E6	0.72	130	94	1500	0.49
	5	7.0 E6	2.5 E5	6.1 E6	0.88	46	40	1000	0.90
	Promedio	5.6 E6	1.8 E5	4.4 E6	0.91	86	64	1700	0.94
3 JUNIO	1	1.1 E6	5.4 E4	1.3 E6	1.1	240	280	930	4.3
	2s	5.4 E6	2.1 E5	5.0 E6	0.91	56	51	5500	0.92
	2h	2.7 E6	5.1 E4	1.2 E6	0.46	27	13	3700	9.2
	2f	1.8 E6	3.3 E4	8.0 E5	0.45	240	110	2600	5.4
	3	6.1 E6	1.4 E5	3.3 E6	0.54	170	94	2400	17
	4s	1.0 E7	3.0 E5	7.3 E6	0.72	190	149	7900	38
	4f	1.7 E7	4.2 E5	1.0 E7	0.60	320	190	11000	34
	5	4.7 E6	1.6 E5	3.8 E6	0.81	88	72	12000	27
	Promedio	6.1 E6	1.7 E5	4.1 E6	0.70	170	120	5800	18
4 AGOSTO	1	3.8 E7	8.1 E5	1.9 E7	0.52	290	150		
	2s	2.8 E7	4.9 E5	1.2 E7	0.43	120	53		
	2h	3.4 E7	9.5 E5	2.3 E7	0.67	170	110		
	2f	1.5 E7	2.5 E5	6.0 E6	0.41	190	79		
	3	1.4 E7	3.2 E5	7.6 E6	0.53	150	78		
	4s	2.3 E7	5.7 E5	1.4 E7	0.60	190	110		
	4f	2.2 E7	3.3 E5	7.8 E6	0.36	190	69		
	5	2.2 E7	3.2 E5	7.6 E6	0.35	130	47		
	Promedio	2.4 E7	5.0 E5	1.2 E7	0.48	180	88		

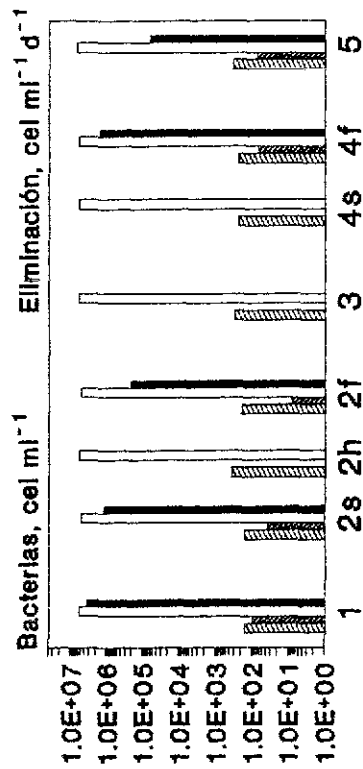
s = superficie    h = haloclina    f = fondo    ND = No detectado    IFA = Inmunopositivo

\* Datos proporcionados por Miroslav Macek

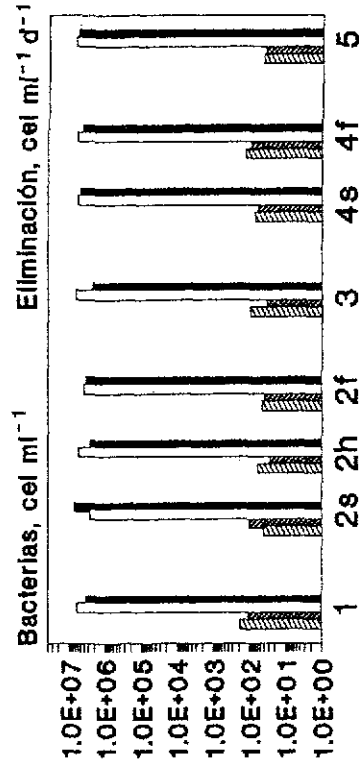
Tabla 5. Tasa de Eliminación y parámetros microbiológicos en la Laguna de Mecoacán

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

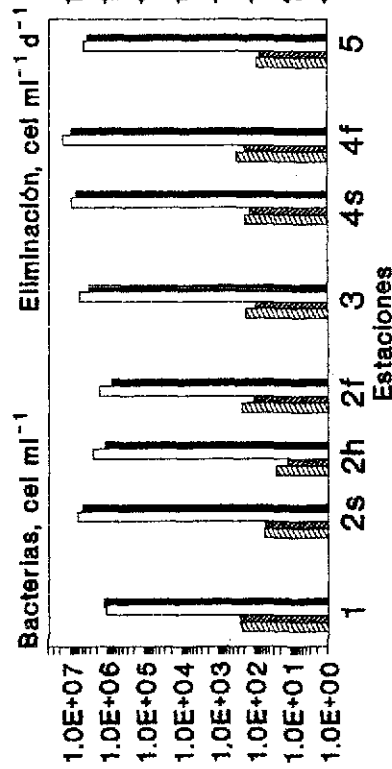
MECOACAN  
21-22 de enero



MECOACAN  
23-24 de abril



21-22 de junio



21-22 de agosto

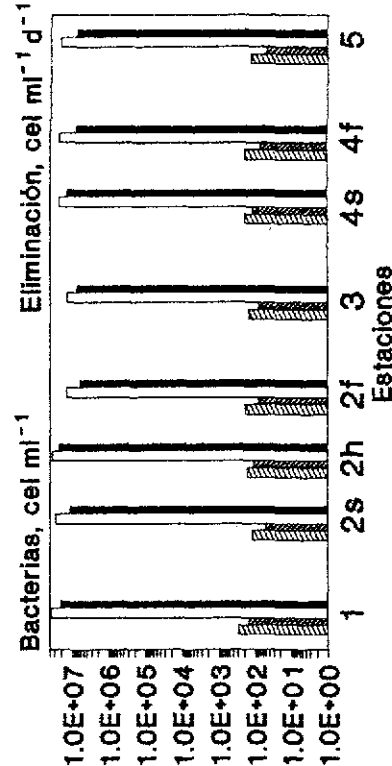


Figura 11. Bacterias totales (BT), *Vibrio cholerae* O1 (IFA) y eliminación diaria de bacterias totales y de *V. cholerae* en la Laguna de Mecoaacán.

aisladas del agua, procedentes de las muestras concentradas en hisopos. Las especies de *Vibrio* identificadas fueron las siguientes. *Vibrio fluvialis* y *V. vulnificus* 5%; *V. alginolyticus* 15.4%; *V. parahaemolyticus* 36% y *V. cholerae* No O1 38.5% (Figura 12). Estas bacterias fueron identificadas con el sistema API 20 y pruebas bioquímicas convencionales, los resultados de ambas pruebas se corroboraron con pruebas serológicas

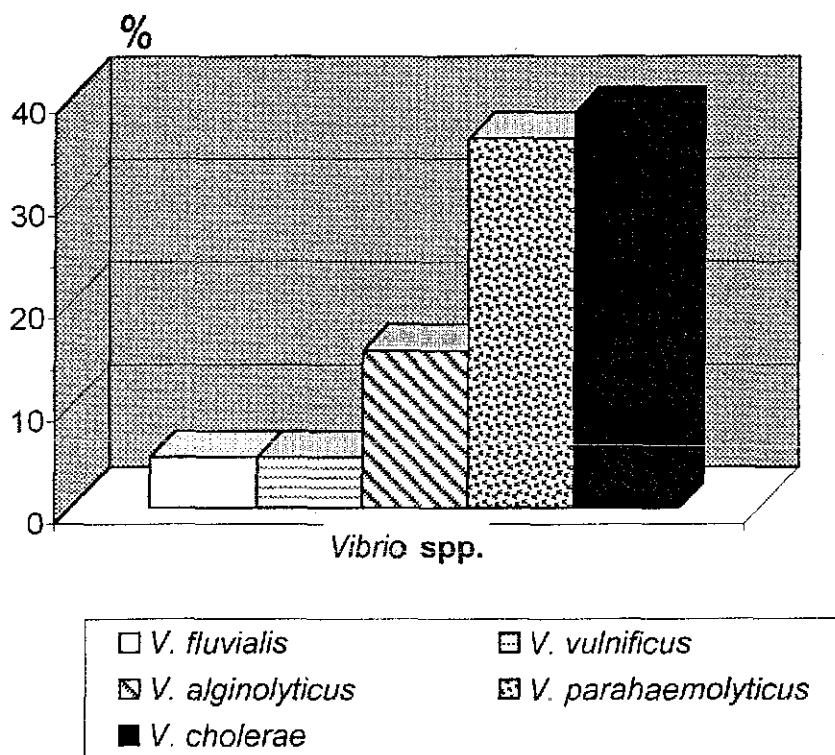


Figura 12. Distribución de aislamientos del género *Vibrio* en la Laguna de Mecoacán

#### Número directo de *Vibrio cholerae* O1 (IFA)

La cuantificación directa de *V. cholerae* O1 por el método de inmunofluorescencia en cada una de las estaciones, proporcionó valores en concentraciones de hasta  $10^2$ . En el mes de enero se encontraron las más bajas en la estación 2s con  $160 \text{ cel ml}^{-1}$  y en la estación 1

(desembocadura al mar) con  $170 \text{ cel ml}^{-1}$ , la concentración más alta se encontró en la haloclina 2h ( $370 \text{ cel ml}^{-1}$ ) y en la estación 5 (entrada del río) con  $340 \text{ cel ml}^{-1}$  (Tabla 5, Figura 11). En el segundo muestreo (abril), las concentraciones fueron más bajas que en el de enero, en su mayoría en órdenes de magnitud de  $10^1 \text{ cel ml}^{-1}$ , los valores más altos fueron para las estaciones 1 y 4f ( $190 \text{ cel ml}^{-1}$  y  $140 \text{ cel ml}^{-1}$ , respectivamente). En junio los valores más bajos se localizaron en las estaciones 2h ( $27 \text{ cel ml}^{-1}$ ) y 5 ( $88 \text{ cel ml}^{-1}$ ) y los más altos en la estación 4f ( $320 \text{ cel ml}^{-1}$ ). En agosto, al igual que en enero, se encontraron valores en órdenes de  $10^2 \text{ cel ml}^{-1}$  el más bajo en la estación 5 ( $130 \text{ cel ml}^{-1}$ ) y el más alto en la estación 1 ( $330 \text{ cel ml}^{-1}$ ). En general, los valores más altos se localizaron en la estación 1 (salida al mar) en abril, junio y agosto, aunque, se observó un número alto en la entrada del río, (estación 5) en el mes de enero ( $3.4 \times 10^2 \text{ cel ml}^{-1}$ ) y cerca del sedimento en la estación 4 en abril y junio ( $130$  y  $320 \text{ cel ml}^{-1}$  respectivamente). Los valores más bajos siempre se localizaron en la estación 2s (superficie). Comparando los promedios calculados para cada mes de muestreo, los valores más bajos se encontraron en abril ( $86 \text{ cel ml}^{-1}$ ).

### **Bacterias totales**

En la Tabla 5, Figura 11, se muestran las concentraciones de bacterias. En el mes de enero, los valores más bajos se encontraron en la estación 2s y 2f ( $5 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ ) y el más alto se registró en la estación 5 ( $7 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ ), en las estaciones restantes las densidades fueron de  $6 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ . En abril las concentraciones en todas las estaciones fueron en órdenes de magnitud de  $10^6$  y al igual que en el mes anterior (enero), los valores más bajos se encontraron en la estación 2s y 2f ( $2.8 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$  y  $4.2 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$  respectivamente) y los más altos en la estación 5 y 3 ( $7 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ ). En junio, en la estación 4s y 4f, las concentraciones se encontraron en un orden de magnitud más alto  $10^7 \text{ cel ml}^{-1}$  mientras que en las estaciones restantes se registraron concentraciones en órdenes de magnitud iguales a los muestreos anteriores ( $10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ ). En agosto (muestreo 4), se registró la mayor concentración ( $> 10^7 \text{ cel ml}^{-1}$ ). Las más altas se encontraron en la estación 1 y 2h ( $3.8 \times 10^7 \text{ cel ml}^{-1}$  y  $3.4 \times 10^7 \text{ cel ml}^{-1}$  respectivamente) y las más bajas en las estaciones 3 ( $1.4 \times 10^7 \text{ cel ml}^{-1}$ ) y 2f ( $1.5 \times 10^7 \text{ cel ml}^{-1}$ ). En general en la estación 2 en los meses de abril y junio se encontraron los valores más bajos ( $< 5.8 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ ).

### **Nanoflagelados heterótrofos**

Los resultados variaron durante el año (Tabla 5) desde  $90 \text{ cel ml}^{-1}$ , en la estación 3 en

enero, hasta 12000 cel ml<sup>-1</sup>, en la 5 en junio. En el muestreo 1 (enero), se encontraron en órdenes de magnitud, de 10<sup>1</sup> a 10<sup>3</sup> cel ml<sup>-1</sup>, el valor más bajo se localizó en la estación 3 (90 cel ml<sup>-1</sup>). En la estación 2 se puede observar que los valores van disminuyendo conforme aumenta la profundidad desde 290 cel ml<sup>-1</sup> en 2s hasta 170 cel ml<sup>-1</sup> en 2f, por el contrario, en la estación 4, el valor más bajo se encontró en la superficie con 160 cel ml<sup>-1</sup> y en el fondo 400 cel ml<sup>-1</sup>. En la estación 1 fue donde se encontró el número más alto de flagelados con respecto al resto de las estaciones con 1200 cel ml<sup>-1</sup>. En abril, las concentraciones fueron mayores que en enero hasta 4900 cel ml<sup>-1</sup> en la estación 2h y 3300 cel ml<sup>-1</sup> en la 3. En junio los números de flagelados se encontraron en órdenes de hasta 10<sup>4</sup> cel ml<sup>-1</sup>, muy alto con respecto a los muestreos anteriores. El valor más bajo se encontró al igual que en el mes de abril, en la estación 1 (930 cel ml<sup>-1</sup>). En la estación 2, se observó el mismo comportamiento que en el mes de enero, es decir, que el número más alto se encontró en la superficie (5500), disminuyen hacia el fondo (2600 cel ml<sup>-1</sup>), lo mismo sucedió en la estación 4 pero de forma inversa, es decir el valor más bajo en la superficie (4s) con 7900 cel ml<sup>-1</sup> y el más alto en el fondo (4f) con 11000 cel ml<sup>-1</sup>. Los valores más altos (> 10<sup>5</sup> cel ml<sup>-1</sup>) se observaron en junio en la entrada del río, (estación 5) y cerca del fondo (estación 4) con 12000 y 11000 cel ml<sup>-1</sup> respectivamente. Se puede observar una ligera concentración de los flagelados cerca del fondo (estación 4) y en la haloclina estación 2.

## Lago de Alchichica

### Eliminación de *Vibrio cholerae* O1 *in situ*.

En la Tabla 6 y Figura 13 se muestran los resultados de las tasas de eliminación encontradas en el Lago de Alchichica. En febrero (1997) no se observó eliminación en la superficie y el valor más alto (1.3×10<sup>4</sup> cel ml<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) se encontró a 2 discos Secchi (8m), con una tasa de eliminación de 0.4 d<sup>-1</sup>. En mayo los valores más altos se encontraron en la superficie (1.2×10<sup>5</sup> cel ml<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) y una tasa de eliminación de 0.9 d<sup>-1</sup> y a 3m (a un disco Secchi) con 1.5×10<sup>5</sup> cel ml<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y 0.6 d<sup>-1</sup>, a 9 y 20 m de profundidad las bacterias ingeridas estuvieron en un orden de magnitud de 10<sup>4</sup> cel ml<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. En el muestreo 3 en todas las profundidades elegidas (3.5 hasta 21m) las bacterias fueron ingeridas en valores de 10<sup>4</sup> cel ml<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> en donde los más bajos se encontraron en la superficie y a 21m y el más alto a 7 m de profundidad. En el muestreo 4, el número de bacterias ingeridas más alto se encontró en la superficie y a 7 m, en

órdenes de  $10^5$  cel  $ml^{-1}h^{-1}$ ; a 21 m no se observó eliminación

MUESTREO	Profundidad	Bacterias Totales cel $ml^{-1}$	Bacterias Totales ingeridas cel $ml^{-1}h^{-1}$	Eliminación $d^{-1}$	* Flagelados cel $ml^{-1}$	* Ciliados cel $ml^{-1}$
1 FEBRERO (1997)	Superficie	1.3 E6	ND	ND	100	1.1
	1/2 Secchi=2 m	8.2 E <sup>5</sup>	3.9 E3	0.11	120	1.3
	1 Secchi=4 m	9.8 E <sup>5</sup>	7.7 E3	0.19	250	0.5
	2 Secchi=8 m	7.9 E <sup>5</sup>	1.3 E4	0.4	230	0.82
	Promedio	9.7 E <sup>5</sup>	6.2 E3	0.17	175	0.94
2 MAYO (1997)	Superficie	3.4 E6	1.2 E5	0.85	440	1.9
	1 Secchi= 3 m	5.9 E6	1.5 E5	0.62	500	4.3
	2 Secchi= 6 m	2.9 E6	ND	ND	630	7.3
	3 Secchi= 9 m	4.4 E6	3.0 E4	0.16	150	0.25
	20 m	2.4 E6	6.1 E4	0.61	520	0.05
	Promedio	3.8 E6	9.1 E4	0.56	448	2.74
3 AGOSTO (1997)	0.5 Secchi=3.5m	2.8 E6	1.1 E4	0.09		
	1 Secchi= 7 m	3.0 E6	6.4 E4	0.52		
	1.5 Secchi=10 m	2.0 E6	3.6 E4	0.43		
	2 Secchi=14 m	2.1 E6	4.0 E4	0.45		
	3 Secchi=21 m	2.0 E6	2.2 E4	0.26		
	Promedio	2.4 E6	3.4 E4	0.33		
4 ENERO (1998)	Superficie	3.3 E7	3.0 E5	0.22	110	
	1 Secchi= 7 m	2.0 E7	2.3 E5	0.28	140	
	1.5 Secchi=10 m	5.6 E6	3.9 E4	0.17	230	
	2 Secchi=14 m	1.9 E6	1.0 E4	0.13	210	
	3 Secchi=21 m	3.9 E6	ND	0	270	
	Promedio	1.3 E7	1.3 E5	0.16	183	

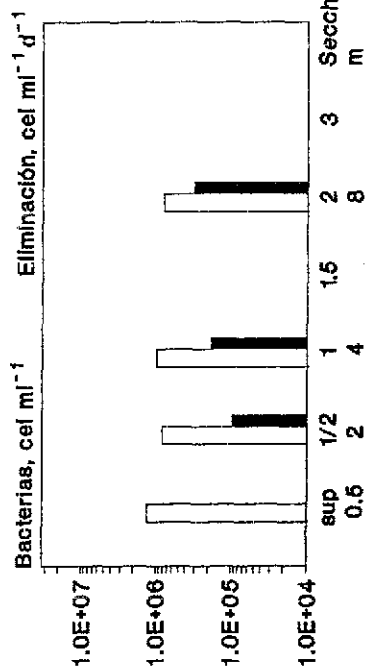
\* Datos proporcionados por Miroslav Macek

ND = No detectada

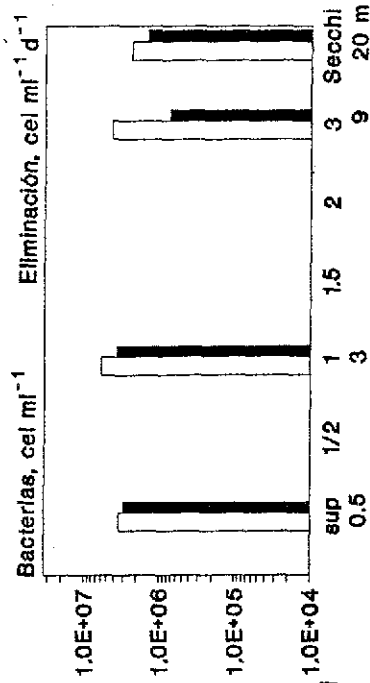
Tabla 6 Tasa de eliminación y parámetros microbiológicos en el Lago de Alchichica



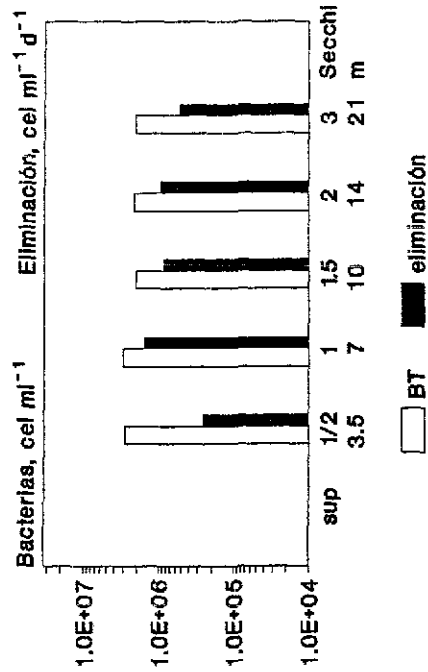
ALCHICHICA  
15-16 de febrero de 1997



ALCHICHICA  
19-20 de mayo de 1997



ALCHICHICA  
28-29 de agosto de 1997



ALCHICHICA  
18-19 de enero de 1998

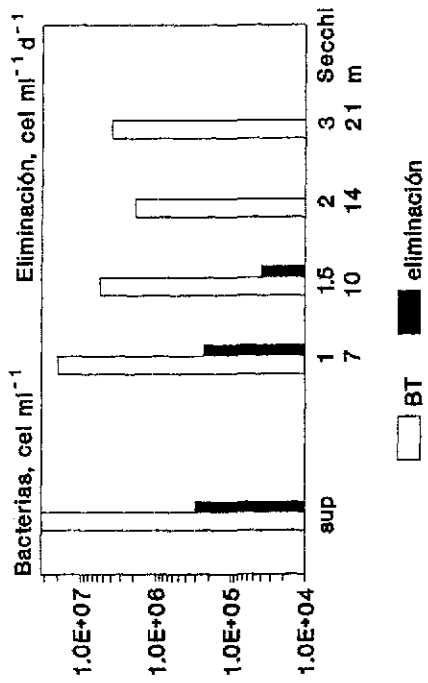


Figura 13. Bacterias totales (BT) y eliminación diaria de bacterias totales en el Lago de Alchichica, Puebla

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Bacterias totales**

La concentración de bacterias totales en las diferentes profundidades elegidas de acuerdo a la profundidad del disco Secchi, se muestran en la Tabla 6 y en la Figura 13. En febrero de 1997, las concentraciones de estas bacterias desde ½ disco Secchi (2 m), hasta 2 discos Secchi (8 m) estuvieron en órdenes de  $10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , sin embargo, en la superficie, el resultado del conteo, muestra un orden de magnitud mayor ( $1.3 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ). En el muestreo de mayo 1997 al igual que los dos siguientes y para todas las profundidades las concentraciones de bacterias fueron  $> 2 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , sin embargo, en la superficie se encontró la concentración más alta de  $3.4 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  y  $5.9 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ . En el muestreo 3, se encontraron en el mismo orden de magnitud ( $10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ) y también los valores más altos se registraron en la superficie ( $2.8 \times 10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ) y a 1 disco Secchi (7m)  $3.0 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , en las otras profundidades, fueron  $< 2.2 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ . En el muestreo 4 las concentraciones en la superficie y a 1 disco Secchi (7 m), fueron en un orden más alto con respecto al resto de las profundidades muestreadas. Comparando los promedios obtenidos en cada uno de los muestreos realizados (Tabla 6), los números más bajos ( $10^5$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ) se encontraron en el muestreo de febrero (1997) y los más altos, hasta  $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$  en enero (1998), mientras que en mayo y agosto (1997), las concentraciones fueron de  $10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ .

## **Ciliados y flagelados**

Los resultados de conteo de flagelados y ciliados (Macek, M., comunicación personal) se muestran en la Tabla 6. En febrero las concentraciones de flagelados fueron menores en la superficie que en el fondo y variaron desde 100 a 250 cel  $\text{ml}^{-1}$ . A diferencia de los flagelados, las mayores concentraciones de ciliados se encontraron hacia la superficie. En mayo, la concentración de protozoos fue mayor que en el muestreo anterior: los flagelados se encontraron hasta concentraciones de 630 cel  $\text{ml}^{-1}$  y los ciliados hasta 73 cel  $\text{ml}^{-1}$ . En enero (1998), los números de flagelados fueron muy parecidos a los encontrados en febrero (1997), en la superficie (110 cel  $\text{ml}^{-1}$ ) y a 10, 14 y 21 m las concentraciones fueron  $> 200$  pero  $< 300$  cel  $\text{ml}^{-1}$ . Comparando los promedios obtenidos en cada uno de los muestreos, se puede observar que en febrero (1997) y enero (1998) los valores fueron muy parecidos 175 y 183 cel  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente. En mayo (1997), se encontraron los valores más altos, tanto de flagelados (448 cel  $\text{ml}^{-1}$ ) como de ciliados (2.7 cel  $\text{ml}^{-1}$ ).

## MICROCOSMOS

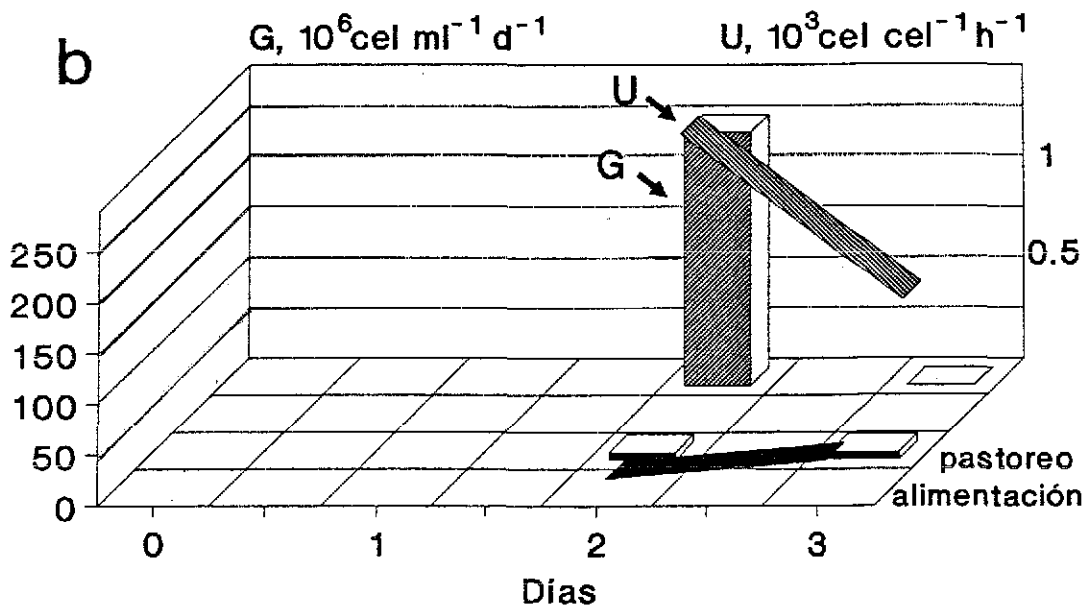
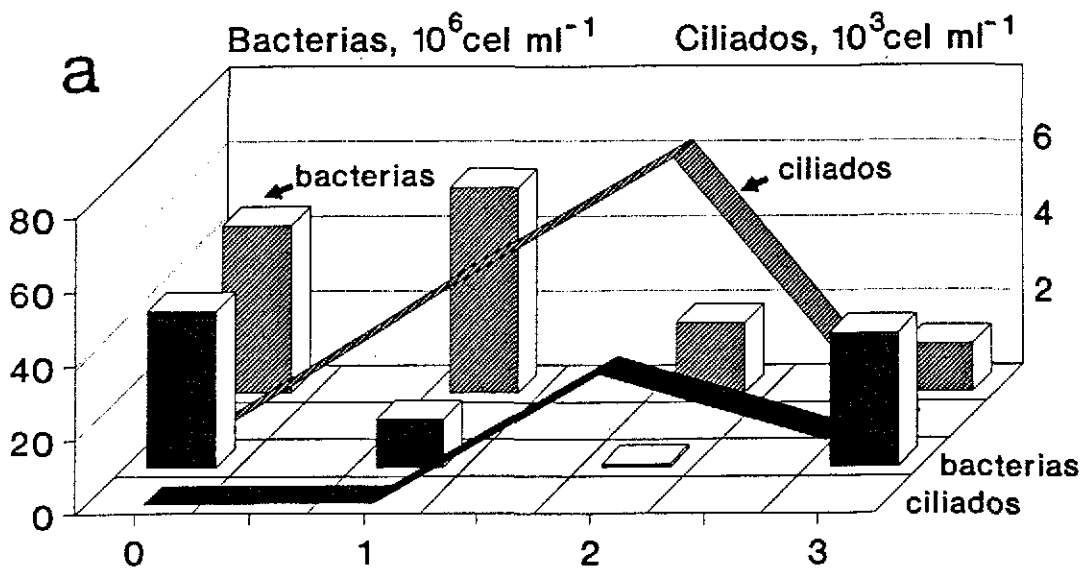
### Ensayo 1

**Tasas de alimentación de *Cyclidium glaucoma* sobre *Vibrio cholerae* O1:** La tasa de alimentación más alta de *C. glaucoma* sobre *V. cholerae* O1 tanto individual (U) con  $1.4 \times 10^3$  cel cel<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> como poblacional (G) con  $2.5 \times 10^8$  cel ml<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> se observó en el sistema con quitina relacionada con una mayor concentración de bacterias (Figura 14b). El valor más alto en estas tasas se encontró en el día 2. Para el día 3, las tasas de alimentación en ambos sistemas bajan notablemente así como la concentración de ciliados cuya máxima concentración se observó en el día 2, (Figura 14a). Se puede observar una relación aparentemente proporcional entre la tasa de alimentación y el crecimiento en el número de *C. glaucoma*.

**Bacterias totales:** En la Figura 15 se muestran las concentraciones de las bacterias totales en los diferentes microcosmos. En los sistemas con *C. glaucoma* y sin quitina la concentración de bacterias disminuye desde el primer día de la inoculación (de  $2 \times 10^7$  a  $1.29 \times 10^7$  cel ml<sup>-1</sup>) aunque posteriormente se observó un crecimiento. Este patrón se puede observar, tanto en el sistema que contiene quitina como en el que carece de ésta. Sin embargo, en el sistema que contiene quitina, la concentración de bacterias y de ciliados fue mayor que en el sistema sin quitina. En el ensayo con protozoos y bacterias de la laguna (agua filtrada por 2.0 µm) las bacterias van disminuyendo en concentración. Las bacterias totales en el microcosmos que contenía *V. cholerae* O1 y quitina, en ausencia de bacterias y depredadores de la laguna (agua filtrada con 0.2 µm), muestra las concentraciones más altas hasta el día uno, pero, disminuye a partir del día 2. En el sistema bajo las mismas condiciones que el anterior pero sin quitina, la concentración de bacterias totales se mantiene constante hasta el final del experimento, la población presenta una menor concentración en el día 1 en comparación con el sistema que contiene quitina, sin embargo, para el día 2 y 3 las concentraciones son más altas que en el sistema con quitina.

### Ensayo 2

**Tasas de alimentación de *Cyclidium glaucoma* sobre *Vibrio cholerae* O1:** La actividad depredadora de *C. glaucoma* sobre *V. cholerae* O1 en sistemas con y sin quitina se puede



sistema con **■** ciliados      **▨** ciliados + quitina

Figura14. Ensayo 1: Con *C. glaucoma* con y sin quitina;  
 a. Bacterias totales (BT) y *C. glaucoma*  
 b. Tasa de alimentación individual (U) y poblacional (G) de *C. glaucoma*

observar en la Figura 16. En el sistema sin quitina en el día 1, la concentración de bacterias totales (BT), disminuye de una población inicial en el día cero de  $5.7 \times 10^7$  a  $2.6 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> para el día 2, debido a la actividad depredadora de *C. glaucoma*, con tasas de alimentación por ciliado (U) de 135 cel cel<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y poblacional (G) de  $1.1 \times 10^7$  cel ml<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> la concentración de *C. glaucoma* se incrementa de  $3.9 \times 10^2$  cel ml<sup>-1</sup> a  $3.5 \times 10^3$  cel ml<sup>-1</sup>. Al disminuir estas tasas de alimentación, se observa una recuperación en el crecimiento de las bacterias hasta alcanzar nuevamente, concentraciones en el orden encontrado al inicio del experimento ( $10^7$  cel ml<sup>-1</sup>). En el sistema con quitina, las concentraciones de bacterias se mantuvieron en el mismo orden de magnitud desde el inicio del experimento ( $10^7$  cel ml<sup>-1</sup>), a pesar de que en el primer día tuvo una caída. La actividad depredadora de *C. glaucoma* mostró una tasa de alimentación por ciliado (U) de  $1.3 \times 10^3$  cel cel<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y poblacional (G) de  $3.1 \times 10^7$  cel ml<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

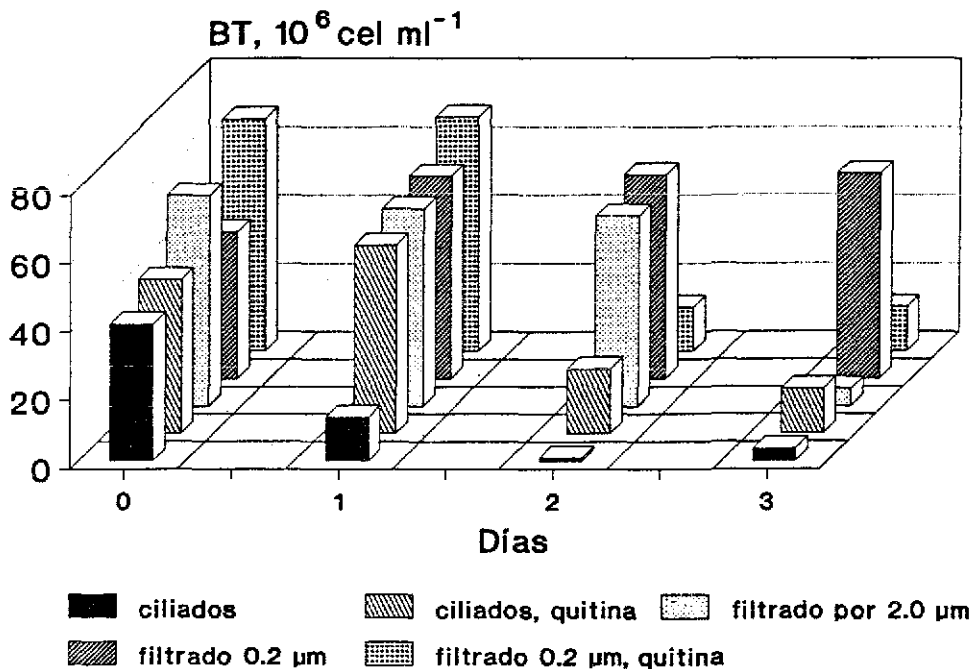


Figura 15. Ensayo 1: Bacterias totales (BT, cel ml<sup>-1</sup>).

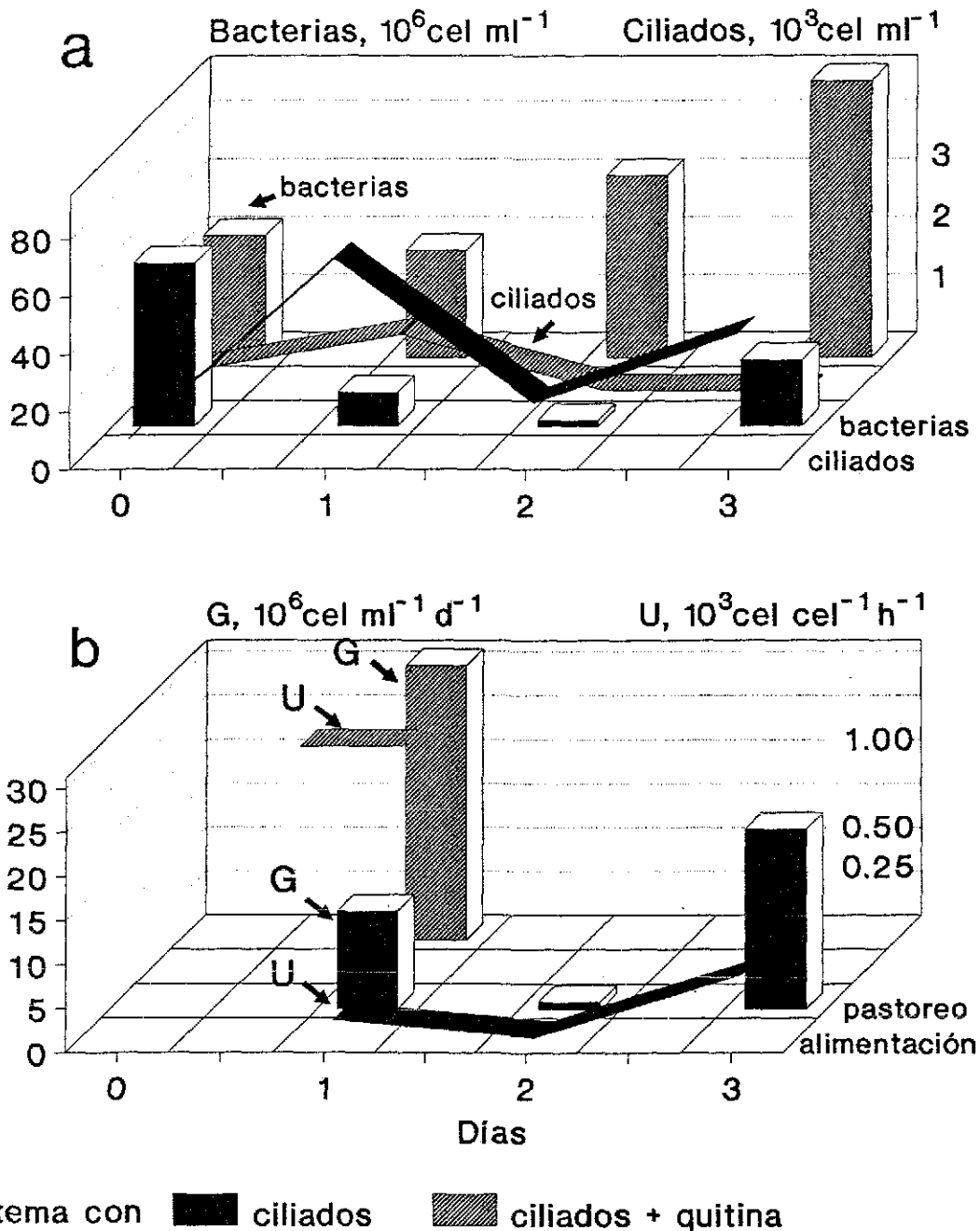


Figura 16. Ensayo 2 Con ciliados en presencia y ausencia de quitina  
a. Bacterias totales y *C. glaucoma* ( $\text{cel ml}^{-1}$ )  
b. Tasa de alimentación individual (U) y poblacional (G) de *C. glaucoma*

**Bacterias totales, número directo de *Vibrio cholerae* O1 (IFA) y cultivable (TCBS):**

Las concentraciones de las bacterias cuantificadas bajo diferentes condiciones en los microcosmos (Tabla 3), se muestran en la Figura 17. Las bacterias totales (BT) siguieron el mismo comportamiento que las encontradas en el ensayo 1 en los sistemas con ciliados con y sin quitina. El crecimiento de las bacterias totales en el microcosmos con quitina, a pesar de la presencia de ciliados, fue mayor manteniendo sus concentraciones en órdenes de  $10^7$  cel ml<sup>-1</sup> (Figura 16a), sin embargo, en el sistema sin quitina, las concentraciones de las bacterias disminuyen en un orden, de  $5.7 \times 10^7$  cel ml<sup>-1</sup> a  $2.1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>. En el sistema filtrado con 2  $\mu$ m, (con la microbiota de la laguna), las concentraciones fueron más altas al inicio del experimento, disminuyendo de  $1.2 \times 10^8$  cel ml<sup>-1</sup> hasta dos órdenes de magnitud menos ( $10^6$  cel ml<sup>-1</sup>), sin embargo, en el día 3 se observó una recuperación, incrementándose hasta  $10^7$  cel ml<sup>-1</sup>.

Los números directos de *V. cholerae* O1 (IFA) y cultivable en medio TCBS (Figura 17), en estos mismos sistemas, presentan el mismo comportamiento de las bacterias totales, es decir, las concentraciones más altas se encontraron en el sistema que contenía quitina en donde los *V. cholerae* O1 tanto cultivables (TCBS) como inmunopositivos (IFA) en general, conservan concentraciones en el mismo orden de magnitud que al inicio del experimento, mientras que en el microcosmos sin quitina, *V. cholerae* O1 cultivable baja hasta dos órdenes de magnitud y *V. cholerae* O1 (IFA) baja en un orden al finalizar el experimento. Durante este ensayo se observó la presencia de flagelados.

**Ensayo 3**

**Bacterias totales, número directo de *V. cholerae* O1 (IFA) y cultivable (TCBS) y de *Salmonella typhimurium* cultivable (XLD):** En la Figura 18a se muestran las concentraciones de las bacterias totales, *V. cholerae* O1 inmunopositivos (IFA) y de *V. cholerae* O1 cultivable (TCBS), en el sistema con cultivo de *V. cholerae* O1 y en la Figura 18b las de *S. typhimurium* cultivable en medio XLD en el sistema con cultivo de *S. typhimurium* y de ciliados y flagelados.

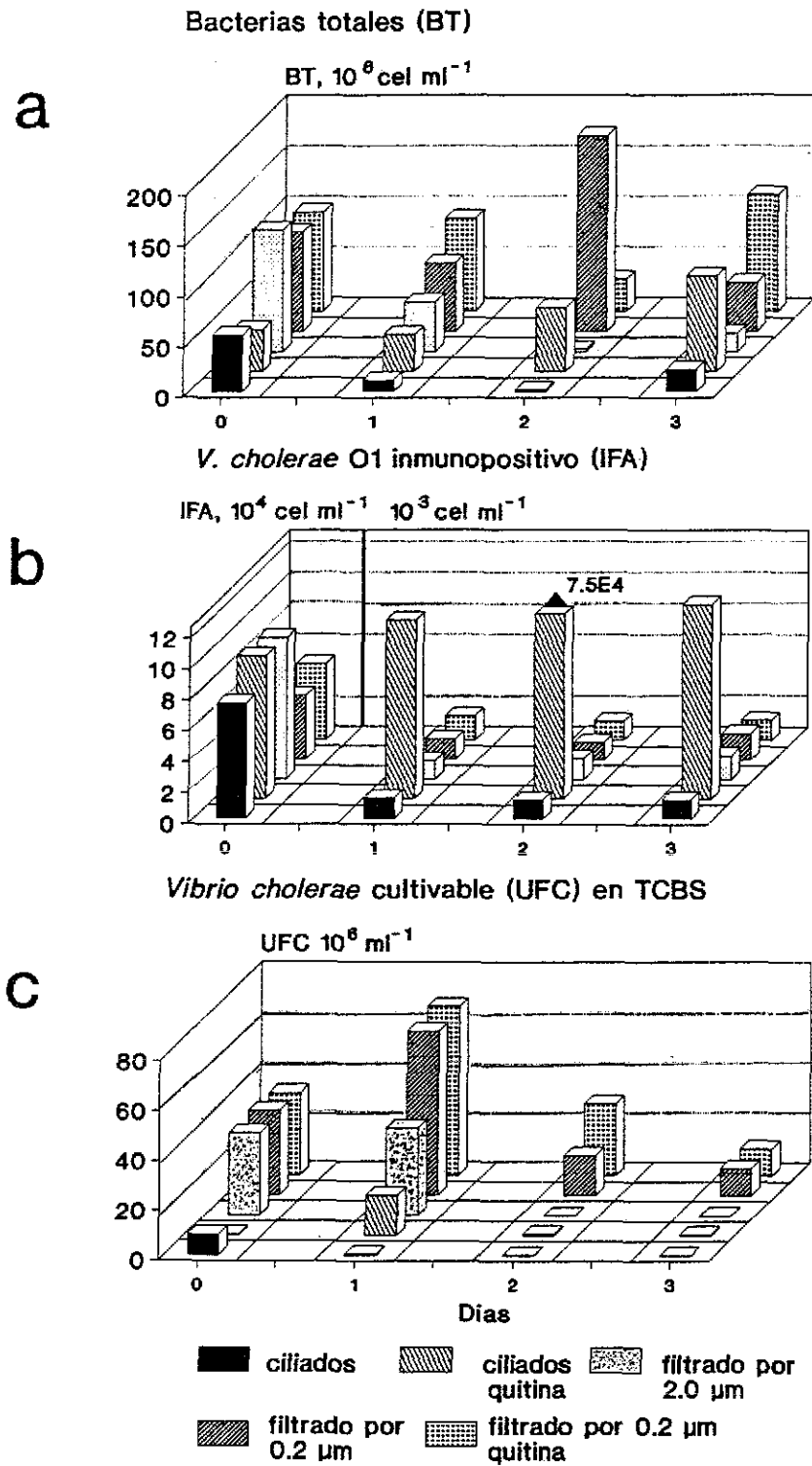


Figura 17.

Ensayo 2: a. Bacterias totales (BT,  $\text{cel ml}^{-1}$ ); b. *V. cholerae* O1 (IFA,  $\text{cel ml}^{-1}$ ); c. *V. cholerae* cultivable (TCBS,  $\text{UFC ml}^{-1}$ ).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



Las bacterias totales en el microcosmos con cultivo de *V. cholerae* O1 y en el sistema con *S. typhimurium* se mantuvo en concentraciones de  $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , sin embargo, en el sistema con *V. cholerae* O1 el conteo de bacterias totales (BT) -que en este caso corresponden a *V. cholerae*- disminuyen paulatinamente con el paso de los días del experimento y para el día 3 baja en un orden de hasta  $10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ . En el microcosmos con *S. typhimurium*, el conteo de las bacterias totales fue siempre mayor que en el microcosmos con *V. cholerae* O1. Por otro lado las bacterias de *S. typhimurium* cultivable en medio selectivo XLD siempre se mantuvieron en órdenes de  $10^5$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , En los primeros días (0 y 1) en ambos microcosmos las bacterias cultivables (*S. typhimurium* y *V. cholerae* O1) presentaron concentraciones parecidas. Sin embargo, para el día 2 y 3 las bacterias cultivables de *S. typhimurium* disminuyeron hasta un orden de magnitud menor. Hay que mencionar que *S. typhimurium* no creció sobre medio selectivo XLD en 24 h de incubación, por lo cual fue necesario dejarlos por 24 h más; después de este tiempo fue posible cuantificarlas.

En el microcosmos con cultivo de *V. cholerae* O1 las concentraciones, de *V. cholerae* O1 cultivable (TCBS) disminuyen (conforme las concentraciones de ciliados aumentan) en un orden de magnitud cada día, iniciando en el día cero con  $1.4 \times 10^5$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  y finalizando (día 3) con  $6.0 \times 10^2$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ . Sin embargo, la concentración de *V. cholerae* O1, (IFA) aumentó, iniciando con  $1.4 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  (día cero) y terminando con  $3.1 \times 10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$  al finalizar el experimento

En ambos sistemas se observó la presencia de flagelados provenientes del cultivo de *C. glaucoma* que se adicionó y cuyas concentraciones se muestran en la Figura 18.

#### Ensayo 4

**Tasas de alimentación de *C. glaucoma* sobre *V. cholerae* O1:** En las Figuras 19 y 20 se muestran los resultados obtenidos del comportamiento de la microbiota y sus tasas de alimentación: (U) y de pastoreo (G) de 2 microcosmos, uno con bacterias de la laguna (1.2  $\mu\text{m}$ ) otro únicamente con *V. cholerae* O1 (0.2  $\mu\text{m}$ ). En ambos sistemas las bacterias totales mantuvieron órdenes de  $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$  y las concentraciones de *C. glaucoma*, muy bajas, en el día cero con 12 cel  $\text{ml}^{-1}$  y en el día 3 con 4 cel  $\text{ml}^{-1}$ . La tasa de alimentación por ciliado (U) fue

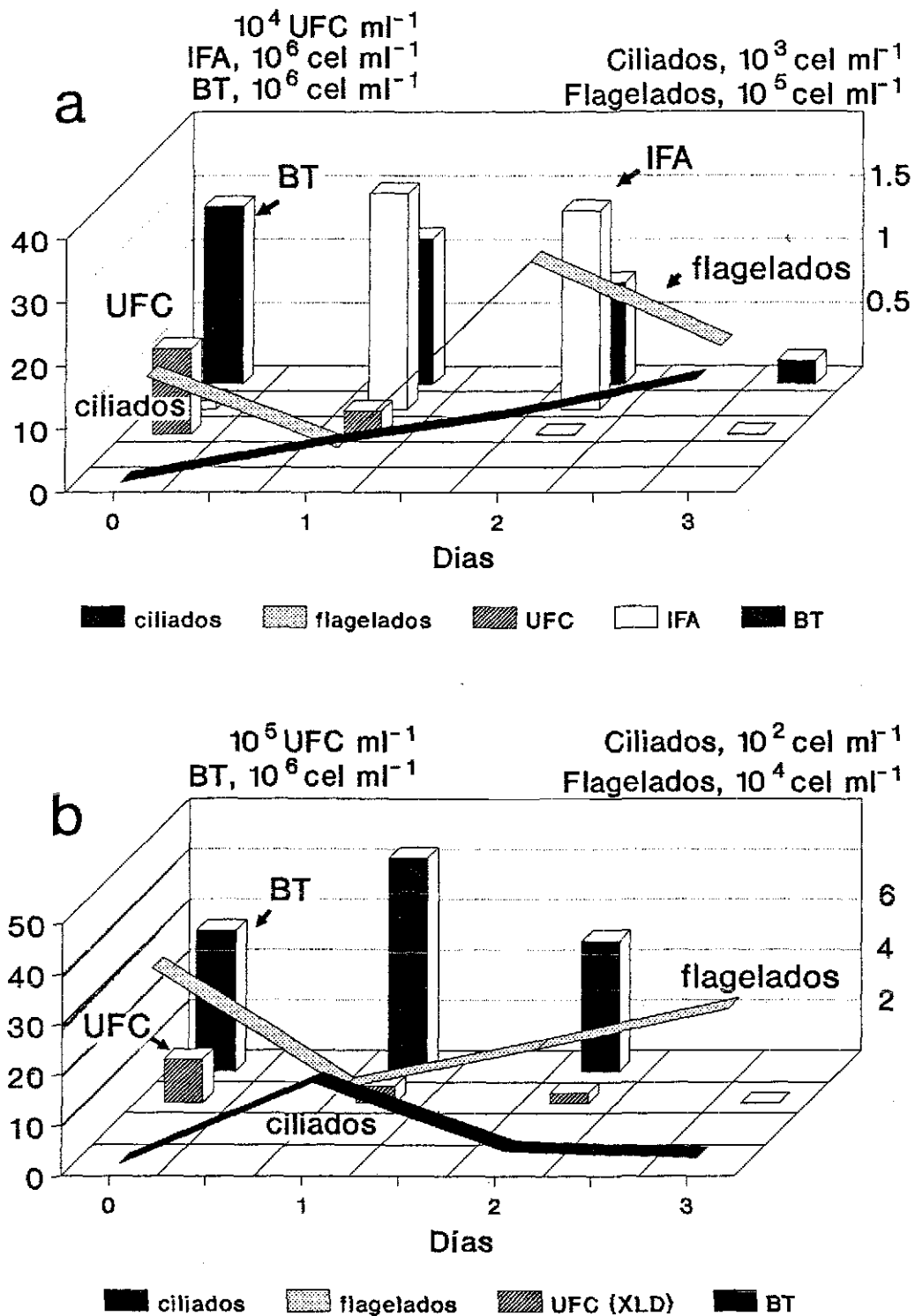


Figura 18. **Ensayo 3: a. Con *V. cholerae*:** Bacterias totales (BT,  $\text{cel ml}^{-1}$ ), *V. cholerae* O1 (IFA,  $\text{cel ml}^{-1}$ ), *V. cholerae* cultivable (TCBS,  $\text{UFC ml}^{-1}$ ), flagelados ( $\text{cel ml}^{-1}$ ) y *C. glaucoma* ( $\text{cel ml}^{-1}$ ); **b. Con *S. typhimurium*:** Bacterias totales (BT,  $\text{cel ml}^{-1}$ ), *S. typhimurium* cultivable (XLD,  $\text{UFC ml}^{-1}$ ), flagelados ( $\text{cel ml}^{-1}$ ) y *C. glaucoma* ( $\text{cel ml}^{-1}$ )

día cero con  $12 \text{ cel ml}^{-1}$  y en el día 3 con  $4 \text{ cel ml}^{-1}$ . La tasa de alimentación por ciliado (U) fue de  $300 \text{ cel cel}^{-1}\text{h}^{-1}$  disminuyendo para el día 3 con una tasa de pastoreo poblacional (G) de  $1.8 \times 10^5 \text{ cel ml}^{-1}\text{d}^{-1}$ , por esta razón las bacterias totales no fueron eliminadas. Por otro lado en el sistema con bacterias de la laguna ( $1.2 \mu\text{m}$ ) desde el inicio del experimento las concentraciones de *C. glaucoma*, fueron más altas de 35 hasta  $170 \text{ cel ml}^{-1}$ , por lo que las tasas de alimentación (U) fueron de  $700 \text{ cel ml}^{-1}$  y la de pastoreo (G) de  $1.3 \times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$ , así, la población de *C. glaucoma* aumentó en densidad, aunque no tuvo las concentraciones suficientes, para que a pesar de estas tasas de alimentación, pudieran eliminar a las bacterias presentes.

**Bacterias totales, número directo de *V. cholerae* O1 (IFA) y cultivable (TCBS):** En las Figura 20 y 21 se muestran las concentraciones de las bacterias cuantificadas en los microcosmos con diferentes características (Tabla 3). Las concentraciones de bacterias totales (BT) se mantuvieron en órdenes de magnitud de  $10^7 \text{ cel ml}^{-1}$ , las de *V. cholerae* O1 cultivable (TCBS), en los dos primeros días fueron en órdenes de  $10^7 \text{ UFC ml}^{-1}$ , en los sistemas con *C. glaucoma*, las concentraciones bajaron hasta  $10^1 \text{ UFC ml}^{-1}$  mientras que en ausencia de este ciliado disminuyeron sólo a órdenes de  $10^3 \text{ UFC ml}^{-1}$ . Las concentraciones de *V. cholerae* O1 inmunopositivo (IFA) en los sistemas con cultivo de *C. glaucoma* se encontraron en órdenes de  $10^3 \text{ cel ml}^{-1}$ , mientras que en ausencia de *C. glaucoma*, bajaron hasta órdenes de  $10^2 \text{ cel ml}^{-1}$ .

## Ensayo 5

**Tasas de alimentación de *C. glaucoma* sobre *V. cholerae* O1:** En la Figura 22, se muestran las concentraciones de bacterias totales (BT), de *C. glaucoma* y de las tasas de alimentación individual (U) y de pastoreo poblacional (G) en dos diferentes microcosmos: con y sin quitina. Las concentraciones de bacterias se conservaron en el mismo orden de magnitud ( $10^7 \text{ cel ml}^{-1}$ ), sin embargo, en presencia de quitina, las concentraciones al final del experimento son mayores que en ausencia de ésta. Estos resultados fueron los encontrados en los ensayos anteriores en microcosmos con las mismas características.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

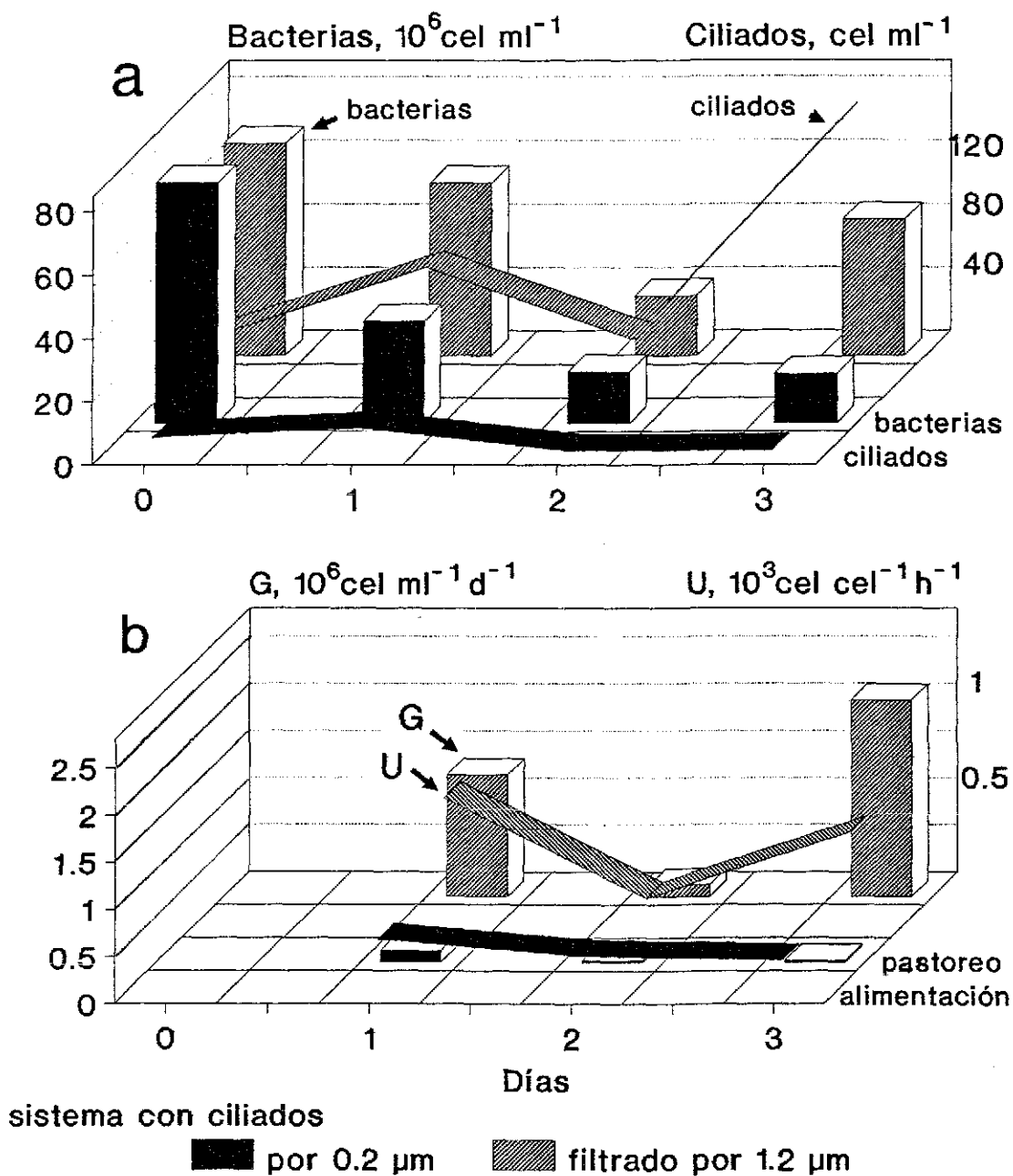


Figura 19. Ensayo 4: Con ciliados en el agua filtrada por  $0.2 \mu\text{m}$  y por  $1.2 \mu\text{m}$   
a. Bacterias totales (BT,  $\text{cel ml}^{-1}$ ) y *C. glaucoma* ( $\text{cel ml}^{-1}$ )  
b. Tasa de alimentación individual (U) y poblacional (G) de *C. glaucoma*

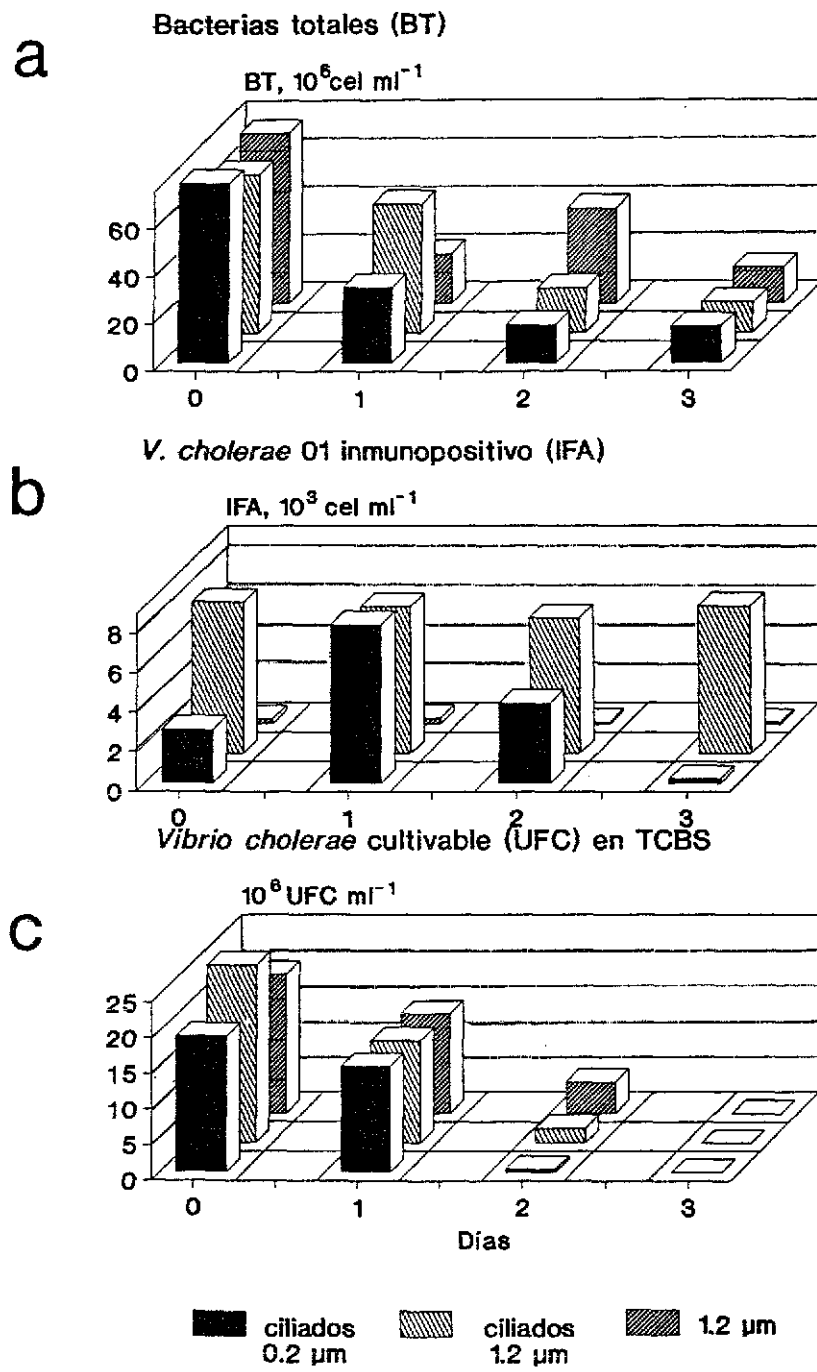


Figura 20. Ensayo 4: a. Bacterias totales (BT,  $\text{cel ml}^{-1}$ ); b. *V. cholerae* O1 (IFA,  $\text{cel ml}^{-1}$ ); c. *V. cholerae* cultivable (TCBS,  $\text{UFC ml}^{-1}$ ).

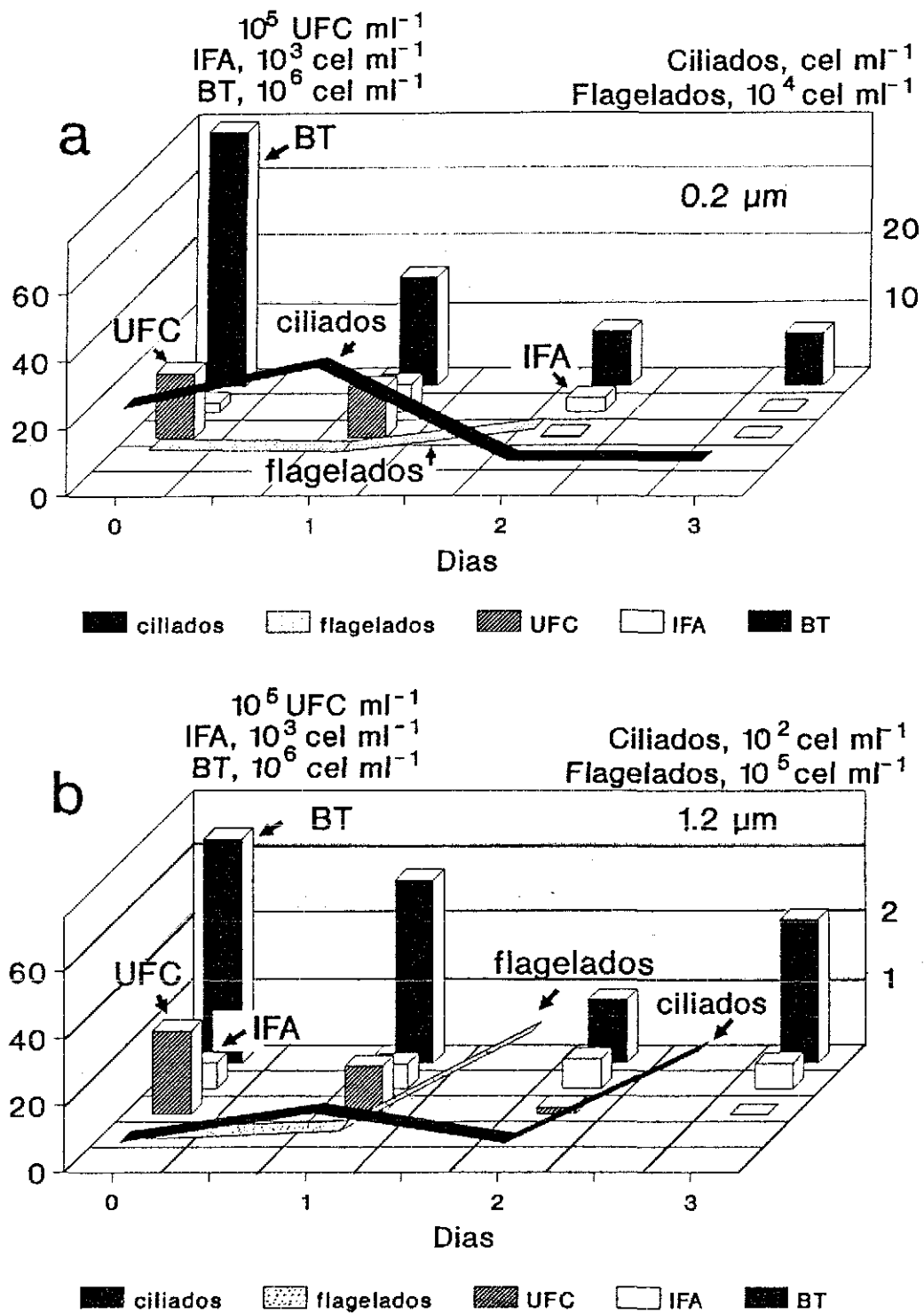


Figura 21. Ensayo 4: Con ciliados en el agua filtrada: a. Por 0.2 µm y b. por 1.2 µm. Bacterias totales (BT, cel ml<sup>-1</sup>), *V. cholerae* O1 (IFA, cel ml<sup>-1</sup>), cultivable (TCBS, UFC ml<sup>-1</sup>), flagelados y *C. glaucoma* (cel ml<sup>-1</sup>).

**Bacterias totales, número directo de *V. cholerae* O1 (IFA) y cultivable (TCBS):** En las Figuras 23 y 24 se muestra el comportamiento de los microorganismos cuantificados en los diferentes microcosmos (Tabla 3). Las concentraciones de las bacterias totales en todos los microcosmos se mantuvieron en órdenes de  $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , sin embargo, en el que contenía bacterias de la laguna y quitina ( $1.2 \mu\text{m}$ ) fueron mayores ( $10^8$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ). En el sistema únicamente con *V. cholerae* O1 ( $0.2 \mu\text{m}$ ) y quitina, durante los días cero y uno, las concentraciones de bacterias totales (BT) y de *V. cholerae* O1 cultivable (TCBS), se encontraron en el mismo orden ( $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ), para los siguientes días baja hasta  $10^4$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , mientras las concentraciones de *V. cholerae* O1 (IFA) siempre se mantuvieron en órdenes de  $10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  (Figura 24 a y b).

#### **Análisis de tamaño de bacterias totales y de *V. cholerae* O1 teñido (FLB)**

En la Figura 25 se muestra el tamaño de las bacterias totales y de *V. cholerae* O1 marcado con fluorescencia (FLB). En el microcosmos que contenía agua de la laguna de Mecoaacán con la microbiota natural (agua filtrada por  $2 \mu\text{m}$ ) el tamaño de la mayoría de las bacterias se encuentra entre  $0.8 \mu\text{m}$  y  $1.0 \mu\text{m}$ , la población de bacterias aumenta en tamaño en el segundo día, ( $1.0 \mu\text{m}$  y  $1.2 \mu\text{m}$ ). En el microcosmos únicamente con *V. cholerae* O1 ( $0.2 \mu\text{m}$ ) con la adición de quitina, la mayoría de las bacterias presentaron un tamaño de entre  $1.0 \mu\text{m}$  -  $1.2 \mu\text{m}$  y quizás debido a que no están expuestas a ningún tipo de estrés las células de *V. cholerae* O1 conservan su tamaño hasta finales del experimento. Las bacterias de *V. cholerae* O1, en presencia de ciliados y con quitina, al inicio del experimento (día 1), presentaron un tamaño ( $0.8 \mu\text{m}$  a  $0.9 \mu\text{m}$ ), para el día 2 la mayor parte de las bacterias mantuvieron el mismo tamaño y las concentraciones de éstas fueron mayores que en el microcosmos sin quitina. En el microcosmos con ciliados sin quitina la mayoría de las bacterias en el primer día del experimento presentan un tamaño de  $0.9 \mu\text{m}$  a  $1.0 \mu\text{m}$  para el día 2 disminuyen de  $1.0 \mu\text{m}$  hasta  $0.6 \mu\text{m}$ . Las bacterias de *V. cholerae* O1 teñidas (FLB), marcadas usadas en los experimentos para medir las tasas de alimentación tanto ambientales como en los microcosmos, presentaron un tamaño de  $0.6 \mu\text{m}$  en su mayoría, con variaciones entre  $0.5 \mu\text{m}$  a  $0.8 \mu\text{m}$ , con un tamaño, dentro del intervalo de las bacterias que se inocularon en cada microcosmos, para permitir que las bacterias marcadas (FLB) tuvieran la misma oportunidad que las bacterias vivas, de ser ingeridas.

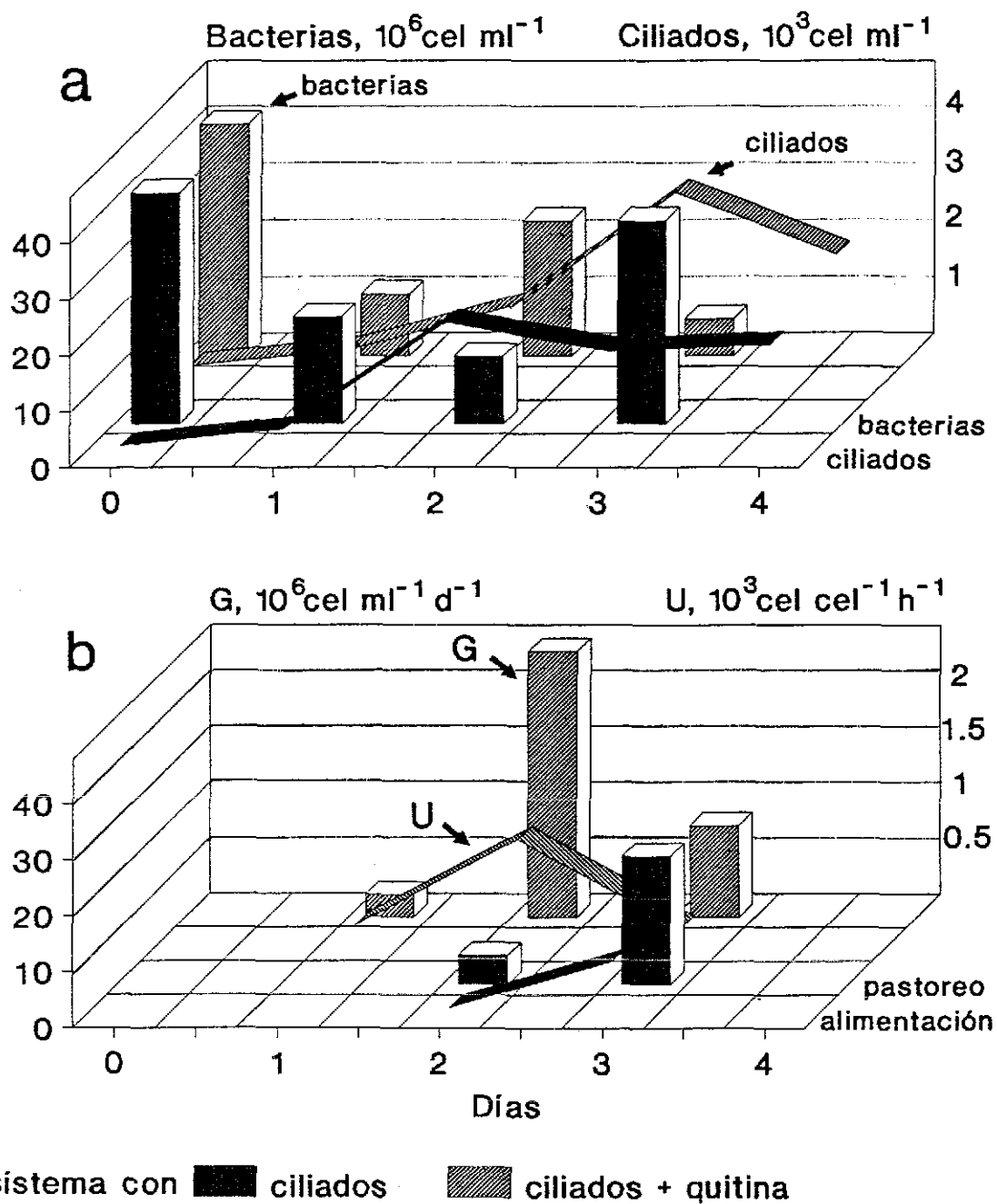


Figura 22. Ensayo 5: Con ciliados, con y sin quitina  
 a. Bacterias totales y *C. glaucoma* ( $\text{cel ml}^{-1}$ )  
 b. Tasa de alimentación individual (U) y poblacional (G) de *C. glaucoma*



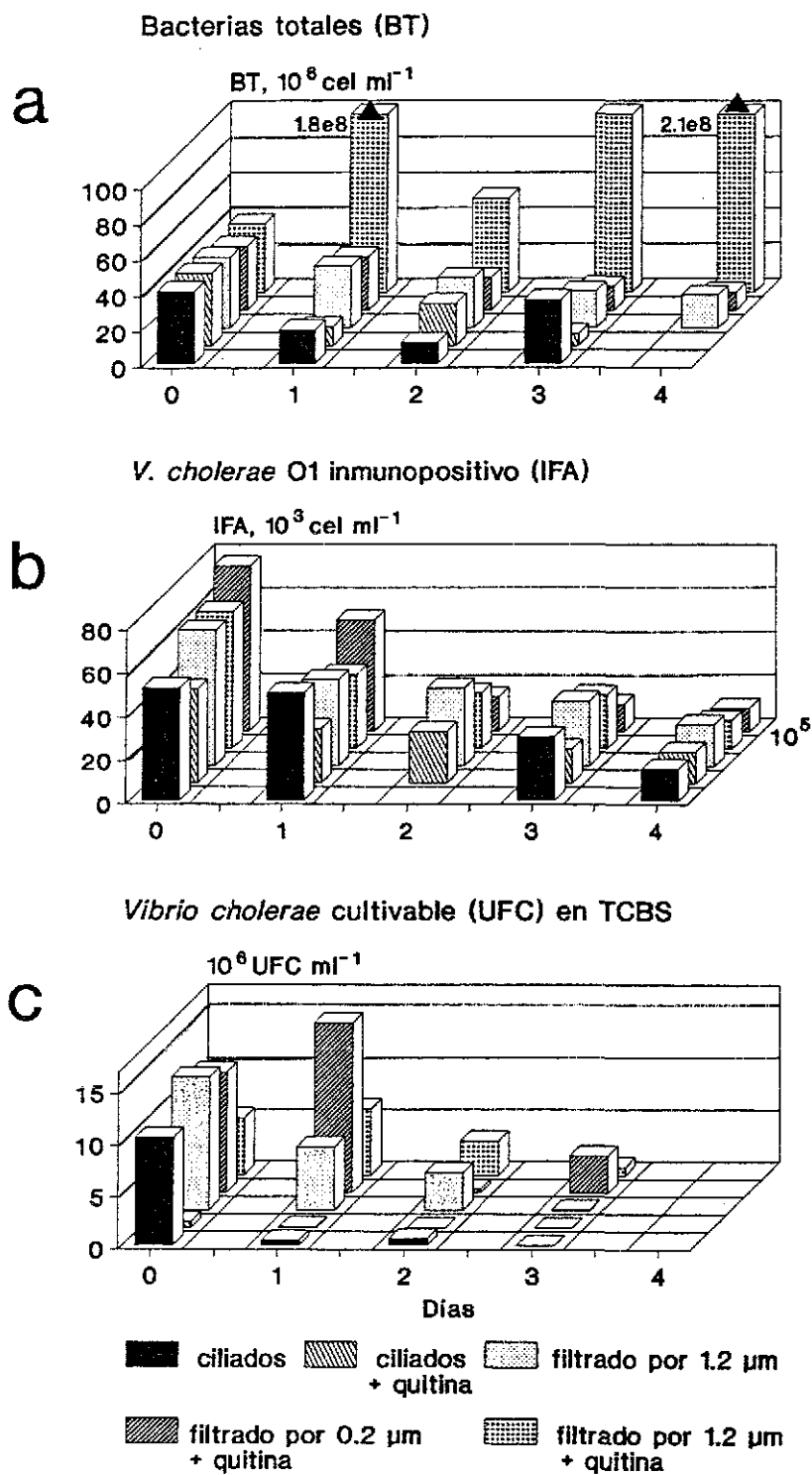


Figura 23. Ensayo 5: a. Bacterias totales (BT,  $\text{cel ml}^{-1}$ ); b. *V. cholerae* O1 (IFA,  $\text{cel ml}^{-1}$ ); c. *V. cholerae* cultivable (TCBS,  $\text{UFC ml}^{-1}$ ).

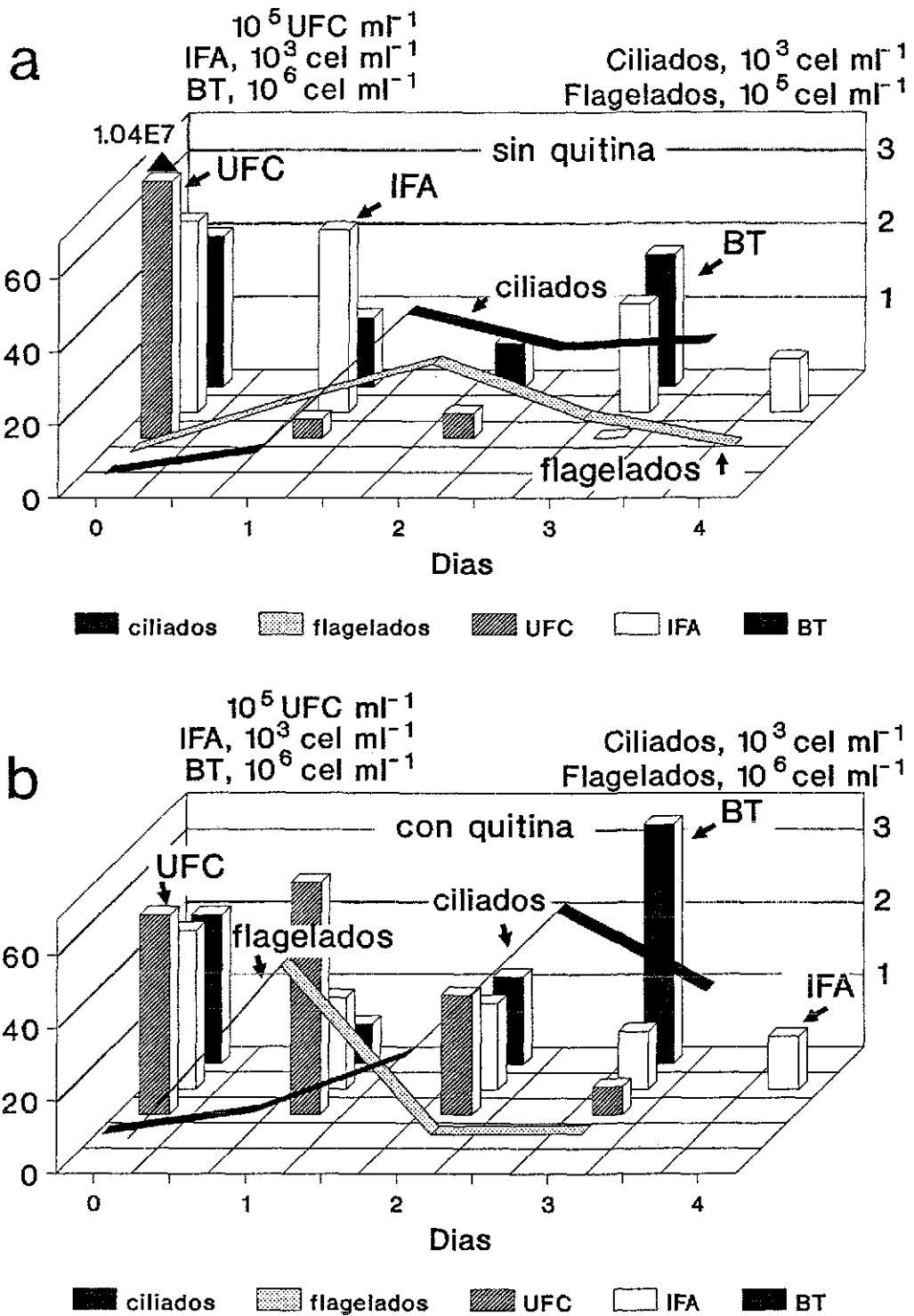


Figura 24. Ensayo 5: Con ciliados a. con quitina y b. sin quitina  
 Bacterias totales (BT), *V. cholerae* O1 (IFA), cultivable (TCBS, UFC ml<sup>-1</sup>), flagelados y *C. glaucoma* (cel ml<sup>-1</sup>).

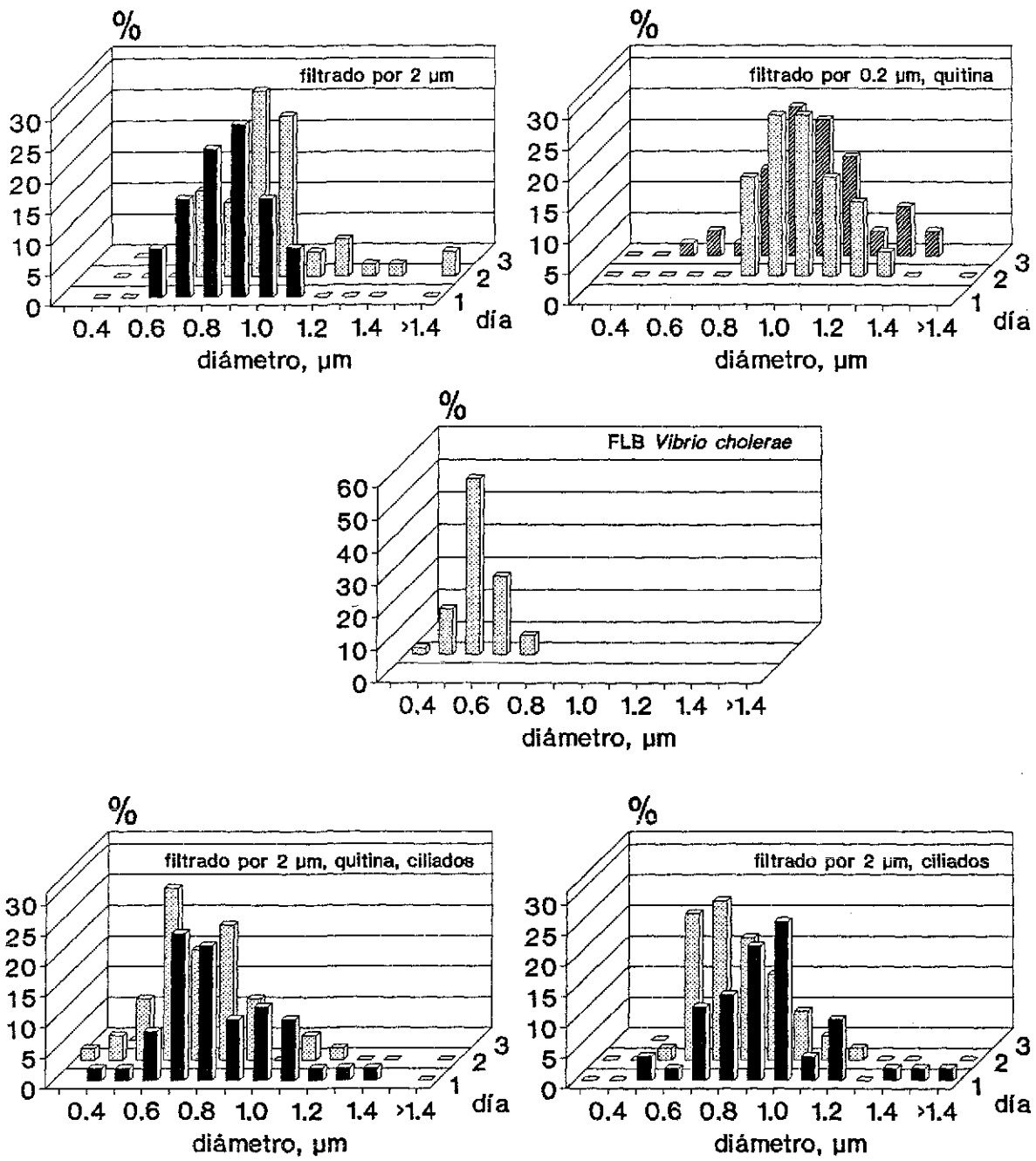


Figura 25. Distribución de volumen bacteriano (diámetro equivalente esférico, ESD,  $\mu\text{m}$ ) en diferentes microcosmos y de *V. cholerae* teñido (FLB).

## DISCUSIÓN

### Limnología de la Laguna de Mecocacán

Durante el periodo de estudio la Laguna de Mecocacán mostró parámetros fisicoquímicos diferentes de acuerdo a la localización de las estaciones. La poca profundidad de la laguna y el viento permanente en el lugar no permitieron la formación de una estratificación en la columna de agua por la temperatura. Sin embargo, se observó una bien definida haloclina en la estación 2 como consecuencia de la entrada del agua del mar originada por la marea. El promedio anual en salinidad, fue menor al reportado por Cortés *et al.* (2000) Tabla 7, esto se puede explicar a que en este estudio se consideraron, los valores bajos de la estación 5 debido a la entrada de agua dulce proveniente del río Escarbado (estación no incluida en Cortés *et al.* 2000). El promedio anual de oxígeno disuelto también fue menor, esto, podría ser ocasionado por la sobresaturación de oxígeno debido a la fotosíntesis del florecimiento del fitoplancton que se observó durante el estudio realizado por Cortés y colaboradores. El pH tuvo valores muy parecidos a los reportados por Cortés *et al.* (2000).

PARÁMETRO	Cortés <i>et al.</i> (2000) 1994 - 1995		Presente trabajo 1997	
	Promedio	Intervalo	Promedio	Intervalo
pH	8.3	7.13 - 8.74	8.3	7.2 - 8.9
Salinidad, ‰	21.7	1.0 - 40	20.2	3 - 34
O. D, mg l <sup>-1</sup>	7.2	3.8 - 12	5.1	2.6 - 7.6
Temperatura, °C	28.5	23.3 - 33	27.6	22.5 - 32
Porcentajes de <i>Vibrio</i> spp aislados				
<i>Vibrio</i> spp. Aislados con el uso de hisopos de Moore	<i>V. cholerae</i> O1	33.9 %	<i>V. cholerae</i> O1	No detectado
	<i>V. cholerae</i> No O1	No detectado	<i>V. cholerae</i> No O1	38.5 %
	<i>V. alginolyticus</i>	13.56 %	<i>V. alginolyticus</i>	15.4 %
	<i>V. fluvialis</i>	15.25 %	<i>V. fluvialis</i>	5 %
	<i>V. vulnificus</i>	No detectado	<i>V. vulnificus</i>	5%
	<i>V. mimicus</i>	10.17 %	<i>V. mimicus</i>	No detectado
	<i>V. parahaemolyticus</i>	11.86 %	<i>V. parahaemolyticus</i>	36 %

Tabla 7. Comparación de datos obtenidos en la Laguna de Mecocacán en el presente trabajo y los reportados por Cortés *et al.* (2000).

Los resultados obtenidos de un análisis de conglomerados realizado con los parámetros fisicoquímicos (Figura 26), muestran que las estaciones 1, 2 y 3, presentan características muy parecidas en los parámetros debido a que son las estaciones cercanas a la desembocadura al mar, la estación 4 se consideró como la parte del cuerpo de agua que está mezclado y que refleja las características de la Laguna como tal. La estación 5 es diferente a las otras por estar localizada en la entrada del Río Escarbado donde el agua dulce de este río, se mezcla con el agua salobre de la laguna, originando a su vez valores bajos en salinidad (Tabla 4).

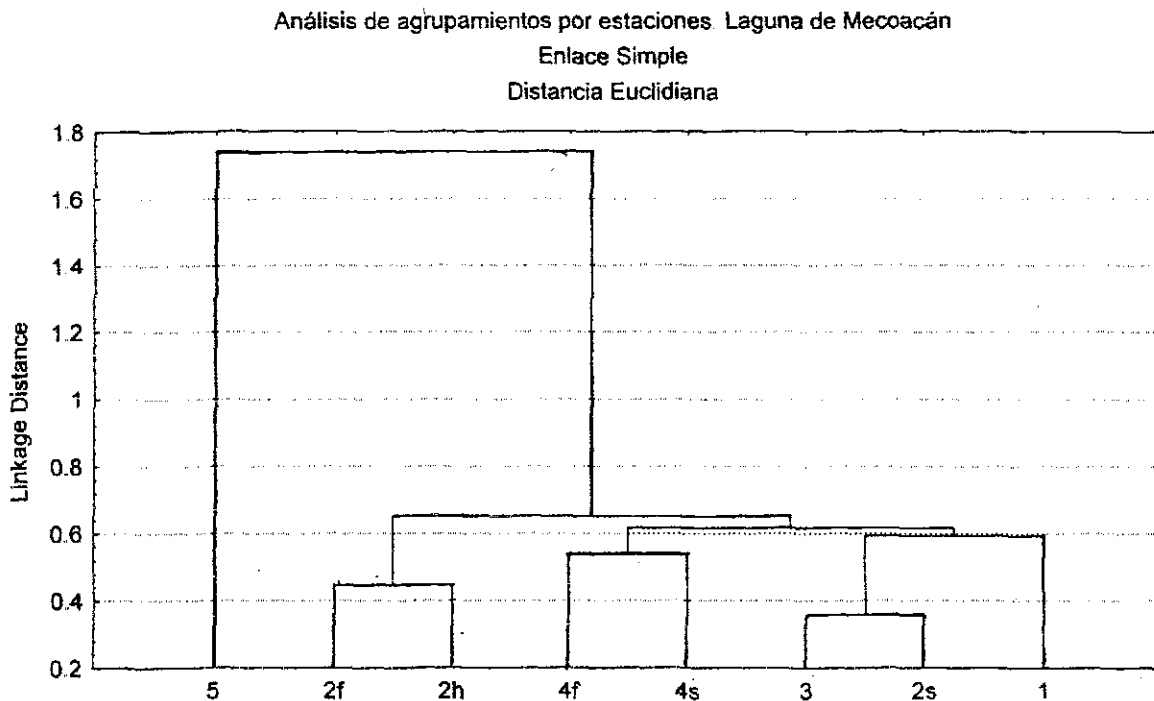


Figura 26. Análisis de conglomerados de las estaciones en la Laguna de Mecocacán, basado en los parámetros fisicoquímicos.

### Actividad depredadora; tasas de eliminación de bacterias

La eliminación de *V. cholerae* O1 teñida (FLB) encontrada *in situ* es comparable con datos obtenidos con el uso de otras bacterias (e.g., Šimek *et al.* 1995)

Entre las estaciones seleccionadas existen similitudes en los valores de sus tasas de eliminación de bacterias por día, sin embargo, entre cada muestreo se encontraron diferencias significativas debido a que en la estación 2 se encontró una tasa mayor (Tabla 8). Los promedios obtenidos en las tasas de eliminación de bacterias por día muestran que en enero y agosto se encontraron los valores más bajos con  $0.2 \text{ d}^{-1}$  y  $0.5 \text{ d}^{-1}$  respectivamente (Tabla 5). En enero, probablemente por la presencia de sedimento que pudo provocar la floculación de las bacterias (Vanoy *et al.* 1992) pues se observaron células pegadas a partículas (Figura 6 b derecha), lo que impidió la ingestión de estas bacterias por bacterívoros presentes en la Laguna (Šimek *et al.* 1995; Macek *et al.* 1997). En agosto las fuertes lluvias provocaron una alta entrada de agua del río, por lo que es probable que llegaran a la laguna altas densidades de microorganismos alóctonos fecales, lo que provocó un desbalance en la dinámica microbiana (Iriberry 1994) que probablemente a su vez, cambió la composición del plancton en forma espacial y temporal y por lo tanto, a pesar de que se encontró el número más alto de bacterias, no se encontró una mayor eliminación (Tabla 5).

En la estación 2 se encontraron las tasas de eliminación más altas, sin embargo, no se podría asegurar que haya sido ocasionada en su totalidad, por la actividad bacterívora de los protozoos presentes en la Laguna de Mecoacán, puesto que no se encontró diferencias en las concentraciones de flagelados en las diferentes estaciones ni entre los meses de muestreo (Tabla 8).

Es probable que en la eliminación de bacterias influya más la composición de microorganismos presentes en la Laguna, que su concentración

La correlación observada entre la tasa de eliminación de bacterias, la clorofila y la abundancia de flagelados (Tabla 9) muestra que las bacterias se encuentran asociadas al fitoplancton, probablemente utilizado como reservorio o bien como fuente de alimento, por lo que los protozoos bacterívoros se encuentran a su vez en mayor abundancia en lugares con mayores cantidades de clorofila. En casi todos sitios de muestreo, la bacterivoría pudo teóricamente eliminar todas las células de bacterias del tamaño de *V. cholerae* O1 durante un

día. Siempre hubo disminución en la densidad de las bacterias de *V. cholerae* O1 teñidas (FLB). La disminución de bacterias teñidas (FLB) en presencia de la microbiota natural puede ser solo el resultado de depredación por bacterívoros.

ANÁLISIS	Entre Estaciones			Entre muestreos		
	F	(P)	Diferencia significativa	F	(P)	Diferencia significativa
<b>DAPI</b>	0.183 2.43	0.986	No	27.336 2.95	0.000	Si * 4 (alto)
<b>Tasa Eliminación</b>	0.929 2.43	0.503	No	4.976 2.95	0.007	Si * 2 (alto)
<b>IFA</b>	0.737 2.4	0.643	No	6.674 2.95	0.002	Si * 1 (alto), 2 (bajo)
<b>Tasa Eliminación IFA</b>	2.237 2.43	0.067	No	3.558 2.95	0.027	Si * 3 (alto), 1 (bajo)
<b>Flagelados</b>	0.331 2.43	0.928	No	2.698 3.55	0.094	No

**F** = Valor superior: calculada  
 Valor Inferior: de tablas

**(P)** = Nivel de Significancia Observada  
 Todas con  $p \leq 0.05$

\* No. de muestreo:  
 3 Junio 1 Enero  
 4 Agosto 2 Abril

\* Muestreo por el cual se encontró la diferencia: entre paréntesis valor alto/bajo con respecto al resto de los muestreos

**Tabla 8** Análisis de varianza de una vía. Experimentos de campo, análisis entre estaciones y entre muestreos.

**Tasa de eliminación en relación con el número de bacterias totales y en relación al número de *V. cholerae* O1 totales (IFA)**

En la Figura 27 se muestra la relación de las tasas de eliminación con respecto a: (a) número de bacterias totales (BT) y (b) número directo de *V. cholerae* O1 (IFA). Las flechas indican los valores promedio calculados por muestreo (Tabla 5), la línea que se muestra es una regresión logarítmica que se calculó con todos los datos individuales. Se puede observar que

Parámetro	DAPI										
Bacterias Totales cel ml <sup>-1</sup> (DAPI)	1 P=0	Elimin Bacter									
Eliminación Bacterias cel ml <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	-0.028 0.898 n.s.	1 P=0	Tasa Elimin.								
Tasa Eliminación d <sup>-1</sup>	-0.148 0.49 n.s.	-0.145 0.498 n.s.	1 P=0	IFA							
<i>V. cholerae</i> O1 cel ml <sup>-1</sup> IFA	0.215 0.312 n.s.	-0.444 0.029 *	-0.255 0.229 n.s.	1 P=0	Elimin IFA						
Eliminación IFA cel ml <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	-0.1 0.642 n.s.	0.904 0.0 **	0.042 0.845 n.s.	-0.15 0.485 n.s.	1 P=0	Flag					
Flagelados cel ml <sup>-1</sup>	0.153 0.474 n.s.	0.606 0.002 **	0.116 0.589 n.s.	-0.318 0.129 n.s.	0.567 0.004 **	1 P=0	Cloro-fila				
Clorofila Chla µg l <sup>-1</sup>	0.129 0.549 n.s.	0.64 0.008 **	0.116 0.5896 n.s.	-0.336 0.109 n.s.	0.600 0.002 **	0.997 P=0	1 P=0	T °C			
Temperatura °C	0.302 0.152 n.s.	0.567 0.004 **	0.345 0.098 n.s.	-0.413 0.045 *	0.534 0.007 **	0.635 0.0009 **	0.640 0.0008 **	1 P=0	O. D.		
Oxígeno Disuelto (OD) mg l <sup>-1</sup>	-0.209 0.326 n.s.	0.482 0.017 *	0.464 0.022 *	-0.57 0.004 **	0.464 0.022 *	0.505 0.012 *	0.521 0.009 **	0.763 0.0 **	1 P=0	Salini-dad	
Salinidad ‰	-0.482 0.017 *	-0.193 0.3649 n.s.	-0.119 0.579 n.s.	0.074 0.730 n.s.	-0.170 0.426 n.s.	-0.190 0.372 n.s.	-0.185 0.387 n.s.	-0.376 0.070 n.s.	-0.067 0.755 n.s.	1 P=0	pH
pH	-0.151 0.479 n.s.	0.492 0.0146 *	0.329 0.116 n.s.	-0.369 0.076 n.s.	0.517 0.0096 **	0.788 P=0	0.787 P=0	0.677 0.0003 **	0.719 0.0001 **	0.047 0.828 n.s.	1 P=0

Valor superior = Coeficiente de correlación

Valor inferior = Nivel de significación (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , n.s. = no significativo)

Tabla 9. Matriz de correlación de los parámetros microbiológicos, tasas de eliminación y fisicoquímicos. medidos en la Laguna de Mecocacán.



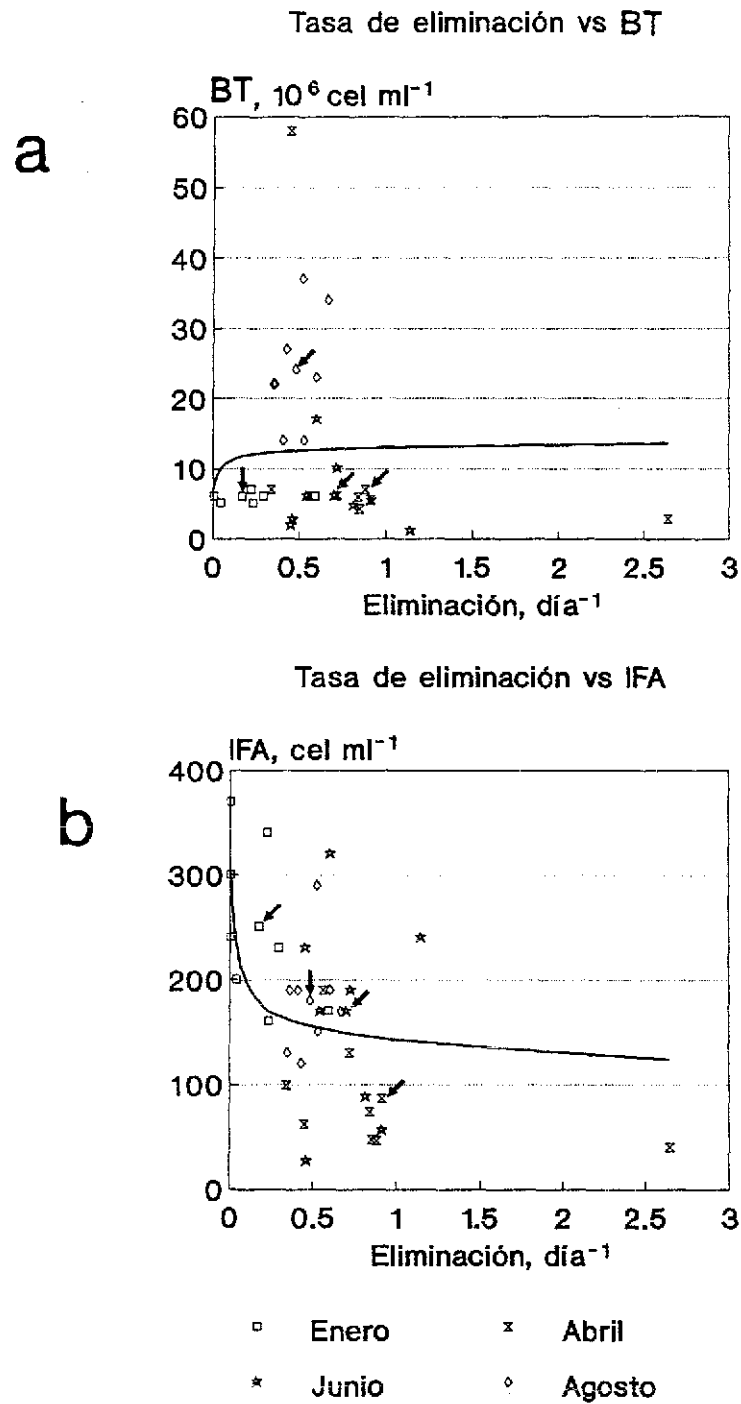


Figura 27. Tasas de eliminación vs. a. Bacterias totales (BT) y vs b. *V. cholerae* O1 (IFA) en la Laguna de Mecoacán.

las concentraciones de bacterias totales (BT) son semejantes en los muestreos de enero abril y junio ( $10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ), los datos del muestreo del mes de agosto se encuentran por arriba de la curva pues tuvieron los valores más altos en concentraciones de  $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$

En Alchichica se encontró que la eliminación es menor en la superficie probablemente por el daño que ocasiona la radiación UV tanto a bacterias como a organismos bacterívoros (Fujioka *et al.* 1981, Barcina *et al.* 1986, 1989) y en el fondo por la disminución de oxígeno disuelto.

### **Bacterioplancton**

Un análisis de varianza realizado para conocer si existe similitud entre cada una de las estaciones y épocas del año considerando los conteos de bacterias totales (DAPI), números directos de *V. cholerae* O1 (IFA), flagelados, así como la tasa de eliminación de *V. cholerae* O1, muestra que entre las estaciones no existen diferencias significativas (Tabla 8). En la mayoría de las estaciones se encontró una concentración en el mismo orden de magnitud de bacterias totales  $10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  (Figura 11, Tabla 5) Sin embargo, se puede observar en este análisis que entre las épocas del año hay diferencias significativas principalmente en los conteos de bacterias totales (DAPI), debido a que en el muestreo 4 (agosto) se registró la concentración más alta ( $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ), estos resultados se explican, considerando la época de lluvias cuando el río transporta una gran cantidad de materia particulada a la laguna, incluyendo desechos municipales provenientes de las zonas aledañas lo que ocasionó el incremento de bacterias. Por otro lado el análisis de correlación realizado considerando los parámetros fisicoquímicos, bacteriológicos, tasas de eliminación, flagelados y clorofila *a* (Tabla 9), muestra que ni los parámetros fisicoquímicos ni el número de flagelados están relacionados con la abundancia de las bacterias totales, por lo que probablemente influye más la composición de especies bacterívoras presentes, que su abundancia.

Con el uso de hisopos de Moore (Sanchez 1991) no se aisló *Vibrio cholerae* O1 pero sí otras especies del género *Vibrio* que también, son de importancia clínica. Los porcentajes más altos fueron para *V. cholerae* No O1 y *V. parahaemolyticus* (Tabla 7), estas bacterias son importantes como causantes de enfermedades como gastroenteritis al ingerir por ejemplo, mariscos (Jawetz *et al.* 1996). Los resultados encontrados en este trabajo no concuerdan con los de Cortés *et al.* (2000), quienes reportan la presencia de *V. cholerae* O1 (Tabla 7), esto

probablemente debido a que su trabajo de investigación (1994, 1995) fue realizado durante la época de epidemias del cólera (Huq *et al.* 1990; Popović *et al.* 1993). Los resultados obtenidos tanto con el uso de hisopos como con el de la técnica de cultivo en medio selectivo TCBS (Venkateswaran *et al.* 1989a), indican que *Vibrio cholerae* O1 probablemente no se encuentra presente en la Laguna de Mecoacán, en su forma cultivable. Esto confirma lo reportado por Colwell *et al.* (1985) y Colwell & Spira (1992), quienes mencionan que no es posible el aislamiento de esta bacteria por los métodos clásicos con el uso de medios de cultivo durante periodos interepidémicos. Es necesario el uso de pruebas más específicas para la detección de tales bacterias, como el método de inmunofluorescencia (Xu *et al.* 1984; Brayton & Colwell 1987; Macek *et al.* 1997) el cual proporciona resultados cualitativos y cuantitativos, especialmente durante estos periodos, cuando por un lado las concentraciones de *V. cholerae* son muy bajas y el crecimiento excesivo de otras bacterias, no permite el conteo de las colonias típicas, aún cuando el medio TCBS es lo suficientemente selectivo para el género *Vibrio* (Sanchez 1991; Barua 1992). Otra posibilidad es que las bacterias bajo condiciones de estrés (cambios en las características nutricionales y fisicoquímicas del agua, depredación o competencia con otras bacterias, etc.), puedan alterarse por sí mismas, entrando a un estado no cultivable, incapaces de crecer en medios de cultivo estandarizados, (Barer & Harwood 1999; Colwell & Spira 1992; McKay 1992; Macek *et al.* 1996, 1997), por lo que esta técnica no siempre proporciona información para evaluar las poblaciones microbianas.

El análisis de *V. cholerae* O1 (IFA) por el método indirecto de inmunofluorescencia (Xu *et al.* 1984) confirmó que se encuentra presente en la Laguna de Mecoacán probablemente en un estado viable pero no cultivable (Colwell & Spira 1992; McKay 1992; Macek *et al.* 1997). *V. cholerae* O1 se observó en concentraciones similares en cada una de las estaciones de  $10^1$  a  $10^2$  cel  $\text{ml}^{-1}$ . Sin embargo, considerando los meses de muestreo, se notó una diferencia significativa debido a que en el mes de enero se encontró el número más bajo y en abril el más alto (Tabla 5), que con respecto a las concentraciones de bacterias totales ( $10^6$  a  $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ), representan un 0.01 %. Esto puede atribuirse a que en realidad *V. cholerae* O1 represente solo una pequeña concentración, o bien, que las bacterias pudieron haber estado dañadas en su membrana celular. Se ha publicado que *V. cholerae* O1, en condiciones adversas (cambios en temperatura, contenido de materia orgánica, salinidad o presencia de químicos tóxicos, etc.), no necesariamente exprese reacción con el antisuero O1 (Xu 1982; McKay 1992), o bien, se

pueda convertir de serotipo O1 a No-O1 y viceversa lo cual ha sido comprobado en microcosmos (Colwell *et al.* 1995). Un estudio en las características de la superficie de la célula de *V. cholerae* O1 y No O1 reveló que las bacterias ambientales (Hood *et al.* 1986), particularmente *V. cholerae* No O1, poseen fosfolípidos en su membrana superficial y son más resistentes a los químicos líticos (Chowdhuri *et al.* 1992). Desde el punto de vista de salud pública la seroconversión de *V. cholerae* No O1 a serotipo O1 puede jugar un papel importante en la epidemiología del cólera (Colwell *et al.* 1995)

Por otro lado, bajo condiciones adversas, algunos organismos pueden servir como reservorio. Ciertas bacterias patógenas, entre ellas las del género *Vibrio*, son capaces de crecer en hospederos, particularmente en su intestino (Harris 1993), o bien, pueden colonizar los caparazones quitinosos de algunos crustáceos como camarones, copépodos, etc. (Huq *et al.* 1984, Kaneko & Colwell 1975, Tamplin *et al.* 1990). Posteriormente pueden ser liberadas vía materia fecal y sedimentarse en el fondo del cuerpo de agua donde entran a la red alimentaria del bentos (Koh *et al.* 1994). Esta asociación, es un buen mecanismo en la supervivencia y dispersión de *V. cholerae*. Existen otros reservorios naturales de esta bacteria. Los resultados de Bangladesh basados en estudios de inmunofluorescencia han probado que *V. cholerae* puede adherirse a la envoltura mucilaginosa de la cianobacteria *Anabaena variabilis*, multiplicarse y persistir hasta más de 15 meses, aunque en su forma no cultivable (Huq *et al.* 1990; Islam *et al.* 1990, 1994; Tamplin *et al.* 1990)

## MICROCOSMOS

### Actividad depredadora de *Cyclidium glaucoma*.

La tasa de crecimiento de *C. glaucoma* en el día 1 de incubación del montaje de los ensayos, disminuyó en el microcosmos que contenía *V. cholerae* O1 (0.2  $\mu\text{m}$ ) como única fuente de alimento (Figura 28), esto podría indicar que *V. cholerae* O1 aunque tiene la posibilidad de ser ingerida como otras bacterias presentes en el ambiente acuático (Curds & Vandyke 1966, Mallory *et al.* 1983), no es una bacteria que pueda apoyar el crecimiento de este bacterívoro por su valor nutritivo o por la producción de toxinas por la misma bacteria como un mecanismo de defensa contra la depredación (Curds & Vandyke 1966, Dive 1973). Las especies de *Vibrio* han evolucionado de tal forma que son capaces de sobrevivir y

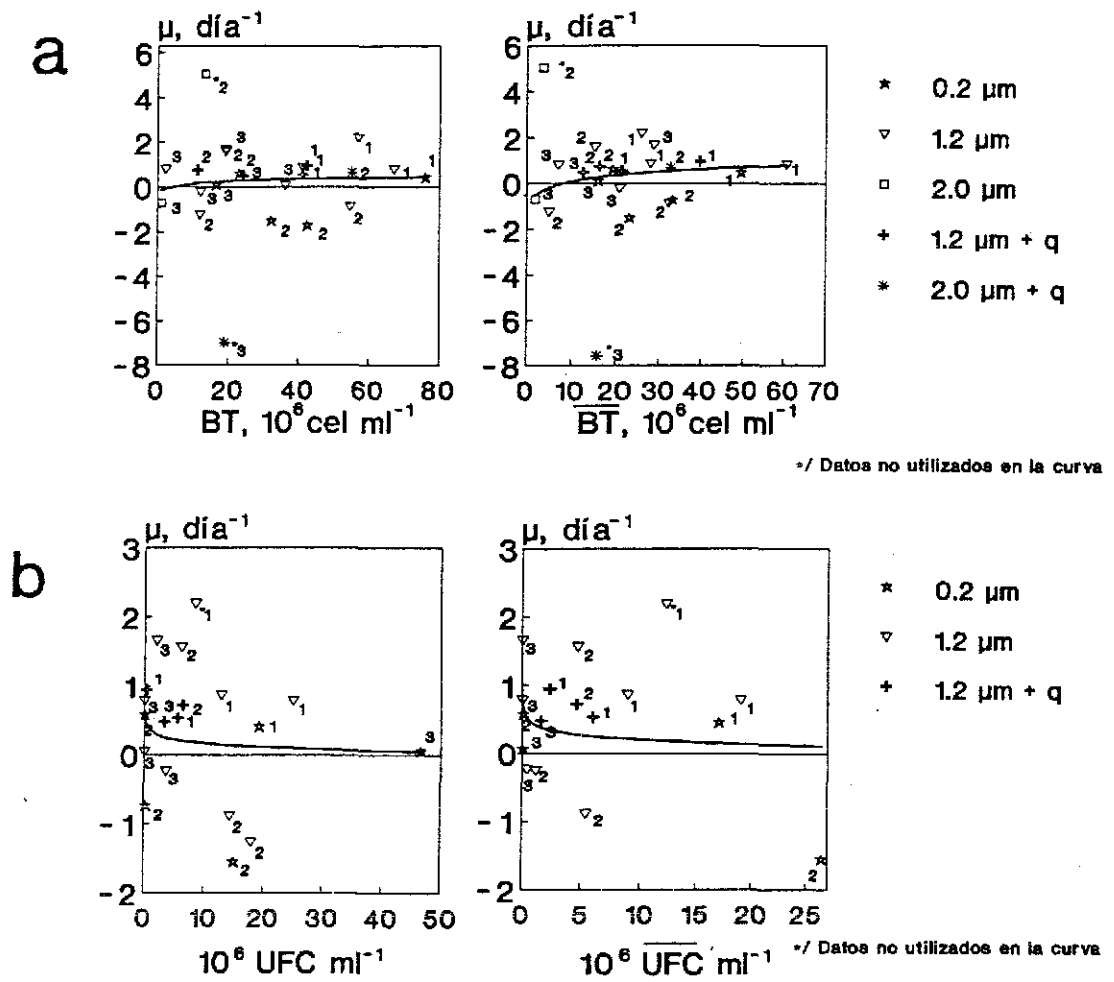


Figura 28. Tasa de crecimiento específica de *C. glaucoma* ( $d^{-1}$ ) vs. **a.** Bacterias totales (BT,  $cel\ ml^{-1}$ ) y **b.** *V. cholera* cultivable ( $CFU\ ml^{-1}$ ).

multiplicarse a pesar de la presencia de los depredadores. Se ha sugerido que la resistencia a la digestión por protozoos depredadores fue un prerrequisito evolutivo de la patogenicidad bacteriana y un mecanismo de supervivencia para las bacterias en ambientes acuáticos (King *et al.* 1988). Esto se relaciona con el hecho de que muchos patógenos humanos no son digeridos debido a la composición de su membrana (Gurijala & Alexander 1990) y pueden pasar a través de las vacuolas alimenticias de los protozoos sin perder su viabilidad, lo cual es muy importante, por ejemplo, en el proceso de tratamiento de agua para consumo humano, pues los patógenos podrían alojarse dentro de los protozoos y sobrevivir a la desinfección (King *et al.* 1988) Barker & Brown (1994), concluyen que aunque el papel evolutivo de los protozoos en el desarrollo de la patogenicidad de las bacterias aún está en debate, no hay duda de la importancia de las interacciones bacteria–protozoo en términos de enfermedad humana. Esta interacción permite la supervivencia, multiplicación y distribución de algunas especies de bacterias patógenas en el ambiente natural. Por otro lado en los sistemas que contenían bacterias de la laguna, las tasas de crecimiento del ciliado permanecen con valores más altos, probablemente debido a que *V. cholerae* O1 se encuentra en competencia con bacterias de la laguna por lo que la concentración de *V. cholerae* O1 disminuye, proliferando por lo tanto otras bacterias de mayor preferencia para los protozoos.

Las bacterias totales en presencia de *C. glaucoma* se encontraron en órdenes de magnitud de  $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$  y bajaron a partir del primer día, hasta  $10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , esto muestra la actividad depredadora de *C. glaucoma*. Las bacterias totales (Figura 16 y 24) en los microcosmos con adición de quitina crecen mejor que sin ella, por lo que es probable que a pesar de la depredación de *C. glaucoma* y de los flagelados presentes, las bacterias utilicen la quitina para su crecimiento, razón por lo cual se encuentren asociadas a organismos con componentes quitinosos como copépodos, conchas de ostiones, etc en el ambiente acuático (Kaneko & Colwell 1975; Huq *et al.* 1983, 1984, Tamplin *et al.* 1990). Por otro lado, se desarrollaron seguramente también bacterias del tamaño no-ingestible por los ciliados (Figura 25).

Los resultados obtenidos en el ensayo 3 con cultivo de *S. typhimurium* (Figura 18), muestran que los ciliados y flagelados crecieron hasta concentraciones de  $3.3 \times 10^2$  cel  $\text{ml}^{-1}$  y  $5 \times 10^4$  cel  $\text{ml}^{-1}$  respectivamente, sin embargo, no existe una relación aparente entre el crecimiento de bacterias totales y de estos depredadores. Aunque se adicionó a este microcosmos la misma concentración de ciliados que al microcosmos con

*V. cholerae* O1 la población de ciliados no se alimentó de las bacterias de *S. typhimurium*. Los bacterívoros no fueron suficientes para controlar el crecimiento de *S. typhimurium*, o bien, no ingirieron estas bacterias por las diferencias en características con relación a las bacterias con las que se alimentan. Este experimento muestra que *C. glaucoma* no crece o aun más, no se alimenta de *S. typhimurium*, ya que el crecimiento de este ciliado y de los flagelados disminuye en comparación con el crecimiento de estos protozoos en el microcosmos con *V. cholerae* O1 como fuente de carbono. Es conocido que las bacterias son capaces de resistir la predación mediante mecanismos de defensa como toxinas o bien pigmentos tóxicos, muchas bacterias patógenas para el hombre se encuentran en este caso; así estas bacterias pueden ser tóxicas para los protozoos o no son un buen alimento (Curds y Vandyke 1966, Dive 1973), pero pueden ser ingeridas como presa alternativa (Curds y Vandyke 1966; Mallory *et al.* 1983; González *et al.* 1992; Macek *et al.* 1993, 1997) acompañando a las bacterias adecuadas. Hay que mencionar que no se puede distinguir en estos resultados el papel del tamaño de *S. typhimurium* teñida (FLB) usada, aunque teóricamente se sabe que *S. typhimurium* es mayor en tamaño que *V. cholerae* O1. Por otra parte se ha reportado que *Salmonella* spp. no son muy tóxicas para los protozoos (revisión en Dive 1973, Mallory *et al.* 1983) por lo tanto la selección observada estuvo aparentemente basada en el tamaño (Fenchel 1986; Sanders 1988, Šimek *et al.* 1994).

### **Desarrollo de *V. cholerae* O1 en microcosmos**

En los microcosmos con *V. cholerae* O1, quitina y en ausencia de bacterias de la Laguna (agua filtrada por 0.2  $\mu\text{m}$ ) los conteos de bacterias totales (DAPI) corresponden por lo tanto a los de *V. cholerae* O1 (Figura 23), esto se demostró comparando los conteos de bacterias totales con los de *V. cholerae* cultivable sobre TCBS. Durante los días cero y uno las concentraciones tanto de bacterias totales como de *V. cholerae* cultivable se encontraron en el mismo orden de magnitud ( $10^7$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). En los días siguientes el número de *V. cholerae* cultivable baja hasta concentraciones de  $10^4$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , mientras que las de *V. cholerae* O1 cuantificado por inmunofluorescencia (IFA), siempre se mantuvieron en órdenes de  $10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$  desde el inicio del experimento, lo cual significó que probablemente *V. cholerae* pasa de su forma cultivable a la no-cultivable.

Por otro lado, los números directos de *V. cholerae* O1, en ocasiones resultaron ser

menores que los conteos de *V. cholerae* cultivables, (en teoría las concentraciones debieron ser iguales o mayores que los conteos de *V. cholerae* cultivables). Esto probablemente se debió a que la membrana celular de la bacteria se dañó durante el procedimiento de la cosecha (centrifugación y lavado; Xu *et al.* 1984) o al cambio de un medio enriquecido (triptona) a uno carente de nutrientes (agua de la Laguna)

Aunque algunos sistemas contenían quitina, la presencia de *C. glaucoma* o bien la competencia entre bacterias provenientes de la laguna, no permitió la pronta recuperación de *V. cholerae* O1 por lo que no fue posible obtener conteos lógicos mediante la técnica de inmunofluorescencia (mayores o iguales a los cultivables)

Los resultados de los conteos de las bacterias totales y de *V. cholerae* de los microcosmos bajo diferentes características en los ensayos 1, 2 y 5 (Figuras 15, 17 y 23) muestran claramente que en el crecimiento en densidad de los vibriónes influyen tanto la competencia con otras bacterias como la depredación por protozoos bacterívoros. Por otro lado a pesar de la depredación por *C. glaucoma* (Figuras 14, 22 y 24), en el microcosmos con quitina, las concentraciones de bacterias tuvieron una rápida recuperación, manteniéndose en el mismo orden de magnitud, mientras que sin la presencia de quitina se observa que las bacterias tienden a ser eliminadas más rápidamente. Esto muestra que tanto *V. cholerae* O1 como las bacterias presentes en el agua de la Laguna probablemente pueden utilizar quitina como sustrato (Guthrie & Cofie 1992; Vrba *et al.* 1992; Hoppe 1993; Macek *et al.* 1996, Dumontet *et al.* 1996). El crecimiento de *V. cholerae* O1 parece mantenerse mejor en presencia de quitina siempre y cuando no se presenten otras bacterias quitinolíticas. En el cultivo mixto (agua de la Laguna sin esterilizar) *V. cholerae* O1 no crece adecuadamente por la depredación y probablemente aún más, por la competencia con otras bacterias por espacio y nutriente. Por otro lado, se observó que las bacterias totales crecieron en los sistemas que contenían quitina a pesar de la depredación por *C. glaucoma* debido a que se observaron cadenas de bacterias (Figura 6b derecha), o bien las células aumentaron su tamaño. Las bacterias que llegaron al final de los experimentos en algunos casos fueron más grandes (Figura 25), probablemente como un mecanismo de defensa para no ser ingeridas por los ciliados (Shikano *et al.* 1990; Macek *et al.* 1993, Jürgens & Güde 1994, Šimek *et al.* 1994).



Los resultados obtenidos en los ensayos 4 y 5 (Figura 21 y 24) muestran que en todos los sistemas bajo diferentes características (Tabla 3) las concentraciones de *V. cholerae* cultivable en medio TCBS, estuvieron en los dos primeros días en órdenes de  $10^7$ , sin embargo, en los sistemas con un cultivo de *C. glaucoma*, las concentraciones bajaron hasta  $10^1$  UFC ml<sup>-1</sup> mientras que en el sistema con bacterias de la laguna (filtrado por 1.2 μm) en ausencia de *C. glaucoma* disminuyeron a órdenes de solo  $10^3$  UFC ml<sup>-1</sup>. En el ensayo 4 a pesar de que los microcosmos fueron diferentes en su composición microbiológica, las concentraciones de bacterias (Figura 21) no muestran diferencia notables; probablemente debido a que no se adicionó quitina a ninguno de los tres, la cual es empleada por bacterias quitinolíticas para su crecimiento y les permite una mejor supervivencia. El análisis de ANOVA con las tasas de crecimiento del día 2, de bacterias totales (DAPI), de *V. cholerae* O1 inmunopositivo (IFA) y *V. cholerae* O1 cultivable (TCBS), muestran que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de estos microorganismos en los microcosmos bajo diferentes condiciones (Tabla 10)

Variable analizada	S C Entre Grupos	Grados de Libertad	S C Dentro de Grupos	Grados de Libertad	F	(P)
Bacterias Totales (DAPI)	9.0553	6	17.2542	13	1.137	0.3946
<i>V. cholerae</i> O1 IFA	22.1693	6	36.8397	13	1.304	0.3220
<i>V. cholerae</i> O1 TCBS	40.3456	6	104.6537	13	0.835	0.5639

S C = Suma de Cuadrados

(P) = Nivel de Significancia Observada

**Tabla 10.** Análisis de Varianza de la tasa de crecimiento del día 2 de bacterias totales (DAPI), *V. cholerae* O1 (IFA) y cultivable (TCBS) en los diferentes microcosmos

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el campo y en los experimentos de laboratorio con el uso de microcosmos, comprobaron la validez de la hipótesis planteada al inicio de este estudio, con algunas precisiones.

### I. Experimentos de Campo

- El análisis fisicoquímico de las muestras de La Laguna de Mecocacán confirmó las diferencias entre las diferentes estaciones de la Laguna las estaciones cercanas a la desembocadura al mar (Golfo de México) presentaron similitudes entre ellas, la estación 5 (entrada del Río Escarbado) resultó ser la más diferente, debido a la salinidad más baja con respecto al resto de las estaciones.
- La concentración de bacterias totales (BT) en el ambiente se registró en ordenes de  $10^6$  a  $10^7$  cel  $\text{ml}^{-1}$ . La mayor abundancia se encontró asociada a la época de lluvias. El conteo de *V. cholerae* O1 por el método de inmunofluorescencia, indicó su presencia durante todo el año en la Laguna (de  $10^1$  a  $10^2$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ), aún durante el periodo interepidémico y fue el único medio con el cual se cuantificó *V. cholerae* O1.
- La eliminación *V. cholerae* O1 en la Laguna aparentemente dependió más de las interacciones entre las bacterias o bien de los bacterívoros presentes, que de los factores fisicoquímicos. La tasa de eliminación de *V. cholerae* O1 confirmó que estas son eliminadas eficientemente, podría decirse que los organismos bacterívoros del lugar se alimentan de bacterias del tamaño de *V. cholerae*.
- La tasa de eliminación encontrada en el Lago de Alchichica, muestra que bacterias del tamaño de *V. cholerae* son eliminadas también de este ambiente. Esto podría ser importante en la eliminación de *V. cholerae* O1 en caso de contaminación en este cuerpo de agua por esta bacteria.

### II. Experimentos de laboratorio

- (i) *V. cholerae* O1 crece mejor en presencia de quitina siempre y cuando no se presentaron otras bacterias quitinolíticas.
- (ii) Generalmente, *V. cholerae* O1 en los sistemas con ciliados desapareció con mayor rapidez. La bacterivoría es un factor importante en la eliminación y mantenimiento

constante de concentraciones bajas de las bacterias en el medio acuático natural.

- (iii) Se observaron otros importantes factores en la supervivencia de *V. cholerae* en el ambiente. La competencia con otras bacterias es un factor importante para los vibriones, la adición de quitina al ensayo con cultivo de *V. cholerae* O1, bacterias y protozoos de la laguna, no ayuda a *V. cholerae* O1 a sobrevivir, probablemente debido al mejor crecimiento de otras bacterias que aparentemente utilizan la quitina como sustrato, por lo que *Vibrio cholerae* O1 desaparece más rápidamente.
- (iv) El número directo encontrado de *Vibrio cholerae* O1 por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA) en los ensayos en el laboratorio no reflejó el número total de los vibriones adicionados, probablemente debido al daño físico de la pared celular de la bacteria donde se localizan los sitios de reconocimiento de anticuerpos, por un lado, al que sufrieron durante la centrifugación (cosecha de las bacterias) y por otro, al ser adicionadas de un cultivo enriquecido al agua salobre con mínima materia orgánica por lo que los vibriones no se recuperaron. Los vibriones se tiñeron muy ligeramente en comparación con los ambientales.

Por todo lo anterior, se puede afirmar que *V. cholerae* O1 está presente en ecosistemas acuáticos naturales en su forma no cultivable; *V. cholerae* O1 se comporta como otros vibriones no patógenos probablemente usando quitina, como fuente de nutrimento. Su presencia en la columna de agua aparentemente depende de varios otros factores ambientales y de los reservorios naturales como de la presencia de crustáceos, cianobacterias etc.

La eliminación de *V. cholerae* O1 depende de la depredación por los protozoos tanto directamente (depredación de una bacteria entérica) como indirectamente (cambios en la composición de la comunidad bacteriana) y de la competencia con otras bacterias del medio. Aunque *V. cholerae* O1 como otras bacterias patógenas, no pueden servir como único alimento para protozoos, éstas pueden servir como alimento alternativo. No se puede descartar que a su vez los protozoos puedan servir como mecanismos de diseminación y multiplicación de *V. cholerae* O1 así como de otras bacterias patógenas de importancia clínica, y de esta manera pueden seguir a eslabones mas altos en la cadena alimentaria hasta llegar al hombre.

### *Literatura citada*

- 1 Albright, L.J., Sherr, E.B., Sherr B.F. & Fallon D. (1987): Grazing of ciliated protozoa on free and particle-attached bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **38**: 125-129.
2. Alcocer, J., Lugo, A., Estrada, S., Ubeda, M. & Escobar, E. (1993): La microfauna bentónica de los axalapazcos Mexicanos. *Actas VI Congreso Español Limnología* **33**: 409-415.
3. Arredondo-Figueroa, J.L., Borrego-Enríquez L.E., Castillo-Domínguez R.M. & Valladolid-Laredo, M.A. (1983). Batimetría y morfometría de los lagos "maars" de la Cuenca de Oriental, Puebla México. *Biotica* **8**: 37-47
4. Arredondo-Figueroa, J.L., Vera-Mackintosh O., & Ortiz L. A. (1984): Análisis de componentes principales y cúmulos de datos limnológicos, en el lago de Alchichica, Puebla. *Biotica* **9**: 23-39
5. Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**: 257-263.
6. Balczon, J. M. & Pratt, J.R. (1995): A comparison of methods for estimating short-term feeding rates of algivorous ciliated protozoa. *Arch. Protistenkd* **146**: 49-58.
7. Barcina, I., Arana, I., Iriberry, J. & Egea, L. (1986): Factors affecting the survival of *E. coli* in a river. *Hydrobiologia* **141**: 249-253.
8. Barcina, I., González, J. M., Iriberry, J. & Egea, L. (1989): Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 246-251.
9. Barer, M. R. & Harwood, C. R. (1999): Bacterial Viability and Culturability. In Poole R.K. (eds); *Advances in Microbial Physiology*. **41** Academic Press. pp. 94-137.
10. Barker J. & Brown M.R.W. (1994) Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* **140**: 1253-1259.
11. Barua, D. (1992) History of cholera. In. Barua, D., Greenough III, W.B. (eds.): *Cholera*. Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 1-36.
12. Beaver, J.R. & Crisman, T.L. (1989): The role of the ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems. *Microbial. Ecol.* **17**: 111-136.
13. Børsheim, K.Y. (1984) Clearance rates of bacteria-sized particles by freshwater ciliates, measured with monodispersed fluorescent latex beads. *Oecologia (Berlin)* **63**: 286-288.
14. Brayton, P.R. & Colwell, R.R. (1987): Fluorescent antibody staining method for enumeration of viable environmental *Vibrio cholerae* O1. *J. Microbiol. Methods.* **6**: 309-314.
15. Brayton, P.R., Tamplin, M.L., Huq, A. & Colwell, R.R. (1987). Enumeration of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh waters by fluorescent- antibody direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2862-2865
16. Chowdhury, M.A.R., Xu, B., Montilla, R., Hasan, J.A.K., Huq, A. & Colwell, R.R. (1995): A simplified immunofluorescence technique for detection of viable cells of *Vibrio cholerae* O1 and O139. *J. Microbiol. Methods*. In press

17. Clark, R.M., Rice, E.W., Pierce, B.K., Johnson, C.H. & Fox, K.R. (1994): Effect of aggregation on *Vibrio cholerae* inactivation. *J. Environ. Engn. ASCE* **120**: 875-887.
18. Colwell, R.R. & Spira, W.M. (1992): The ecology of *Vibrio cholerae*. In: Barua, D., Greenough III, W.B. (eds.): *Cholera* Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 107-127
19. Colwell, R.R. (ed.) (1984): *Vibrios in the environment*. J. Willey & Sons Inc., New York, USA.
20. Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.I., Huq, S.A. & Palmer, L. M. (1985): Viable but non culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implication for realisation of genetically engineered microorganism. *Bio/Technology* **3**: 817-820.
21. Colwell, R.R., Huq A., Chowdhury, M.A., Brayton, P.R. & Xu, B. (1995) Serogroup conversion of *Vibrio cholerae*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 946-950
22. Colwell, R.R., Kaper, J. & Joseph, S.W. (1977): *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science* **198**: 394-396.
23. Cortés, M.J., Ramírez, G. P. & Sánchez, C. J. (2000): Occurrence of *Vibrio cholerae* in the brackish water of a coastal lagoon on the Gulf of Mexico. In: Munawar, M., Lawrence, S.G., Munawar, I.F. & Malley, D.F. (eds.): *Aquatic ecosystems of Mexico: Status and scope*. Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp 257-271.
24. Curds, C.R. & Vandyke, J.M. (1966): The feeding habitats and growth rates of some fresh-water ciliates found in activated-sludge plants. *J. Appl. Ecol.* **3**: 127-137
25. Dive, D. (1973): Nutrition holozoïque des ciliés. Ses conséquences dans l'épuration naturelle et artificielle. *Ann. Biol.* **12**: 343-380.
26. Dumontet, S., Krovacek, K., Baloda, S.B., Grottoli, R., Paquale, V. & Vanucci, S. (1996) Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio* spp. and planktonic copepods in the coastal marine environment in southern Italy. *Comparative Immunol. Microbiol. Infect. Diseases.* **19**: 245-254.
27. Fenchel, T. (1986): Protozoan filter feeding. *Progr. Protistol.* **1**: 65-113.
28. Fenchel, T. (1987): *Ecology of protozoa: The biology of free-living phagotrophic protists*. Science Technical Publishers, Madison, Wisconsin. 197 pp.
29. Fenchel, T. (1980): Suspension feeding in ciliated protozoa I. Feeding rates and their ecological significance. *Microb. Ecol.* **6**: 13-25.
30. Fenchel, T., Kristensen, L.D. & Rasmussen, L. (1990): Water column anoxia: vertical zonation of planktonic protozoa. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **62**: 1-10.
31. Foissner, W., Berger, H. & Schaumburg, J. (1999): *Identification and ecology of limnetic plankton ciliates*. Informationsberichte Bayer. Landesamtes Wasserwirtschaft 3/99
32. Fujioka, R. S., Hashimoto, H.H., Siwak, E. B. & Young, R. H. (1981): Effects of sunlight on survival of indicator bacteria in sea water. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 758-763.
33. García, E. (1973): *Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen*.

UNAM. Cuarta Ed., México, 135 pp

34. Garcia-Lara, J., Menon, P., Servais, P. & Billen G. (1991): Mortality of fecal bacteria in seawater. *Appl Environ. Microbiol.* **57**: 885-888.
35. González, J.M., Iriberry, J., Gee, L. & Barcina, I. (1992) Characterization of culturability, protistan grazing and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 998-1004.
36. Gurijala, K.R. & Alexander M. (1990) Effect of growth rate and hydrophobicity on bacteria surviving protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1631-1635
37. Guthrie, R.K. & Cofie, D.Q. (1991): Culture of *Vibrio cholerae* in presence of shrimp and crab chitin. *Int. Biodeterioration* **27**: 39-48.
38. Harris, J.M. (1993): The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb. Ecol.* **25**: 195-231
39. Hood, M.A., Guckert, J.B., White, D.C. & Deck, F. (1986) Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA, and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 788-793.
40. Hood, M.A., Ness, G.E. & Rodrick, G.E. (1983a): Isolation of *Vibrio cholerae* serotype O1 from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl Environ. Microbiol.* **41**: 559-560.
41. Hood, M.A., Ness, G.E., Rodrick, G.E. & Blake, N.J. (1983b): Distribution of *Vibrio cholerae* in two Florida estuaries. *Microb. Ecol.* **9**: 65-75.
42. Hoppe, H.G. (1983): Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **11**: 299-308.
43. Huq, A., Colwell, R.R., Rahman, R., Ali, A., Chowdhury, A.R., Parveen, S., Sack, D.A. & Russek-Cohen, E. (1990). Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2370-2373.
44. Huq, A., Small, E.B., West, P.A. & Colwell, R.R. (1984): The role of planktonic copepods in the survival and multiplication of *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment. In: Colwell, R.R. (ed). *Vibrios in the environment*. J. Willey & Sons Inc. New York, pp. 521-534.
45. Huq, A., Small, E.B., West, P.A., Huq, M. I., Rahman R. & Colwell, R.R. (1983): Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 275-283
46. Iriberry J., Azúa, I., Labirua-Iturburu, A, Artolozaga, I. & Barcina, I. (1994): Differential elimination of enteric bacteria by protists in a freshwater system. *J Appl. Bacteriol.* **77**: 476-483.
47. Islam, M.S., Drasar, B.S. & Bradley, D.J. (1990): Long-term persistence of toxogenic *Vibrio cholerae* in the mucilaneous sheath of a blue-green alga, *Anabaena variabilis*. *J Tropical Med Hygiene* **193**: 133-139.
48. Islam, M.S., Miah, M.A., Hasan, M.K., Sack, R.B. & Albert, M.J. (1994). Detection of non-culturable *Vibrio cholerae* O1 associated with a cyanobacterium from an aquatic environment in Bangladesh. *Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 298-299

49. Jack, J.D. & Gilbert, J.J. (1997): Effects of metazoans predators on ciliates in fresh-water plankton communities. *J. Euk. Microbiol.* **44**: 194-199
50. Jawetz, E., Melnick, J. & Adelberg, E. (1996). *Microbiología médica*. Editorial El manual moderno. S.A. de C.V. 588 pp
51. Jürgens, K. & Güde, H. (1994): The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **112**: 169-188
52. Kaneko, T. & Colwell, R.R. (1975): Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. *Appl. Microbiol.* **29**: 269-274.
53. King, C.H., Shotts, E.B., Wooley, R.E. & Porter, K.G. (1988): Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 3023-3033
54. Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R. & Kuwabara, S. (1963) A new selective isolation medium for the vibrio group (modified Nakanishi medium) - TCBS agar (en Japonés). *Japanese J. Bacteriol.* **18**: 387-392
55. Koh, E.G.L., Huyn, J.-H. & LaRock, P.A. (1994): Pertinence of indicator organism and sampling variables to *Vibrio* concentrations. *Appl. Environ. Microb.* **60**: (10) 3897-3900.
56. Lee, J.J. & Soldo, A.T. (eds.) (1992): *Protocols in Protozoology*. Soc. Protozoologists & Allen Press Inc., Lawrence, USA.
57. López-Hernández, E., Maldonado-Mares, F. & Sánchez-Munguía A. (1997): Diagnóstico y evaluación del impacto ambiental en comunidades bióticas de los sistemas lagunares costeros Mecocacán y Carmen-Pajonal-Machona. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco 1ª Edición. 71 pp.
58. Lugo Vázquez, A. (2000) Variación espacial y temporal de la estructura de la comunidad planctónica del Lago de Alchichica, Puebla, con algunos aspectos de interacciones tróficas. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias UNAM, México 98 pp.
59. Macek, M., Carlos, G., Ramírez, P. & Memije, P. (1997): Ciliate - *Vibrio cholerae* interactions within a microbial loop: an experimental study. *Aquatic. Microb. Ecol.* **13**: 257-266.
60. Macek, M., Hartman, P. & Škopová, I. (1993): Participation of specific substrate degrading strain in the mixed bacteria culture as the result of ciliate grazing. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* **78**: 557-574.
61. Macek, M., Vrba, J., Hartman, P., Ramteke, P. & Ramírez, P. (1996): Continuous-flow cultivation of *Vibrio cholerae* in the presence of natural freshwater chitin. In Muzzarelli, R.A.A. (Ed.) *Chitin enzymology 2*. Eur. Chitin Soc., Atec Edizioni, pp 147-156.
62. Mallory, L.M., Yuk, C.H., Liang, L. & Alexander, M. (1983): Alternative prey: A mechanism for elimination of bacterial species by protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1073-1079
63. Margalef, R. (1983). *Limnología*. Omega, Barcelona. 1010 pp
64. Marrasé, C., Lin, E.L. & Caron, D.A. (1992): Seasonal and daily changes in bacterivory in a coastal plankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **82**: 281-289.

65. McDonnell, M.T., Baker, R.M., Singleton, F.L. & Hood, M.A. (1984) Effects of surface association and osmolarity in seawater microcosm populations of an environmental isolates of *Vibrio cholerae*. In: Colwell, R.R. (ed). *Vibrios in the environment*. J. Willey & Sons Inc. New York, pp. 535-548.
66. McKay, A.M. (1992): Viable but-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**: 129-135
67. Müller, H. (1989): The relative importance of different ciliate taxa in the pelagic food web of Lake Constance. *Microb. Ecol.* **18**: 261-274.
68. Müller, H., Schöne, A., Pinto-Coelho, R. M., Schweizer, A. & Weisse, T. (1991): Seasonal succession of ciliates in Lake Constance. *Microb. Ecol.* **21**: 119-138.
69. Munro, P. M. Gauthier, M. J. & Laumond, F. M. (1987): Changes in *Escherichia coli* cells starved in seawater or grown in seawater-wastewater mixtures. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1476-1481.
70. Muroga, K. & Yasunobu, H. (1987): Uptake of bacteria by rotifer. *Nippon Suisan Gakkaishi* **53**: 2091.
71. Noble, P.A., Dabinett, P.E. & Gow, J.A. (1990): A numerical taxonomic study of pelagic and benthic surface-layer bacteria in seasonally-cold coastal water. *System. Appl. Microbiol.* **13**: 77-85.
72. Oragu, J.I., Arridge, H., Mara, D.D., Pearson, H.W. & Silva, S.A. (1993) *Vibrio cholerae* - O1 (El Tor) removal in waste stabilization ponds in Northern Brazil. *Wat. Res.* **27**: 727-728
73. Pomeroy, R.L. (1980). Microbial roles in aquatic foodwebs. In: Colwell, R.R. (ed.) *Aquatic microbial ecology*. University Maryland, pp. 85-109
74. Popović, T., Olsvik, Ø., Blake, P.A. & Wachsmuth, K. (1993): Cholera in the Americas. Foodborne aspects. *J. Food Protection* **56**: 811-821
75. Porter, K.G. & Feig, Y.S. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**, 943-948
76. Porter, K.G., Sherr, E.B., Sherr, B. F., Pace, M. & Sanders, R.W. (1985): Protozoa in planktonic food webs. *J. Protozool.* **32**: 409-415
77. Psenner, R. (1993). Determination of size and morphology of aquatic bacteria by automated image analysis. In: P. Kemp, B. Sherr, E. Sherr & J. Cole (eds), *Handbook of methods in aquatic microbiology*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 339-345
78. Roszak, D. B., Grimes, D.J. & Colwell, R.R. (1984): Viable but non recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* **30**: 334-338.
79. Roszak, D. B. & Colwell, R.R. (1987): Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2889-2983.
80. Sakazaki, R. (1992). Bacteriology of *Vibrio* and related organisms. In: Barua, D., Greenough III, W.B. (eds) *Cholera*. Plenum Medical Book Company, New York and London, pp. 37-55.
81. Salat, J. & Marrasé, C. (1994): Exponential and linear estimations of grazing on bacteria: Effects of changes in the proportion of marked cells. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **104**: 205-209.



82. Sanchez, S P (1991): Manual de métodos de aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en agua. Curso OPAS-IMTA México. 70 pp
83. Sanders, R.W. (1988): Feeding by *Cyclidium* sp. (Ciliophora, Scuticociliatida) on particles of different size and surface properties. Bull. Marine Sci. **43** 446-457.
84. Sato, M I Z., Sanchez, P S., Rivera, I G. & Martins, M T. (1995): Survival of culturable *Vibrio cholerae* O1 and non O1 in seawater, freshwater and wastewater and effect of the water environment on enterotoxin production. Revista Microbiol **26** 83-89
85. Sherr, B.F., Sherr, E.B., Fallon, R.D. & Newell, S Y (1986): Small aloricate ciliates as a mayor component of the marine heterotrophic nanoplankton. Limnol. Oceanogr **31** 177-183.
86. Sherr, B F., Sherr, E.B. & Fallon, R.D. (1987): Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ bacterivory. Appl. Environ. Microbiol. **53** 958-965.
87. Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (1987): High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates. Nature **325**: 710-711.
88. Sherr, E. B. & Sherr, B F (1993): Protistan grazing rates via uptake of fluorescently labeled prey. In Kemp, P., Sherr, B., Sherr, E & Cole J (eds). *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 695-701
89. Shikano S., Luckinbill, L & Kurihara, Y (1990): Changes of trains in a bacterial population associated with protozoal predation. Microb. Ecol. **20**: 75-84.
90. Šimek, K., Bobková, J., Macek, M., Nedoma, J. & Psenner, R. (1995): Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: a study at the species and community level. Limnol. Oceanogr. **40**: 1077-1090.
91. Šimek, K., Macek, M & Vyhnálek, V (1990a): Uptake of bacteria-sized fluorescent particles by natural protozoan assemblage in a reservoir. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn Limnol **34**: 275-281.
92. Šimek, K., Macek, M., Sed'a, J & Vyhnálek, V. (1990b): Possible food chain relationships between bacterioplankton, protozoans and cladocerans in a reservoir. Int. Revue ges. Hydrobiol. **75**: 583-596
93. Šimek, K., Macek, M., Straškrabová, V. Pernthaler, J & Psenner, R. (1996): Can pelagic ciliates survive on a diet of picoplankton? J Plankton Res **18**: 597-613
94. Šimek, K., Vrba, J. & Hartman, P. (1994). Size-selective feeding by *Cyclidium* sp. on bacterioplankton and various sizes of cultured bacteria. FEMS Microb. Ecol. **14**. 157-168.
95. Singleton, F.L., Attwel, R.W., Jangi, M.S. & Colwell, R.R. (1982) Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosm. Appl Environ. Microbiol **43** 1080-1085
96. Sleigh, M. (1979): *Biología de los protozoos*. H. Blume Ediciones. 2º Edición. 399 pp
97. Sochard, M.R., Wilson, L.F., Austin, B & Colwell, R.R. (1979): Bacteria associated with the surface and the gut of marine copepods. Appl Environ Microbiol. **37**. 750-759
98. Straškrabová, V., Callieri, C., Cruz-Pizarro, L., Hartman, P., Macek, M., Nedoma, J. & Šimek, K (1999): Investigations on microbial food webs in mountain lakes - aims and methods. In: Straškrabová, V., Callieri, C., Fott, J. (eds.): *Pelagic food web in*

- mountain lakes. Mountain Lakes Research Program. J. Limnol.* **58**: 77-87
99. Tamminen, T., Kuparinen, J. & Lignell, R. (1984): Diurnal cycles of phytoplankton exudation and bacterial uptake of organic substrates. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **19**: 267-279.
  100. Tamplin, M., Rodrick, G.E., Blake, N.J. & Cubr, T. (1982): Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. *Appl Environ. Microbiol.* **44**: 1466-1470.
  101. Tamplin, M.L., Gauzens, A.L., Huq, A., Sack, D.A. & Colwell, R.R. (1990): Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1977-1980.
  102. Vanoy, R.W., Tamplin, M.L. & Schwarz, J.R. (1992): Ecology of *V. vulnificus* in Galveston Bay oysters, suspended particulate matter, sediment and seawater: detection by monoclonal antibody - immunoassay - most probable number procedures. *J. Industrial Microbiol.* **9**: 219-223.
  103. Venkateswaran, K., Nakano, O., Okarf, T., Takayama, K., Matsuda, & Hashimoto, H. (1989a): Occurrence and distribution of *Vibrio* spp., *Listonella* spp. and *Clostridium botulinum* in the Seto Inland sea of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1591-1598.
  104. Venkateswaran, K., Takai, T., Navarro, I.M., Nakano, H., Hashimoto, H. & Siebeling, R.J. (1989b): Ecology of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Salmonella* spp. and role of zooplankton in their seasonal distribution in Fukuyama coastal waters, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1591-1598.
  105. Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., González, H. & Gaytán, M. (1993): Comparative description basic chemistry of crater-lakes in Puebla State, Mexico. *Verh. Int. Ver. Limnol.* **25**: 435-440.
  106. Vrba, J., Nedoma, J., Šimek, K. & Sed'a, J. (1992): Microbial decomposition of polymer organic matter related to plankton development in a reservoir: activity of  $\alpha$ -,  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -*N*-acetyl glucosaminidase and uptake of *N*-acetylglucosamine. *Arch. Hydrobiol.* **126**: 193-211.
  107. Weinbauer, M.G. & Suttle, C.A. (1999): Lysogeny and profage induction in coastal and offshore bacterial communities. *Aquat. Microb. Ecol.* **18**: 217-225.
  108. Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F.L., Atwell, R.W., Grimes, D.J. & Colwell, R.R. (1982): Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8**: 313-323.
  109. Xu, H.S., Roberts, L.B., Adams, L.B., West, A., Siebeling, R.J., Huq, A., Huq, M.I., Rahman, R. & Colwell, R.R. (1984): An indirect fluorescent antibody staining procedure for detection of *Vibrio cholerae* O1 cells in aquatic environment samples. *J. Microbiol. Methods.* **2**: 221-231.