



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA
DEL ACOCIL *Cambarellus montezumae*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

MARÍA DE LA LUZ FABIOLA ÁVILA SOLÍS

ASESORA:

DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES



México, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

Resumen	1
1.0 Introducción	3
1.1 Historia	3
1.2 Antecedentes	4
1.3 Generalidades de la especie	5
1.3.1 Taxonomía	7
1.4 Distribución	9
1.5 Importancia de la calidad microbiológica	11
2 Hipótesis	15
3 Objetivos	15
3.1 Objetivo general	15
3.1 Objetivos particulares	15
4.0 Material y métodos	17
4.1 Áreas de muestreo	17
4.2 Muestras	18
4.3 Determinación de coliformes totales por la técnica de número más probable (NMP)	20
4.4 Recuento de bacterias mesófilas aerobias en placa	22
4.5 Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.	23
4.6 Aislamiento e Identificación de bacterias asociadas	24
4.7 Aislamiento de <i>Mycoplasma</i> spp.	26

4.8 Prueba estadística	27
5.0 Resultados	28
5.1 Bacterias coliformes totales	28
5.1.1 Macerado de acociles crudos	28
5.1.2 Agua de lavado a partir de acociles crudos	30
5.1.3 Agua de embalse a partir de acociles crudos	31
5.1.4 Macerado de Acociles cocidos	32
5.2 Recuento de bacterias mesófilas aerobias	33
5.2.1 Macerado de acociles crudos	33
5.2.2 Agua de lavado de acociles crudos	34
5.2.3 Agua de embalse de acociles crudos	35
5.2.4 Macerado de acociles cocidos	37
5.2.5 Agua de Lavado de Acociles cocidos	38
5.3 Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.	38
5.4 Bacterias asociadas	38
5.4.1 Bacterias aisladas con mayor frecuencia	38
5.4.2 Bacterias aisladas en acocil asociadas a enfermedades en humanos	43
5.4.3 Bacterias aisladas en acocil asociadas a enfermedades en crustáceos	44
5.4.4 Bacterias aisladas en acociles cocidos	45
6.0 Discusión	46
6.1 Número más probable de Bacterias coliformes (NMP)	46

6.1.1	Macerado a partir de acociles crudos	46
6.1.2	Agua de lavado de acociles crudos	47
6.1.3	Agua de embalse de acociles crudos	47
6.1.4	Macerado de acociles cocidos	48
6.1.5	Agua de Lavado de Acociles cocidos	50
6.2	Bacterias Mesófilas Aerobias	50
6.2.1	Macerado de acociles crudos	50
6.2.2	Agua de lavado de acociles crudos	51
6.2.3	Agua de embalse de acociles crudos	51
6.2.4	Macerado de acociles cocidos	53
6.2.5	Agua de lavado de acociles cocidos	54
6.3	Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.	55
6.4	Bacterias asociadas	55
6.4.1	Bacterias aisladas con mayor frecuencia	55
6.4.2	Bacterias aisladas en acocil asociadas a enfermedades en humanos	57
6.4.3	Bacterias aisladas en acocil asociadas a enfermedades en crustáceos	64
6.4.4	Bacterias aisladas en acociles cocidos	65
7.0	Conclusiones	67
8.0	Referencias	69

RESUMEN

ÁVILA SOLÍS MARÍA DE LA LUZ FABIOLA, Determinación de la Calidad Microbiológica del Acocil *Cambarellus montezumae*. Bajo la dirección de: Dra. Rosa Elena Miranda Morales.

Con el fin de determinar la calidad microbiológica de los acociles crudos, procedentes de La Presa de Atlangatepec, Lagunas de Zempoala, y de los acociles cocidos del Mercado de San Juan, México D.F., se tomaron las especificaciones de las normas para crustáceos debido a que no existen lineamientos normativos para el acocil y así establecer un panorama microbiológico del *Cambarellus montezumae* que es un organismo potencialmente explotable en beneficio de la sociedad. Se procesaron 10 muestras de acociles crudos y 6 de acociles cocidos, las cuales se incubaron a 37°C y a temperatura ambiente para cuantificar bacterias coliformes totales (número más probable), mesófilas aerobias y aislamiento de *Salmonella* spp., así como también el aislamiento e identificación de bacterias asociadas. Resultando que el 80% (temperatura ambiente) de las muestras de macerado de acociles crudos, y el 40% (37°C), no cumplen con la especificación sanitaria de la NOM-242-SSA1-2009 (400NMP/g) para bacterias coliformes. En acociles cocidos, 1 muestra no cumplió con la cuantificación de la NOM-093-SSA1-1994 que indica <10 NMP/g de coliformes. El total de las muestras de acociles crudos cumplen con el límite que establece la NOM-242-SSA1-2009 (10 000 000 UFC/g) para bacterias mesófilas aerobias. En acociles cocidos, el 83.3% no cumplen con el límite de la NOM-093-SSA1-1994 (150 000 UFC/g). No se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en todas las muestras analizadas de acociles crudos y cocidos. Se logró el aislamiento

en los acociles crudos de las siguientes bacterias: *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus* coagulasa negativo., estos microorganismos no representan un riesgo directo a la salud del consumidor, debido a que los acociles se consumen cocidos, sin embargo la presencia de estas bacterias en el agua de embalse representa un indicador de la calidad del agua y un riesgo indirecto para el pescador o comercializador de estos organismos. En los acociles cocidos se aisló *Aeromonas* spp. y *Staphylococcus* coagulasa negativo, consideradas de riesgo en salud pública, estos microorganismos presentes en el alimento son indicadores de un manejo, almacenaje y preservación inadecuados.

1.-INTRODUCCIÓN

...De los renacuajos y otras sabandijas del agua que comen estos naturales: hay unos animalejos en el agua que se llaman acocili, son casi como camarones, tienen la cabeza como langostas, son pardillos y cuando los cuecen se ponen colorados, son de comer cocidos y también tostados (Fray Bernardino de Sahagún, 1829).

1.1 HISTORIA

Una de las principales fuentes de alimentos para la humanidad durante todas las épocas han sido la cantidad de especies faunísticas extraídas de los cuerpos de agua, lo que ha originado una explotación de ellas a lo largo de la historia a fin de satisfacer las necesidades alimentarias de la población humana (Morones, 1991).

Uno de estos productos es el “acocil”, cuyo nombre procede del náhuatl acocilin: atl.- agua; cocil: radical de coci, que connota la idea de un camarón pequeño de agua dulce.

En México el acocil fue una importante fuente nutricional para la parte central y sur desde la época prehispánica, antes de la conquista, estos animales eran consumidos por los aztecas (Villalobos, 1943), pero en la actualidad ya no se consiguen con la facilidad de antes, debido a que su captura sin control y los cambios en las condiciones ambientales ha disminuido sus poblaciones por lo que se requiere medidas biotecnológicas adecuadas para evitar su desaparición (Palacios, 2003).

Hay registros del siglo XVI donde estos organismos se utilizaban como intercambio comercial.

De la misma manera tuvieron importancia en la época de la post revolución, dado que eran una fuente segura de alimento por su gran abundancia en ríos y chinampas y debido a que eran apreciados por su sabor, además de su gran comercialización en el mercado (García, 1991).

El acocil *Cambarellus montezumae*, es endémico de la zona central de México y la zona lacustre de Xochimilco, se le conoce desde los primeros asentamientos indígenas en las orillas del gran lago del Valle de México y fue parte importante de la dieta de nuestros antepasados. Actualmente es una especie comestible de gran demanda en el mercado nacional, no solo por su sabor sino por su alto contenido proteínico, de ahí parte la importancia de estudiar y preservar la especie (Santiago, 2001).

1.2 ANTECEDENTES

Los primeros estudios de los cambáridos en México los llevo a cabo Villalobos (1943) quien publicó el estudio “ Los Cambáridos Mexicanos I”, posteriormente el mismo autor describe una nueva especie (1948), durante las siguientes décadas describe diversas especies localizadas en diferentes estados de la república.

En 1959 Cantú realiza un estudio sobre la “Embriología de *Cambarellus montezumae*”. En 1976 Rosas realizo un trabajo del acocil del lago de Pátzcuaro “*Cambarellus montezumae patzcuarensis*”.

Hofman en 1983 publico el libro: “Así se crían los cangrejos de río: biología, mantenimiento e importancia económica”, donde realiza una descripción general del acocil. En 1989, Pérez, da a conocer información sobre el ciclo biológico del

acocil en un estudio que se llevo a cabo en la presa de Atlangatepec. En 1990 Inclán *et al*, estudiaron la reproducción en cautiverio y conducta reproductiva de acociles de la especie *Procambarus bouvieri*. Rodríguez (1991) realizo estudios sobre el balance energético del acocil. Por su parte Morones (1991) realizó estudios de aspectos reproductivos del acocil *Cambarellus montezumae* en condiciones de laboratorio.

En el instituto de Biología de la UNAM se ha contribuido con estudios que han incrementado el número de especies nuevas, han dado datos sobre patrones de distribución, relaciones filogenéticas y aspectos biológicos (Rojas *et al*, 2003).

En 2007 Sánchez realizo un estudio llamado “Aprovechamiento de los Ambientes reducidos en los canales de Xochimilco para el cultivo del acocil *Cambarellus montezumae*, para consumo humano”, en el que realizan estudios sobre la carga bacteriana del sedimento y de este organismo y verifican que este dentro de los limites permitidos par aprovecharlo para el consumo humano.

1.3 GENERALIDADES DE LA ESPECIE

Las especies silvestres como es el caso el acocil, presentan posibilidades de explotación que no han sido debidamente valoradas por la sociedad actual, que tienden a guiarse en sus preferencias por efecto de la propaganda, consumiendo cada vez menos alimentos naturales que podrían obtener a un costo reducido, el análisis de estas posibilidades puede dar resultados ecológico y económicamente aceptables (Hopcraft, 1980).

El acocil es un pequeño crustáceo decápodo de 30 a 50 mm (figura 1) de aspecto robusto comparado con otras especies del género: los adultos tienen un caparazón más consistente que los jóvenes. Las hembras son de mayor tamaño que los machos y presentan una estructura llamada annulus ventralis, el cual es el receptáculo seminal, también se distinguen de ellos porque su abdomen es muy ancho y más corto, los machos cuentan con una estructura llamada petesma considerado su órgano sexual externo (Hobbs, 1988). Su reproducción se efectúa durante todo el año, es de desarrollo lento con cópula y fecundación interna, su madurez sexual la alcanza a los 2 años de edad (Villalobos, 1943).

Los cangrejos de río o acociles son omnívoros, cuando el alimento escasea pueden llegar a utilizar el canibalismo, y también consumen materia en descomposición (Santos, 2002).

Las investigaciones sobre requerimientos nutricionales son relativamente recientes, no habiéndose llegado a soluciones definitivas que puedan resolver los problemas que plantea una explotación comercial.

Son de hábitos nocturnos, tolerantes a la baja calidad del agua, son capaces de vivir en lugares con un alto nivel de materia orgánica en descomposición (Sánchez, 2007).

Los acociles son de los pocos crustáceos que habitan los arroyos y depósitos lacustres continentales por lo que son considerados organismos cosmopolitas ya que han logrado distribuirse en todos los continentes, en cuerpos de agua dulce lóticos, lénticos o hipogeos. Viven tanto en climas templados como tropicales, por lo que son los miembros más importantes, grandes y longevos de las comunidades macrobentónicas dulceacuícolas, y por lo mismo, han invadido una

gran cantidad de hábitats, ya que resisten cambios de humedad y temperatura, sus características fisiológicas les permiten adaptarse a variaciones climáticas extremas, asimismo presentan una gran capacidad de asegurar la reproducción y supervivencia de su progenie frente a situaciones catastróficas (Gutiérrez, 1997).

Es importante tomar en cuenta que además de ser una especie que puede aprovecharse por las características ya conocidas, también es una especie que se debe conservar, ya que no sólo en México sino en otros países, hay un decremento en las poblaciones de los acociles, mayor depredación, menor sobrevivencia de crías; debido a la introducción de otras especies, por la pérdida de sus hábitats, la contaminación de estos y la sobre-explotación que en algunos lugares sufren.

Las investigaciones que se realizan en nuestro país sobre los acociles abarcan aspectos de respuestas fisiológicas muy particulares, sin embargo, estos reportes no abordan de manera directa el problema de la utilización del acocil como fuente alimenticia o comercial (Rosas 1976).

1.3.1 TAXONOMIA

Huner (1989) ha reconocido tres familias; *Astacidae*, *Parastacidae* y *Cambaridae*, siendo esta última la más diversificada y la de mayor importancia económica con los géneros *Cambarus*, *Orconectes* y *Procambarus*.

Los Cambáridos mexicanos están representados por unas 37 a 40 especies conocidas, entre las que destacan las pertenecientes a los géneros *Procambarus* y *Cambarellus*, de los cuales *Cambarellus montezumae* es la más representativa

del género *Cambarellus* por su gran abundancia y amplia distribución en la planicie central de México (Hobbs, 1991).

Clasificación Taxonómica

Según: Hickman *et al*, 1992 y Hobbs, 1988.

Phylum.- *Arthropoda*

Subphylum.- *Mandibulata*

Superclase.- *Crustacea*

Clase.- *Malacostraca*

Subclase.- *Eumalacostraca*

Superorden.- *Eucarida*

Orden.- *Decapoda*

Suborden.- *Pleocyemata*

Infraorden.- *Astacidea*

Superfamilia.- *Astacoidea*

Familia.- *Cambaridae*

Sub familia.- *Cambarellinae*

Género y Especie.- *Cambarellus montezumae*

1.4 DISTRIBUCIÓN

El acocil es un invertebrado dominante en el macrobentos, y tiene distribución cosmopolita, ya que se encuentra en ambientes con diversas temperaturas (Gutiérrez, 1997).

Los acociles pertenecientes a la familia Cambaridae y Astacidae están ampliamente distribuidos en todos los continentes, incluyendo África (Pillay, 1997). Existen aproximadamente 300 especies de éstos crustáceos en el mundo de las cuales se registran 275 en América del norte, las cuales han alcanzado gran importancia comercial, puesto que poseen una alimentación muy variada y son organismos con una gran resistencia a cambios de humedad. Se cultivan en Francia donde se han desarrollado técnicas para tal fin desde 1980; así como en la Unión Soviética y en Estados Unidos, particularmente en el estado de Lousiana, en el que se han registrado 29 especies de las que sólo dos se cultivan a gran escala, “el acocil rojo” *Procambarus clarkii* y el “acocil blanco” *Procambarus blandigi*. En los años 60 comenzaron en España los primeros intentos de aclimatación de varias especies Europeas y americanas con diferente éxito (Abrahamsson, 1973).

Las especies del género *Cambarellus* se encuentran distribuidas a lo largo del centro de México, desde el Estado de Puebla, hasta el estado de Jalisco (Villalobos 1943).

El acocil es aprovechado para autoconsumo, se captura todo el año y se combina y alterna con los alimentos de campo, haciendo de este un platillo con alto

contenido proteico y con bajo costo (González, 1989; Rodríguez, 1991) (en las tablas 1, 2 y 3 podemos observar el contenido proteico del acocil)

CONTENIDO NUTRICIONAL DEL MÚSCULO DEL ACOCIL	
Agua	80 - 83%
Proteínas	7 – 17%
Lípidos	0.5 – 2.8%
Calorías	732 – 4336 cal/kg

Tabla 1.- Contenido Nutricional del músculo del acocil *Cambarellus montezumae* (tomado de Gil y Alba, 2002).

Nutrimento	% Acocil
Proteínas	62.12
Grasa	6.27
Cenizas	16.93
Fibra	7.90

Tabla 2.- Análisis químico proximal de acociles colectados de Xochimilco incluyendo exoesqueleto, hepatopáncreas y cabeza (Sánchez, 2007).

Peso de la muestra húmeda	33.94 g
Peso de agua evaporada	27.94 g
% de humedad de la muestra	33.94 g
% materia seca	19.16 g
Peso de la grasa	0.111 g
% Grasa cruda (B.S.)	5.5 %
% Grasa cruda (B.H.)	1.06 %
% Nitrógeno	8.72 %
% Proteína Cruda (B.S.)	54.53 %
% Proteína Cruda (B.H.)	10.54 %
Peso de la Muestra	1.0
Peso de cenizas	0.2199 g
% Cenizas (B.S.)	21.99 %
% Cenizas (B.H.)	4.21 %
% Materia Orgánica	78.01 %

Tabla 3.- Análisis Bromatológico del Acocil de la Presa de Atlangatepec, Tlaxcala¹

¹ Tomado de: González Rosas G. 1989. UAM Xochimilco

1.5 IMPORTANCIA DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA

En general las enfermedades transmitidas por alimentos, la mayoría de las cuales son de origen microbiano, constituyen uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, donde los alimentos y el agua contaminada son fuentes

importantes de contagio. En México durante el período de 1980 a 1989 el Laboratorio Nacional de Salud Pública confirmó 58 brotes de infecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario a nivel nacional, la Secretaría de Salud informó que en el período de los años 1993-97, de 2,95 millones de personas enfermas por las causas antes descritas, tuvo lugar un promedio anual de 10 300 defunciones, además de cuantiosos gastos en atención médica y pérdidas económicas y laborales, en el año 2002 el Sistema Nacional de Información en Salud reportó a nivel nacional 3612 casos de intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano (Adams, 1997. ICMSF, 2000. FAO, 2001).

Algunos estudios realizados confirman la existencia de géneros bacterianos involucrados en toxiinfecciones alimentarias asociadas al consumo de mariscos, entre las bacterias involucradas se encuentran las bacterias de origen fecal y algunas de flora endógena en las cuales se encuentran las bacterias del género *Vibrio* (Graü, et al , 2004).

En el caso de los acociles cocidos, han pasado por un proceso de cocción, por lo cual la carga bacteriana disminuye, y encontrar altas cantidades de bacterias representa un riesgo potencial en la salud pública.

Aunque en México no se ha desarrollado la producción a gran escala de esta especie, y no existe una normativa específica es importante tomar en cuenta parámetros de calidad sanitaria ya que los acociles son extraídos e incluso producidos en embalses naturales, y es necesario saber si son aptos para consumo humano.

Una norma oficial mexicana que regule a estos productos desde el punto de vista sanitario, permite promover el consumo de los mismos y a la vez proteger la salud del consumidor.

Las bacterias presentes en un alimento son indicadores de calidad y con esto se declara si son o no aptas para el consumo humano. La NOM-242-SSA1-2009. Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba, nos da algunas especificaciones microbiológicas para calidad sanitaria dentro de las cuales se contemplan mesófilas aerobias, NMP (número más probable) de coliformes fecales, entre otros.

En algunos alimentos, la identificación de una concentración elevada de coliformes fecales es indicador de su contaminación fecal y mala manipulación, esto indica, que el alimento en cuestión es No Apto para el Consumo Humano, si sobrepasa los límites establecidos.

El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. (NOM-113-SSA1-1994).

El recuento de organismos mesófilos se utiliza como prueba de la calidad microbiológica de los alimentos excepto cuando se sabe que contienen grandes cantidades de bacterias como consecuencia natural de su preparación. (Adams, 1997). Los microorganismos pueden causar alteraciones no deseables que

pongan en riesgo la salud del consumidor. Además que la mayoría de las bacterias patógenas se encuentran dentro de la clasificación de las mesófilas.



Figura 1.- Acocil *Cambarellus montezumae*

2 HIPÓTESIS.

Las muestras procesadas de Acociles (*Cambarellus montezumae*) crudos y cocidos, no cubren la especificación microbiológica de calidad sanitaria para consumo humano establecido por las Normas Oficiales Mexicanas; NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos, y la NOM-242-SSA1-2009. Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de microorganismos coliformes totales, *Salmonella*, mesófilos aerobios y bacterias asociadas en *Cambarellus montezumae* (acocil), realizando los procedimientos generales de cuantificación, aislamiento e identificación bioquímica en macerado, agua de lavado y agua de embalse incubando a dos temperaturas (temperatura ambiente y 37°C), para poder aseverar la calidad microbiológica de este crustáceo como alimento para consumo humano.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

-Determinar la presencia de coliformes totales por la técnica número más probable (NMP) a partir de macerado, agua de lavado de acocil y muestra del embalse (lago), incubando a dos temperaturas (temperatura ambiente y 37°C).

-Cuantificar bacterias mesófilas aerobias a partir de macerado, agua de lavado de acocil y muestra del embalse, a dos temperaturas de incubación (temperatura ambiente y 37°C).

-Determinar presencia o ausencia de *Salmonella* spp en medios de cultivo enriquecidos, selectivos y diferenciales para el aislamiento y tipificación bioquímica a partir de macerado, agua de lavado de acocil y muestra embalse (temperatura ambiente y 37°C).

-Aislamiento e identificación de bacterias asociadas a partir de macerado y agua de lavado de acocil (temperatura ambiente y 37°C).

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 ÁREAS DE MUESTREO

Los acociles utilizados en el presente estudio fueron extraídos de dos cuerpos de agua: el primero es la Presa de Atlangatepec o San José Atlanga (figura 2), se construyó para utilizar las aguas del río Zahuapan. Este embalse se haya ubicado a 37 kilómetros al norte de la ciudad de Tlaxcala, en el municipio de Atlangatepec; su ubicación geográfica está dada por las siguientes coordenadas 19° 32'00'' latitud norte y 98° 12'43'' longitud oeste. Clima subhúmedo con lluvias deficientes en invierno (Pérez, 1996). El segundo embalse de donde se obtuvieron los acociles es del Parque Nacional Lagunas de Zempoala (figura 3), pertenece al corredor ecológico Ajusco-Chichinautzin, está ubicado entre los límites del Estado de México y el de Morelos. Coordenadas geográficas; Estado de Morelos: el parque se encuentra entre los paralelos 19° 01' 20" y 19° 06' de latitud norte y los meridianos 99° 16' 20" y 99° 21' de longitud oeste. Altitud de 2670 m a 3686 m. sobre el nivel del mar. Clima templado frío integrado por bosques de coníferas.

Los acociles cocidos se obtuvieron del "Mercado de San Juan", oficialmente llamado "Ernesto Pugibet", ubicado en la calle del mismo nombre, Colonia Centro, Delegación Cuauhtémoc, Distrito Federal.



Figura 2 y 3.- Áreas de estudio de donde provienen las muestras; a la izquierda Presa de Atlangatepec, Tlaxcala y a la derecha Lagunas de Zempoala

4.2 MUESTRAS

Acociles vivos

Las muestras de Acociles vivos (*Cambarellus montezumae*) (figura 4) fueron obtenidas principalmente de dos zonas geográficas, Presa de Atlangatepec, ubicada en el estado de Tlaxcala y Lagunas de Zempoala, ubicadas en los límites del Estado de Morelos y Estado de México.



Figura 4.- Acociles capturados vivos en Tlaxcala.

Acociles cocidos.

Los acociles cocidos (figura5) se obtuvieron en el Mercado de San Juan ubicado en El Distrito Federal, de dos locales comerciales.



Figura 5.- Acociles cocidos adquiridos en el Mercado de San Juan

Obtención de las muestras

Los acociles fueron capturados vivos, se transportaron a temperatura de 4°C en recipientes cerrados con agua del embalse de donde fueron recolectados, en el laboratorio se conservaron en congelación a -20°C, temperatura que permite preservar a los microorganismos presentes en la muestra y sirve como una forma de sacrificio eutanásico, con este método el sistema nervioso se vuelve inactivo, hay pérdida de la conciencia y posteriormente la muerte (Remfry, 1986) además el proceso de congelación facilita la maceración de la muestra.

Los acociles cocidos, se transportaron en bolsas de plástico a 4°C y se conservaron en congelación a -20 °C.

4.3 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES POR LA TÉCNICA DE NÚMERO MÁS PROBABLE

- 1.- Se pesaron 10 g de acociles (*Cambarellus montezumae*) en un recipiente estéril.
- 2.- La muestra se lavó por tres ocasiones con agua destilada estéril para obtener bacterias de superficie corporal.
- 3.- Se maceró la muestra en un mortero estéril (figura 6).
- 4.- Se depositaron los 10g de macerado en 90 ml de agua peptonada, se homogenizó y se dejó reposar 10 min (figura 7).
- 5.-Se realizaron diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-5} en tubos con 9 ml de agua peptonada.
- 6.- Se inoculó 1 ml de cada dilución en tres tubos de caldo lactosado simple con tubo de Durham invertido (3 tubos por dilución en total son 15 tubos inoculados de caldo lactosado simple).
- 7.- Se incubaron a 37°C y a temperatura ambiente (22 a 25°C) por 24-48 hs.
- 8.- Se observó la producción de gas en los tubos de caldo lactosado con tubo de Durham invertido.
- 9.- Se confirmó la presencia de coliformes: eligiendo al azar y sembrando por estría continua uno de los tubos con producción de gas (véase punto 8) en agar Mac Conkey para observar las colonias típicas fermentadoras.
- 10.-Se confirmó la producción de gas sembrando una de estas colonias en tubos con caldo lactosado simple con tubo de Durham invertido.

11.-Se eligió la dilución más alta en la que los tres tubos de la dilución fueron positivos a la formación de gas y las dos diluciones superiores más próximas.

12.-Se determinó la presencia coliformes por la técnica de NMP buscando en la tabla de la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for foods) (tabla 4).

Número de positivos en cada Dilución			Límites de confianza				
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³	NMP por gramo	99%		95%	
0	1	0	3	<1	23	<1	17
1	0	0	4	<1	28	1	21
1	0	1	7	1	35	2	27
1	1	0	7	1	36	2	28
1	2	0	11	2	44	4	35
2	0	0	9	1	50	2	38
2	0	1	14	3	62	5	48
2	1	0	15	3	65	5	50
2	1	1	20	5	77	8	61
2	2	0	21	5	80	8	63
3	0	0	23	4	177	7	129
3	0	1	40	10	230	10	180
3	1	0	40	10	290	20	210
3	1	1	70	20	370	20	280
3	2	0	90	20	520	30	390
3	2	1	150	30	660	50	510
3	2	2	210	50	820	80	640
3	3	0	200	<100	1900	100	1400
3	3	1	500	100	3200	200	2400
3	3	2	1,500	200	6400	300	4800

Tabla 4.- NMP de Bacterias Coliformes, cuadro para lectura de Resultados

Multiplicar el NMP por el factor adecuado: si los tubos seleccionados corresponden a 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , multiplicar por 10; si las diluciones son 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , multiplicar por 100.

- El agua obtenida del lavado de la muestra de acociles y el agua colectada de lago se les realizó el mismo procedimiento del NMP (NOM-242-SSA1-2009, NOM-110-SSA1-1994, NOM-112-SSA1-1994, ICMSF, 2000, Rolani, 1997).



Figuras 6 y 7. Procesamiento de la maceración de Acociles cocidos para la Técnica de NMP de bacterias coliformes

4.4 RECuento DE BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS EN PLACA

1.- Se tomaron 80 μ l de cada una de las diluciones realizadas en el procedimiento para determinar NMP (10^{-1} a 10^{-5}).

2.- Se inocularon en placas de TSA (agar tripticasa soya) 4 gotas de 20 μ l por dilución.

3.- Se incubaron a 37°C y a temperatura ambiente 20 -25°C de 24 a 48 hs.

4.- Se observó el agar y en la dilución donde las colonias estaban más separadas se realizó conteo de colonias.

5.- Después de contar las colonias en cada gota se obtuvo un promedio haciendo una suma del total de colonias dividiendo entre el número de gotas inoculadas.

6.- Este resultado se multiplico por un número que multiplicado por el volumen utilizado de como resultado la unidad, aquí se obtuvo el número de bacterias viables por cada ml.

7.- A este resultado se le agrego el número de ceros que indica el factor de la dilución utilizada para hacer la cuenta.

8.- Este procedimiento se realizó para el macerado, el agua de lavado y el agua colectada de lago (la metodología utilizada fue tomada del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, basándose en las siguientes referencias; NOM-029-SSA1-1993, NOM-092-SSA1-1994 NOM-110-SSA1-1994, ICMSF, 2000, Rolani, 1997).

4.5 AISLAMIENTO DE *Salmonella* spp.

1.- Se pesaron 25 g de acociles.

2.- Se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril.

3.- Se maceró en un mortero estéril.

4.- El macerado se depositó en 225 ml de caldo lactosado simple, se homogenizó e incubó a temperatura ambiente 6 hs

5.- Posteriormente se incubó a 42° C por 24 hs.

6.- Se transfirieron 2ml a 18 ml de caldo selenito y se incubaron a 42 °C por 24 hs.

7.- Se sembró en agar Verde Brillante y Mac Conkey, se incubaron a 37 °C de 24 a 48 hs.

8.- Se realizaron resiembras cada 48 hs por 3 ocasiones.

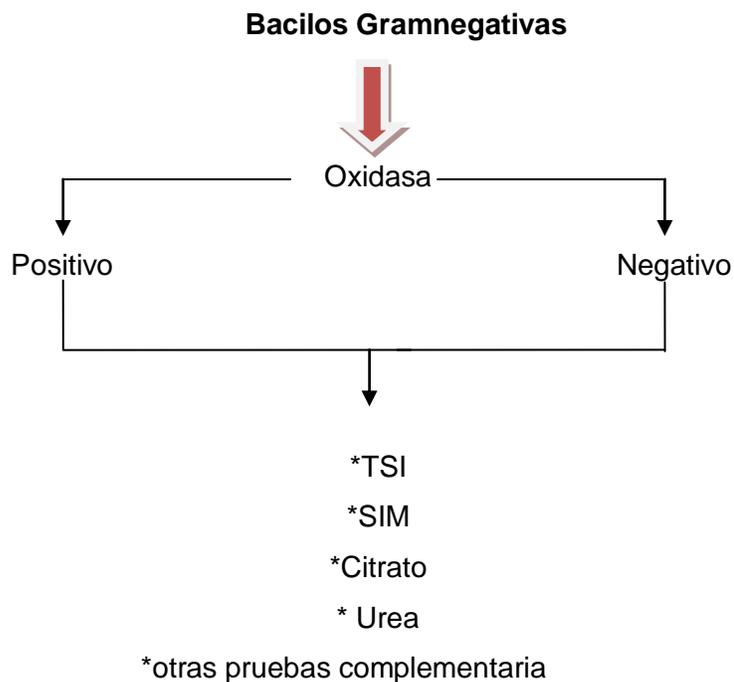
9.- Las colonias con características morfológicas típicas de *Salmonella* spp (es decir en este caso buscamos colonias no fermentadoras en ambos agares) se identificaron bioquímicamente (NOM-110-SSA1-1994, ICMSF, 1983, Rolani, 1997, NOM-114-SSA1-1994, Elliott, 1983).

10.-El agua de lavado y el agua colectada de la laguna se inocularon cada uno de ellos en el Caldo Selenito en una proporción uno a uno, se incubaron a 42 °C por 48 hs. La metodología a seguir fue la misma que para el macerado.

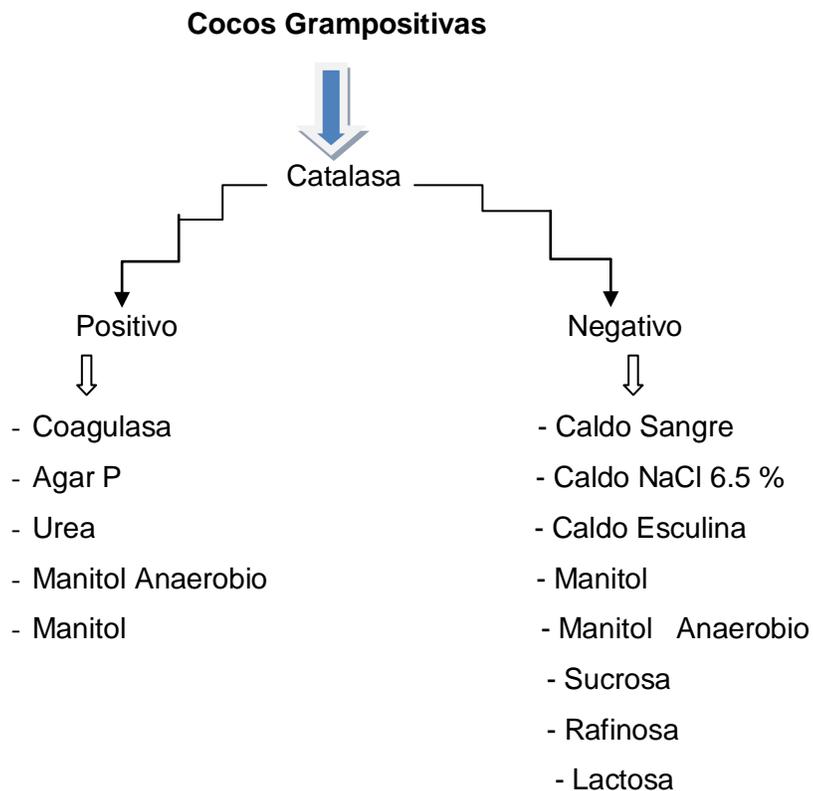
4.6 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS ASOCIADAS

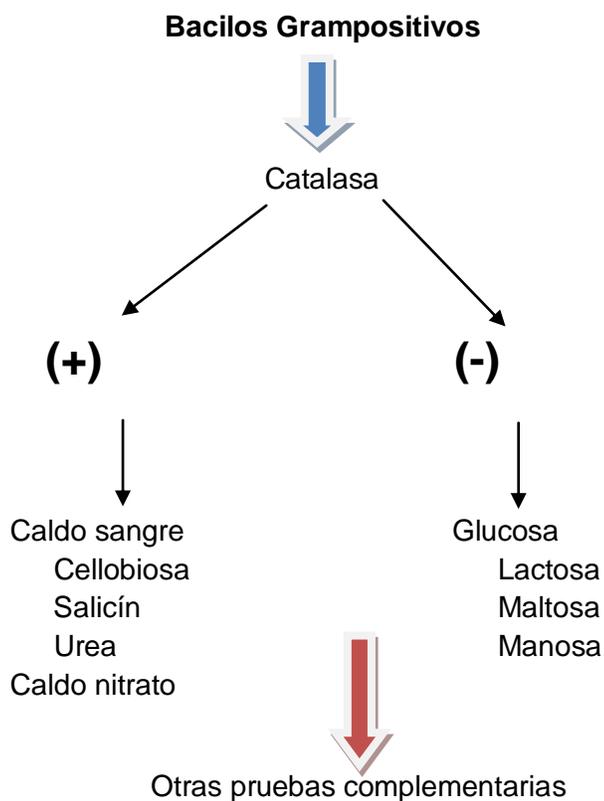
El macerado, al igual que el agua de lavado y el agua recolectada de la laguna se sembraron en agar sangre y agar Mc Conkey, se incubaron a 37°C por 24 hs, a las colonias aisladas se realizaron las pruebas correspondientes para llegar a la identificación, según las metodologías indicadas en los esquemas 1, 2 y 3 (Davis, 1996, Carter ,1990 y Barrow, 1993).

Esquema 1.- Procedimiento para la identificación de Bacilos GRAM (-)



Esquema 2. Procedimiento para la identificación de cocos GRAM (+)





4.7 AISLAMIENTO DE *Mycoplasma* spp.

Se utilizó el medio Hayflick modificado que contiene, 70 ml de medio base PPLO, 10 ml de extracto de levadura fresca, 20 ml de suero de equino inactivado, 1 ml de dextrosa, 0.25 ml de rojo de fenol como indicador de pH, 1 ml de penicilina 100 000 U.I. De la dilución en agua peptonada se tomaron 200 µl y se depositaron en un tubo con 1.8 ml con medio Hayflick, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^3 , se colocaron 30 µl de la muestra en medio semisólido Hayflick, se incubaron a 37°C en aerobiosis y microaerobiosis respectivamente, las lecturas se realizaron cada 48 hs en medio sólido y cada 24 hs en líquido, comparando con el control para observar un cambio de pH. Cuando se apreciaron colonias sugerentes a

micoplasmas (morfología de huevo frito) se realizó la triple clonación para la purificación de las mismas y se llevó a cabo la identificación por medio de pruebas bioquímicas, cuando no se presentó tal morfología se realizaron pases semanales para permitir el desarrollo del microorganismo o bien para dar la muestra como negativa después de 4 pases (Whitford, 1994).

4.8 PRUEBA ESTADÍSTICA

El análisis estadístico se corrió con el programa SPSS Versión 16. Para comparar conteos de coliformes y mesófilas entre lugares se utilizó la Prueba de Man-Witney U. Para la comparación de conteos de macerado de acociles, agua de lavado y agua de embalse entre las dos temperaturas de incubación que a las que se incubaron las diferentes muestras (Temperatura ambiente y 37°C) se utilizó la suma de rangos de Wilcoxon.

5 RESULTADOS

Se procesaron 16 muestras, 10 muestras totales fueron de acociles crudos, cinco provenientes de Tlaxcala y cinco de las Lagunas de Zempoala, de las cuales se trabajo el agua de lavado, el agua de embalse y el macerado, a dos temperaturas 37°C y temperatura ambiente (TA) (22 a 25°C) y las 6 muestras restantes fueron de acociles cocidos, adquiridas en el Mercado de San Juan, en las cuales se proceso el agua de lavado y el macerado únicamente, de igual manera a las dos temperaturas antes mencionadas.

5.1 BACTERIAS COLIFORMES

5.1.1 Macerado de acociles crudos

TLAXCALA

De las cinco muestras de macerado obtenidas en la Presa de Atlangatepec, Tlaxcala, procesadas a temperatura ambiente el 80% (4/5) rebasaron el límite permitido por la NOM-242-SSA1-2009, que es de 400NMP/g de bacterias coliformes. Mientras que en las procesadas a 37°C el 60% (3/5) presentaron conteos por arriba del límite establecido por la misma norma.

Los conteos de bacterias coliformes en muestras de macerado incubadas a temperatura ambiente provenientes de Tlaxcala fueron; mínimo de 230 y máximo de 50,000 NMP/g, y para las incubadas a 37°C el mínimo de bacterias coliformes fue de 40 y el máximo de 9,000 NMP/g.

Otro de los objetivos fue el comparar si el número de coliformes se veía afectado por la temperatura de incubación, para el macerado no hubo diferencia significativa ($P=0.686$).

Comparando el número de bacterias coliformes entre macerado y agua de lavado incubadas a temperatura ambiente ($P=0.345$) y 37°C ($P=0.5$), no se encontró diferencia significativa

LAGUNAS DE ZEMPOALA

En las muestras de macerado procesadas a temperatura ambiente obtenidas de las lagunas de Zempoala el 80% (4/5) arrojaron conteos por arriba del límite de 400NMP/g de bacterias coliformes permitido por la NOM-029-SSA1-1993, en las muestras incubadas a 37°C , el 20% (1/5) están por encima del límite que establece la norma. El conteo mínimo de bacterias coliformes para las muestras incubadas a temperatura ambiente es de 0 y el máximo es de 21000 NMP/g, en las incubadas a 37°C el conteo mínimo y el máximo son similares a los de temperatura ambiente.

No se encontró diferencia significativa en los conteos de bacterias coliformes al comparar las muestras de macerado incubadas a temperatura ambiente y las incubadas a 37°C ($P=0.593$).

La comparación entre macerado y agua de lavado a partir de muestras de acociles provenientes de las Lagunas de Zempoala incubadas a temperatura ambiente ($P=0.715$) y a 37°C ($P=0.465$), no mostro diferencia estadísticamente significativa.

Se realizó una comparación de los conteos de bacterias coliformes en muestras de macerado, entre los dos sitios de muestreo (Tlaxcala y Lagunas de Zempoala), incubadas temperatura ambiente ($P= 0.151$) y 37°C ($P=0.310$), para agua de

lavado incubada a temperatura ambiente ($P=0.222$) y a 37°C ($P=0.095$) y para agua de embalse incubada a temperatura ambiente ($P=0.905$) y a 37°C ($P=0.413$), y no se encontró evidencia estadística que indicará diferencia significativa del número de coliformes entre los dos sitios.

5.1.2 Agua de lavado a partir de acociles crudos

TLAXCALA

Para las 5 muestras de agua de lavado incubadas a temperatura ambiente, el conteo mínimo de bacterias coliformes fue de 3 y el máximo de 21 000 NMP/100ml, mientras que en las muestras incubadas a 37°C el mínimo fue de 15 y el máximo de 50 000 NMP/100ml. Al realizar la comparación de las muestras de agua de lavado incubadas a las 2 temperaturas se encontró una diferencia significativa ($P=0.043$).

LAGUNAS DE ZEMPOALA

El conteo mínimo de bacterias coliformes de las muestras de agua de lavado provenientes de las Lagunas de Zempoala e incubadas a temperatura ambiente, fue de 90 y el máximo de 400 NMP/100ml, para las muestras incubadas a 37°C , el conteo mínimo de bacterias coliformes fue de 4 y el máximo de 7 000 NMP/100ml. No se encontró ninguna diferencia estadística en el agua de lavado incubada a temperatura ambiente y 37°C ($P>0.05$).

Al realizar una comparación para las muestras de agua de lavado entre los dos sitios de muestreo (Tlaxcala y Lagunas de Zempoala) no se determinó alguna diferencia significativa entre los dos sitios ($P=0.310$).

5.1.3 Agua de Embalse a partir de acociles crudos

TLAXCALA

Se trabajaron 4 muestras de agua de embalse provenientes de Tlaxcala, las muestras que fueron incubadas a temperatura ambiente presentaron un conteo mínimo de 40 y un conteo máximo de 151 NMP/100ml. Y en las muestras que fueron incubadas a 37°C presentaron un conteo mínimo de bacterias coliformes de 9 y un conteo máximo de 900 NMP/100ml.

Al realizar el análisis estadístico no se observó una diferencia significativa entre las dos temperaturas a las cuales se incuban las muestras (temperatura ambiente y 37°C) ($P= 0.465$).

LAGUNAS DE ZEMPOALA

Se trabajaron 5 muestras de agua de embalse de las Lagunas de Zempoala, las cuales presentaron desde ausencia de bacterias coliformes hasta un conteo máximo de 900 NMP/100ml para las incubadas a temperatura ambiente y para las incubadas a 37°C también se reportó desde ausencia hasta un conteo máximo de 1500 NMP/100ml.

El análisis estadístico no indicó una diferencia significativa al realizar una comparación de los conteos de bacterias coliformes incubadas a dos temperaturas ($P= 0.465$).

Se observó una gran variabilidad en el número de bacterias coliformes en las muestras provenientes de dos sitios de muestreo (Tlaxcala y lagunas de Zempoala), incubadas a dos temperaturas (temperatura ambiente y 37°C), esto atribuido al número de muestra tan pequeño. Al realizar una comparación

estadística entre ambos sitios no se encontró diferencia significativa ($a>0.05$) (tabla 5).

Lugar	Temperatura Ambiente			Temperatura 37°C		
	Macerado	Agua de lavado	Agua de Embalse	Macerado	Agua de lavado	Agua de Embalse
Tlaxcala	11446±9661.21 (n=5) a	4860.60±4048.72 (n=5) a	75.00±25.98 (n=4) a	3670±1831.82 (n=5) a	12743±9434.3 (n=4) a	604.50±364.97 (n=4) a
Lagunas de Zempoala	4292.6±4177.5 (n=5) a	300±64.10 (n=5) a	231.80±295.37 (n=5) a	3975.4±2154.01 (n=5) a	12743±9434.326 (n=4) a	604.50±320.40 (n=5) a

Tabla 5. Media y error estándar de bacterias coliformes en muestras de acociles crudos. (a) $P > .05$

5.1.4 Macerado de Acociles cocidos

En el caso de los acociles cocidos obtenidos en el mercado de San Juan ($n=6$), el valor mínimo de coliformes encontrado en las muestras de macerado fue de cero y el máximo de 700 NMP/g a temperatura ambiente y a 37°C fue de cero en todas las muestras, por lo que 16%(1/6) de las muestras incubadas a temperatura ambiente, arrojaron resultados por encima del límite que marca la NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos, la cual nos indica que el número de bacterias coliformes en la muestra debe ser <10 NMP/g (figura 8). Al comparar el número de coliformes en muestras de macerado entre ambas temperaturas no se encontraron diferencias significativas ($P=0.18$).

El número de colonias coliformes en el agua de lavado de los acociles cocidos fue de cero, tanto a temperatura ambiente como a 37°C.

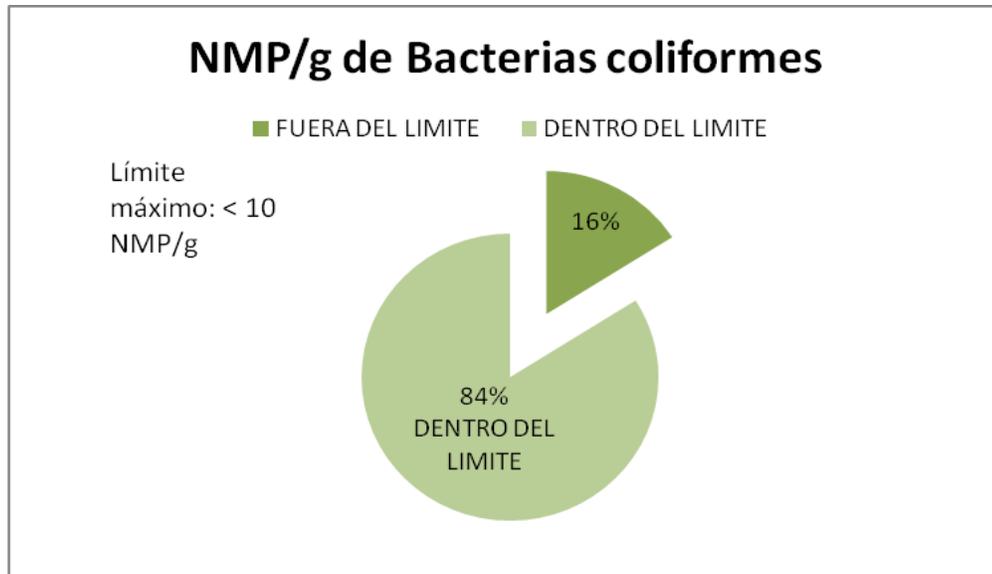


Fig. 8.- Porcentaje de Bacterias coliformes en macerado de acociles cocidos, adquiridos en el mercado de San Juan.

5.2 MESÓFILAS AEROBIAS

5.2.1 Macerado de acociles crudos

TLAXCALA

Todas las muestras de macerado procesadas para mesófilas aerobias presentaron conteos por debajo del límite permitido por la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009 (10 000 000 UFC/g). Los conteos que presentaron las muestras incubadas a temperatura ambiente fueron de: mínimo de 23 750 y máximo de 155 000 UFC/g y para las muestras incubadas a 37°C el mínimo fue de 16 300 y máximo de 2 330 000 UFC/g. No se observó una diferencia significativa al comparar las dos temperaturas de incubación del macerado de muestras procedentes de Tlaxcala ($P=0.686$). Al comparar el número de mesófilas aerobias para el macerado y el agua de lavado incubadas a temperatura ambiente se

encontró diferencia significativa ($P=0.043$), y en las muestras incubadas a 37°C no se encontró diferencia significativa ($P=0.138$).

LAGUNAS DE ZEMPOALA

Para las muestras de macerado procedentes de las Lagunas de Zempoala incubadas a temperatura ambiente el conteo mínimo de mesófilas aerobias fue de 30 000 y un máximo de 1 437 500 UFC/g, y para las incubadas a 37°C el conteo mínimo fue de 2500 y el máximo de 415 200 UFC/g, muestras que están por debajo del límite máximo permitido por la NOM-242-SSA1-2009 (10 000 000 UFC/g). Al realizar una comparación del número de mesófilas aerobias en muestras de macerado, incubadas a las dos temperaturas estudiadas no se encontró una diferencia significativa ($P=0.80$). En las lagunas de Zempoala el número de mesófilas aerobias entre el macerado y el agua de lavado no mostró diferencias en las muestras incubadas a temperatura ambiente ($P=0.5$), ni en las incubadas a 37°C ($P=0.225$).

Comparando entre los dos sitios de donde provienen las muestras de macerado incubadas a temperatura ambiente ($P=0.295$) y en las incubadas a 37°C , no se encontró diferencia significativa en los conteos de mesófilas aerobias

5.2.2 Agua de lavado de Acociles crudos

TLAXCALA

No se cuenta con una norma específica que nos de un límite máximo permitido de bacterias mesófilas en este tipo de muestra, por lo que se reportan los conteos obtenidos, estos son: para las muestras de agua de lavado incubadas a temperatura ambiente, mínimo 875 y máximo 27 500, las incubadas a 37°C fueron

de 2500 mínimo y 23750 máximo, bacterias mesófilas aerobias. Al realizar una comparación del agua de lavado a las dos temperaturas antes mencionadas no se encontró una diferencia significativa ($P=0.225$).

LAGUNAS DE ZEMPOALA

Al igual que en las muestras provenientes de Tlaxcala no se cuenta con una norma específica para estas muestras. El conteo mínimo reportado para las muestras de aguas de lavado incubadas a temperatura ambiente es de 13 375 y máximo de 725 000. Se compararon las dos temperaturas de incubación en las muestras de agua de lavado, no encontrando una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.225$).

Al comparar los dos sitios de procedencia de las muestras de agua de lavado incubadas a temperatura ambiente se encontró diferencia significativa en los conteos de bacterias mesófilas aerobias ($P=0.028$), mientras que en las muestras incubadas a 37°C no se encontró diferencia ($P=0.117$).

5.2.3 Agua de Embalse de acociles crudos

TLAXCALA

No se cuenta con una norma específica que nos indique el límite máximo permitido de mesófilas aerobias para muestras de agua de embalse, en las muestras de agua de embalse incubadas a temperatura ambiente el conteo mínimo fue de 875 y el máximo de 7 000 000 UFC/ml. En la incubadas a 37°C el mínimo fue de 625 y el máximo fue de 550 000 UFC/ml. No se encontró una diferencia significativa en el conteo de mesófilas aerobias al comparar las dos temperaturas de incubación ($P=0.465$).

LAGUNAS DE ZEMPOALA

Los conteos en las muestras provenientes de las Lagunas de Zempoala incubadas a temperatura ambiente fueron de: mínimo 250 y el máximo de 1 162 500 UFC/ml, y para las incubadas a 37°C fueron de: mínimo 0 y máximo de 862 500 UFC/ml. Entre los conteos de mesófilas aerobias de muestras de agua de embalse incubadas a temperatura ambiente y las incubadas a 37°C se encontró diferencia significativa ($P=0.042$).

Al realizar la comparación de conteos de mesófilas aerobias entre las muestras de Tlaxcala incubadas a temperatura ambiente y las muestras de las Lagunas de Zempoala incubadas a la misma temperatura no se encontró una diferencia significativa ($P=0.624$). Lo mismo sucedió en la comparación entre ambos sitios de procedencia de los conteos de mesófilas aerobias, pero incubadas a 37°C, no se encontró diferencia significativa ($P=0.712$).

Se observó una gran variabilidad en los conteos de bacterias mesófilas aerobias obtenidos de las muestras provenientes de dos sitios (Tlaxcala y lagunas de Zempoala), incubadas a dos temperaturas (temperatura ambiente y 37°C), esto atribuido al número de muestra tan pequeño. Al realizar una comparación estadística entre ambos sitios se encontró diferencia significativa en la comparación de muestras de agua de lavado de los dos lugares de muestreo incubadas a temperatura ambiente ($P=0.028$) (tabla 5).

Lugar	Temperatura Ambiente			Temperatura 37°C		
	Macerado	Agua de lavado	Agua de Embalse	Macerado	Agua de lavado	Agua de Embalse
Tlaxcala	805 000 ± 24 370	9950±4784,513	1 810 000±1 730 000	510 000±454 000	17 500±3893,103	185 000±129 500
	(n=5)	(n=5)	(n=4)	(n=5)	(n=5)	(n=4)
	a	a	a	a	a	a
Lagunas de Zempoala	458 000±266 300	300 000±137 400	237 000±231 300	121 000±79 240	210 000±113 000	176 000±171 700
	(n=5)	(n=5)	(n=4)	(n=5)	(n=5)	(n=4)
	a	a	a	a	b	a

Tabla 6. Media y error estándar de bacterias mesófilas aerobias en muestras de acociles crudos. (a)P>0.05,(b)P=0.043

5.2.4 Macerado de Acociles Cocidos

De las muestras incubadas a temperatura ambiente, al igual que las incubadas a 37°C, el 83.3% (5/6) presentaron conteos por arriba de la especificación de límite máximo que indica la NOM-093-SSA1-1994, de 150,000 UFC/g de mesófilas aerobias

En el caso de los acociles cocidos los conteos obtenidos en el macerado de las muestras procedentes del mercado de San Juan (n=6), el valor mínimo de mesófilas encontrado fue de 9 500 y el máximo de 478 750 000 UFC/g a temperatura ambiente y a 37°C está entre 2 250 a fue 356 250 000 UFC/g. Comparando los conteos de mesófilas aerobias entre las dos temperaturas de incubación de las muestras de macerado no se encontró una diferencia significativa (P=0.173). No se encontró diferencia en el conteo de mesófilas aerobias entre el macerado y el agua de lavado a temperatura ambiente (P=0.917). Sin embargo al comparar los conteos de macerado y agua de lavado incubadas a 37°C se encontró diferencia (P=0.028).

5.2.5 Agua de lavado de acociles cocidos

Los conteos arrojados de las muestras de agua de lavado a partir de acociles cocidos, incubadas a temperatura ambiente presento un mínimo de 1 500 y un máximo de 428 750 000 UFC/ml mesófilas aerobias, y las incubadas a 37°C presentaron un conteo mínimo de 2 250 y un máximo de 370 000 000 UFC/ml. El conteo de mesófilas aerobias en muestras agua de lavado incubada a temperatura ambiente presentó una diferencia significativa ($P=0.028$), en cuanto a las muestras incubadas a 37°C.

5.3 Aislamiento de *Salmonella* spp.

El 100% de las muestras, tanto de macerado, agua de lavado y agua de embalse de acociles crudos, como macerado y agua de lavado de acociles cocidos, fueron negativas a la presencia de *Salmonella* spp., por lo que cumplen con el límite permisible por la norma; NOM-242-SSA1-2009, en la que indica que este microorganismo debe estar ausente.

5.4 Bacterias asociadas

5.4.1 Bacterias aisladas con mayor frecuencia

Las bacterias aisladas con mayor frecuencia en muestras de acociles crudos provenientes de Tlaxcala y de las Lagunas de Zempoala fueron *Corynebacterium* spp., *Corynebacterium kutsheri*, *Acinetobacter* spp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp (Fig. 10 y tablas 7, 8 y 9)

Muestras de macerado de acociles crudos

En las muestras procesadas a partir de macerado de acociles crudos se aislaron en un 37% bacterias grampositivas y en un 63% Bacterias gramnegativas, esto a temperatura ambiente. A 37° C se aislaron 18% de Grampositivas y un 82% de Gramnegativas (Fig. 9).

Muestras de agua de lavado a partir de acociles crudos

En las muestras procesadas de agua de lavado de acociles crudos se aislaron 35% de bacterias Grampositivas y un 65% de Gramnegativas a temperatura ambiente y a 37° C un 36% fueron bacterias Grampositivas y un 64% Gramnegativas (figura 9).

Muestras de agua de embalse

En las muestras de agua de embalse se aislaron a temperatura ambiente 37% de bacterias Grampositivas y 63% de bacterias Gramnegativas. A 37° C se aislaron 44% de bacterias Grampositivas y 56% de Gramnegativas (figura 9).

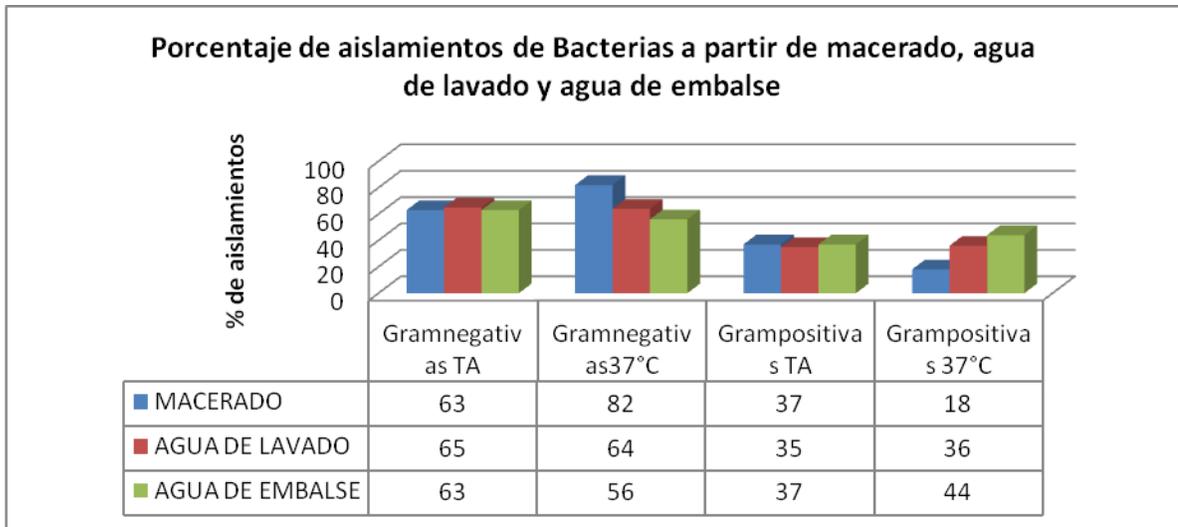


Fig. 9.- Bacterias Gramnegativas y Grampositivas aisladas en muestras de acociles crudos.

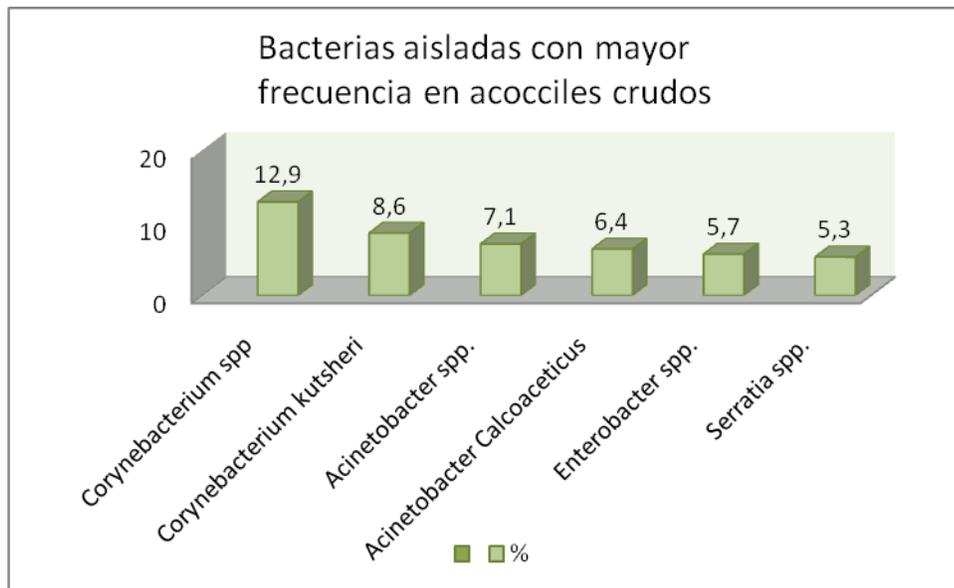


Fig. 10.-Enterobacter spp. también ha sido clasificada como causante de enfermedad en humanos

BACTERIA	No. DE AISLAMIENTOS						TOTAL
	MACERADO		AGUA LAVADO		AGUA EMBALSE		
	T. AMBIENTE	37 °c	T. AMBIENTE	37 °c	T. AMBIENTE	37 °c	
1.- <i>Serratia</i> spp.	6	0	6	1	0	2	15
2.- <i>Aeromonas hydrophila</i>	3	0	3	5	0	0	11
3.- <i>Enterobacter</i> spp.	0	2	4	1	4	5	16
4.- <i>Actinobacillus salpingitidis</i>	0	1	2	1	0	0	4
5.- <i>Aeromonas</i> spp.	1	3	1	0	0	1	6
6.- <i>Klebsiella</i> spp.	0	3	0	1	0	1	5
7.- <i>E. coli</i>	1	5	3	1	0	0	10
8.- <i>Enterobacter cloacae</i>	2	2	1	1	1	1	8
9.- <i>Actinobacillus</i> spp.	1	1	2	4	0	1	9
10.- <i>Corynebacterium pyogenes</i>	1	0	0	0	0	0	1
11.- <i>Bacillus</i> spp.	1	0	2	1	3	4	11
12.- <i>Vibrio</i> spp.	1	0	0	1	0	0	2
13.- <i>Actinobacillus equuli</i>	1	0	0	0	0	0	1
14.- <i>Corynebacterium kutscheri</i>	5	7	6	2	2	2	24
15.- <i>Staphylococcus coagulasa (-)</i>	1	0	1	2	0	0	4
16.- <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	0	0	2	0	1	1	4
17.- <i>Actinomyces israelii</i>	0	0	0	0	1	0	1
18.- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	2	0	0	10	5	18
19.- <i>Bacillus pantothenicus</i>	0	1	1	0	0	0	2
20.- <i>Corynebacterium</i> spp.	4	6	5	11	2	8	36
21.- <i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	1	0	0	1
22.- <i>Yersinia</i> spp.	3	2	0	1	1	0	7
23.- <i>Moraxella</i> spp.	3	0	4	1	3	0	11
24.- <i>Pasteurella testudinis</i>	1	2	1	0	0	0	4
25.- <i>Citrobacter</i> spp.	0	2	1	0	0	0	3
26.- <i>Corynebacterium matruchotii</i>	1	0	2	1	1	1	6
27.- <i>Streptococcus porcinus</i>	0	0	0	1	0	0	1
28.- <i>Corynebacterium xerosis</i>	0	0	0	1	0	0	1
29.- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	1	0	0	2	4
30.- <i>Vibrio cholerae</i>	1	0	0	0	0	0	1
31.- <i>Vibrio mimicus</i>	1	0	0	0	0	0	1
32.- <i>Citrobacter freundii</i>	0	0	1	0	0	0	1
33.- <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0	0	0	0	1	0	1
34.- <i>Kurthia</i> spp.	0	0	0	0	0	1	1
35.- <i>Bacillus lentus</i>	1	1	0	0	0	0	2
36.- <i>Moraxella urethralis</i>	1	0	0	0	0	0	1
37.- <i>Bacillus cereus</i>	0	0	1	0	0	0	1
38.- <i>Serratia marcescens</i>	0	1	0	0	0	0	1
39.- <i>Yersinia intermedia</i>	0	0	0	1	0	0	1
40.- <i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	0	0	0	0	0	1
41.- <i>Acinetobacter iwoffii</i>	0	1	0	0	0	0	1
42.- <i>Aeromonas salmonicida</i>	0	0	0	0	0	1	1
43.- <i>Vibrio alginolyticus</i>	2	0	0	0	0	0	2
44.- <i>Serratia plymuthica</i>	0	0	1	0	1	0	2
45.- <i>Vibrio vulnificus</i>	0	0	0	0	1	0	1
46.- <i>Serratia odorifera</i> biovar II	0	0	0	0	1	0	1
47.- <i>Corynebacterium striatum</i>	1	0	0	0	0	0	1
48.- <i>Citrobacter amalonaticus</i>	0	1	0	0	0	0	1
49.- <i>Bacillus mycoides</i>	0	0	0	0	1	1	2
50.- <i>Bacillus megaterium</i>	0	0	0	0	0	1	1
51.- <i>Corynebacterium renale</i>	0	0	0	0	1	0	1
52.- <i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	0	0	0	2	0	0	2
53.- <i>Yersinia ruckeri</i>	2	0	0	0	0	0	2
54.- <i>Acinetobacter</i> spp.	7	2	4	2	3	2	20
55.- <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	0	0	0	1	0	1
56.- <i>Aeromonas caviae</i>	0	1	0	0	0	0	1
57.- <i>Corynebacterium pilosum</i>	0	1	0	0	0	0	1

Tabla 7. Bacterias aisladas en muestras de acociles crudos provenientes de Tlaxcala y las Lagunas de Zempoala.

LUGAR DE PROCEDENCIA	No. MUESTRA	IDENTIFICACION	M	A	C	E	R	A	DO	AGUA	LAVADO	AGUA	EMBALSE	TEMPERATURA										
TLAXCALA	1	1	1	2						3	4	25	4	T. AMBIENTE										
	2	1	5	6	3	7	8			2	9	3	8	37° C										
	3	2	1	10	11	12	13			1	11	3	9	7	14	15	16	17	18	T. AMBIENTE				
	4	2	5	19	6	9	3			9	16	20	11	21	1	22	20	14	18	16	37° C			
	5	3	54	22						20	15	3					11	23	3		T. AMBIENTE			
	6	3	24	22	6	25	7			20	15	26	27	28			26	3	29	6	5	18	37° C	
	7	4	26	7	54	30	31	6		26	7	14	32	2			54	25	33	3	11		T. AMBIENTE	
	8	4	7	20	25					2	20						34	3					37° C	
	9	5	20	23	54	35	36			26	1	54	37				18	8	3				T. AMBIENTE	
	10	5	14	7	8	38				14	39	15	20	7	6		11	22	54	20	8	29		37° C
LAGUNAS DE ZEMPOALA	11	1	14	20	15	18	1	54	9	14	16	1				18	20						T. AMBIENTE	
	12	1	20	18	4					20	9	4				20	18	4					37° C	
	13	2	14	54	40					14	54	24	23			14	54	23					T. AMBIENTE	
	14	2	14	41	54					14	54	11				14	54	42	1				37° C	
	15	3	14	43	8	5	23			14	19	20	44	2	5	49	54	45	55	26	44	46	T. AMBIENTE	
	16	3	48	14	56	54	57	24	29	14	12	20	23			49	50	20	11				37° C	
	17	4	14	24	23	47	20	18		20	54	8	14	23	7	29	4	51	18				T. AMBIENTE	
	18	4	20	14	35					2	52	20						s/c						37° C
	19	5	53	11	20					4	2	9	23					20	18					T. AMBIENTE
	20	5	20							20								s/c						37° C

BACTERIAS AISLADAS

- | | | | |
|---|--|---|--|
| 1.- <i>Serratia</i> spp. | 6.- <i>Klebsiella</i> spp. | 11.- <i>Bacillus</i> spp. | 16.- <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> |
| 2.- <i>Aeromonas hydrophila</i> | 7.- <i>E. coli</i> | 12.- <i>Vibrio</i> spp. | 17.- <i>Actinomyces israelii</i> |
| 3.- <i>Enterobacter</i> spp. | 8.- <i>Enterobacter cloacae</i> | 13.- <i>Actinobacillus equuli</i> | 18.- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| 4.- <i>Actinobacillus salpingitidis</i> | 9.- <i>Actinobacillus</i> spp. | 14.- <i>Corynebacterium kutsheri</i> | 19.- <i>Bacillus pantothenicus</i> |
| 5.- <i>Aeromonas</i> spp. | 10.- <i>Corynebacterium pyogenes</i> | 15.- <i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> | 20.- <i>Corynebacterium</i> spp. |
| 21.- <i>Proteus mirabilis</i> | 26.- <i>Corynebacterium martruchotii</i> | 31.- <i>Vibrio mimicus</i> | 36.- <i>Moraxella urethralis</i> |
| 22.- <i>Yersinia</i> spp. | 27.- <i>Streptococcus porcinus</i> | 32.- <i>Citrobacter freundii</i> | 37.- <i>Bacillus cereus</i> |
| 23.- <i>Moraxella</i> spp. | 28.- <i>corynebacterium xerosis</i> | 33.- <i>Corynebacterium diphteriae</i> | 38.- <i>Serratia marcescens</i> |
| 24.- <i>Pasteurella testudinis</i> | 29.- <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 34.- <i>Kurthia</i> spp. | 39.- <i>Yersinia intermedia</i> |
| 25.- <i>Citrobacter</i> spp. | 30.- <i>Vibrio cholerae</i> | 35.- <i>Bacillus lentus</i> | 40.- <i>Corynebacterium jeikeium</i> |
| 41.- <i>Acinetobacter iwoffi</i> | 46.- <i>Serratia odorifera biovar II</i> | 51.- <i>Corynebacterium renale</i> | 56.- <i>Aeromonas caviae</i> |
| 42.- <i>Aeromonas salmonicida</i> | 47.- <i>Corynebacterium striatum</i> | 52.- <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> | 57.- <i>Corynebacterium pilosum</i> |
| 43.- <i>Vibrio alginolyticus</i> | 48.- <i>Citrobacter amalonaticus</i> | 53.- <i>Yersinia ruckeri</i> | |
| 44.- <i>Serratia plymuthica</i> | 49.- <i>Bacillus mycoides</i> | 54.- <i>Acinetobacter</i> spp. | |
| 45.- <i>Vibrio vulnificus</i> | 50.- <i>Bacillus megaterium</i> | 55.- <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | |

Tabla 8.- Número de aislamientos de bacterias en macerado, agua de lavado y agua de embalse de acociles crudos.

BACTERIA	MACERADO		AGUA LAVADO		AGUA EMBALSE		TOTAL
	T. AMBIENTE	37 °c	T. AMBIENTE	37 °c	T. AMBIENTE	37 °c	
<i>Corynebacterium</i> spp.	4	6	5	11	2	8	36
<i>Corynebacterium kutsheri</i>	5	7	6	2	2	2	24
<i>Acinetobacter</i> spp.	7	2	4	2	3	2	20
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	2	0	0	10	5	18
<i>Enterobacter</i> spp.	0	2	4	1	4	5	16
<i>Serratia</i> spp.	6	0	6	1	0	2	15

Tabla 9.- Comparación de Bacterias aisladas en macerado, agua de lavado y agua de embalse en muestras de acociles crudos incubadas a 2 temperaturas.

5.4.2 Bacterias aisladas en acocil asociadas a enfermedades en humanos

Las bacterias causantes de enfermedad en humanos aisladas a partir de muestras de acociles crudos fueron; *Aeromonas* spp., *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Vibrio cholerae*, *Citrobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Vibrio anginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Yersinia* spp. (tabla 10 y figura 11).

BACTERIA	MACERADO		AGUA LAVADO		AGUA EMBALSE	
	T. AMBIENTE	37 °c	T. AMBIENTE	37 °c	T. AMBIENTE	37 °c
<i>Enterobacter</i> spp.	0	2	4	1	4	5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	3	0	3	5	0	0
<i>E. coli</i>	1	5	3	1	0	0
<i>Yersinia</i> spp.	3	2	0	1	1	0
<i>Klebsiella</i> spp.	0	3	0	1	0	1
<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo	1	0	1	2	0	0
<i>Citrobacter</i> spp.	0	2	1	0	0	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Vibrio mimicus</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Aeromonas</i> spp.	1	3	1	0	0	1
<i>Aeromonas caviae</i>	0	1	0	0	0	0

Tabla 10.- Bacterias aisladas en macerado de acociles crudos, agua de lavado y agua de embalse asociadas a enfermedad en humanos.



Fig. 11.- Número de aislamientos de Bacterias aisladas en acociles crudos asociadas a enfermedades en humanos.

5.4.3 Bacterias aisladas en acocil asociadas a enfermedades en crustáceos

Las bacterias aisladas en el acocil fueron; *Vibrio spp.*, *Bacillus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterobacter spp.* y *Staphylococcus coagulasa* negativo (figura 12).

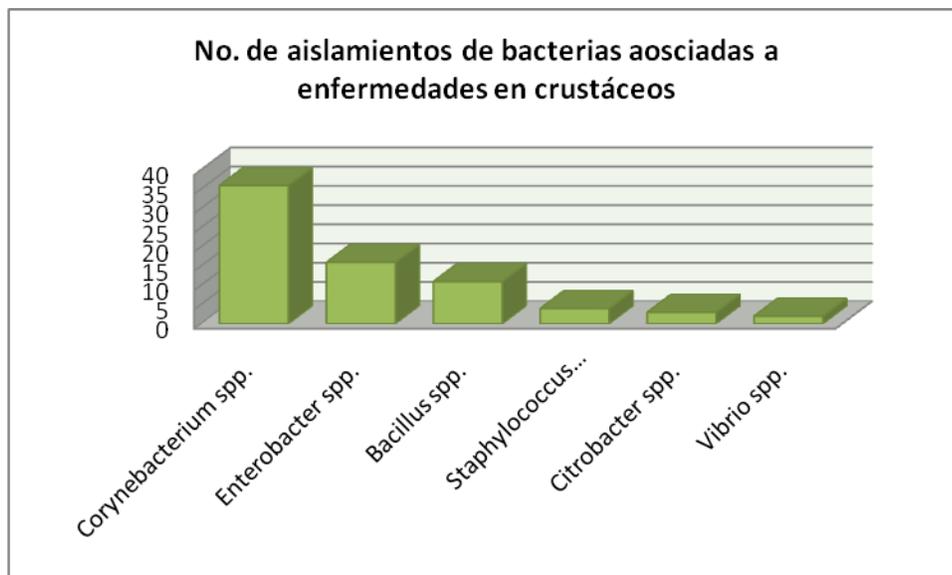


Fig.12.- Bacterias aisladas en acocil asociadas a enfermedades en crustáceos.

5.4.4 Bacterias aisladas asociadas a los Acociles cocidos

El total de bacterias aisladas en macerado y agua de acociles cocidos fueron 10; 6(60%) Gramnegativas y 4(40%) Grampositivas.

Muestras de Macerado de Acociles cocidos

Se aislaron 10 bacterias de las cuales solo 2 tiene importancia en salud pública; *Aeromonas spp.*, y *Staphylococcus coagulasa negativo* (figura 13)).

Muestras de agua de lavado a partir de Acociles cocidos

Se aislaron 9 Bacterias de las cuales solo 1 es de importancia en salud pública; *Staphylococcus coagulasa negativo* (figura 13)

BACTERIAS	No. DE AISLAMIENTOS				TOTAL
	MACERADO		AGUA LAVADO		
	T.AMBIENTE	37°C	T. AMBIENTE	37°C	
1.- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	5	4	2	1	12
2.- <i>Moraxella spp.</i>	3	0	5	0	8
3.- <i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	15	18	13	14	60
4.- <i>Aeromonas spp.</i>	0	0	1	0	1
5.- <i>Actinobacillus spp.</i>	1	0	0	0	1
6.- <i>Corynebacterium spp.</i>	2	1	3	0	6
7.- <i>Kurthia spp.</i>	0	1	0	0	1
8.- <i>Bacillus stearoothermophilus</i>	0	0	0	1	1
9.- <i>Bacillus pantothenicus</i>	0	0	0	1	1
10.- <i>Acinetobacter spp.</i>	3	0	0	0	3

Figura 13.- Bacterias aisladas en macerado y agua de lavado de acociles cocidos

6 DISCUSIÓN

6.1 Número más probable (NMP) de bacterias coliformes

6.1.1 Macerado de acociles crudos

Al comparar los conteos de bacterias coliformes de agua de lavado incubadas a dos temperaturas diferentes se observó una diferencia significativa ($P=0.043$), siendo mayor el conteo en las muestras incubadas a temperatura ambiente, éstas muestras provienen del estado de Tlaxcala. La presencia de bacterias presentes en el agua de lavado va directamente relacionada con las bacterias presentes en el acocil, y posiblemente proliferaron más a temperatura ambiente ya que la mayoría de las bacterias aisladas se encuentran distribuidas ampliamente en el medio ambiente donde habita el acocil, con temperaturas de 10 a 25°C.

Bracho *et al.*, 2008 realizaron un estudio sobre 16 muestras de camarones del lago de Maracaibo, Venezuela, utilizaron como referencia la norma COVENIN 453-93, la cual especifica que el límite máximo permisible de bacterias coliformes fecales es de 4.6 NMP/g, ellos obtuvieron que el 62.5% de las muestras presentaron valores por arriba de este límite. Con esto observamos que los valores de las muestras analizadas en nuestro estudio están por debajo del estudio realizado en este país, ya que 45% de las muestras de macerado que trabajamos expresaron resultados fuera del límite permitido que utilizamos como referencia, pero a diferencia de la norma que ellos utilizaron nuestro límite máximo es de 400 NMP/g y lo establece la NOM-242-SSA1-2009. Al realizar una comparación con el límite máximo que ellos utilizaron como referencia, el 100%

de nuestras muestras procesadas estarían por encima del límite que permite esta norma.

6.1.2 Agua de lavado de Acociles Crudos

En las muestras de agua de lavado de los acociles crudos se reportaron conteos de bacterias coliformes de hasta 50 000 NMP/100ml. Sin embargo aunque los conteos de este tipo de bacterias son elevados, no hay una norma en la cual estén comprendidas este tipo de muestras o que nos de un límite máximo permitido de estas bacterias, se debe tomar en cuenta que el agua utilizada antes de realizar el lavado era estéril por lo cual se concluye que la carga bacteriana esta relacionada directamente con la cantidad de bacterias que se encontraron en el macerado. Los altos valores de bacterias presentes en la superficie de los acociles, y que fueron arrastradas por el lavado nos señalan que el hábitat en donde se encuentran refleja la deficiente calidad del agua (ICMSF, 2001).

6.1.3 Agua de embalse de acociles crudos

El agua de embalse de donde se obtuvo la muestra, no cuenta de igual forma con una norma que sirva como referencia a la cantidad de bacterias permisible, sin embargo, se tomó como referencia la NOM-127-SSA1-1994, ya que se refiere al agua de uso y consumo humano, cabe mencionar que el agua de embalse no se considera agua potable, por lo que servirá como un mero comparativo; la norma maneja que en la muestra debe de haber ausencia de bacterias coliformes. De las 18 muestras procesadas 2(11.11%) presentaron conteos de 0 NMP/100ml y las 16(88.89%) restantes sobrepasan el limite permisible de la norma tomada como referencia, presentando conteos de bacterias coliformes de 3 hasta 1500 NMP/100ml, Becerra *et al*, 2005 llevo a cabo un estudio en el Estado de Chiapas,

México, en las que analiza agua de un sistema lagunar, en el cual reporta conteos máximos de 240 000 UFC/100ml pero también reporta ausencia de coliformes en otras muestras de agua. Por otro lado la NOM-242-SSA1-2005 indica que el límite máximo permisible de bacterias coliformes para una área aprobada de cultivo de moluscos es de 14 NMP/100ml, comparando con esta norma 11/18 muestras sobrepasan este limite permitido y 7 están dentro del limite. Bracho *et al*, 2008, en el mismo estudio de Lago de Maracaibo, Venezuela, manejan un porcentaje de positividad a coliformes del 93.7% de sus 16 muestras trabajadas, con un rango de 1300 a 1 600 000 NMP/100ml, y al no contar de igual manera con una norma especifica para agua de camarones tomaron como referencia para hacer un comparativo la normativa venezolana de calidad de aguas con propósitos de recreación, deportes y pesca, la cual estipula que no debe de haber más de 200 NMP/100ml de bacterias coliformes. En nuestro estudio no contamos en México con una norma que contemple esos elementos para comparar los resultados. La presencia de bacterias patógenas de origen intestinal como coliformes, son de gran interés, debido a que tienen la capacidad de estar presentes por mucho tiempo en el ambiente acuático, y sin perder su patogenicidad (Madigan *et al.*, 2007). Los coliformes son microorganismos cuya presencia y recuento adquiere importancia según cada alimento en particular (Becerra *et al*, 2008).

El alto conteo de bacterias coliformes en las muestras de macerado, agua de lavado y agua de embalse, están fuera del límite permitido que son indicador de una posible presencia de patógenos entéricos (Forsythe, 2002). La contaminación

por coliformes puede afectar el agua y causar efectos negativos en usos recreativos, estatus sanitario y pérdidas económicas debido al riesgo de contener bacterias causantes de enfermedades (Gourmelon *et al*, 2010).

El término coliformes comprende *E. coli* y otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (ICMSF, 2000). Algunos coliformes (*E. coli*) son comunes en las heces de mamíferos y otros animales, (*Enterobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*) usualmente se encuentran en el suelo y agua (ANMAT, 2005). En el agua de embalses naturales su significado higiénico directo es muy escaso ya que la mayoría de los coliformes se encuentran en el medio ambiente, (Forsythe, 2003). Por otra parte Becerra *et al.*, 1995 asocia una gran carga de bacterias coliformes a una alta cantidad de materia orgánica en el agua, y en tanto en las Lagunas de Zempoala, como en la laguna de Atlangatepec hay presencia de materia orgánica debido a la cantidad de plantas u organismos que hay en ambos embalses.

6.1.4 Macerado de Acociles cocidos

La muestra que está fuera del límite permisible fue incubada a temperatura ambiente y presentó un conteo de 700 NMP/g de bacterias coliformes. Las bacterias involucradas en estas muestras fueron identificadas como No coliformes, por lo que todas las muestras analizadas están dentro del límite permitido. Sin embargo, hay estudios realizados pero que no se basan en la NOM-093-SSA1-1994, como ocurre con Flores *et al.*, 1996, tomaron parámetros de Fernández, 1981, ellos realizaron un estudio en el estado de Yucatán, con camarones cocidos

en el que el límite permisible fue de 20 UFC/g, de las 29 muestras analizadas 19 (65.5%) están dentro del límite permitido.

6.1.5 Agua de lavado de acociles cocidos

El agua estéril que se utilizó para el lavado de los acociles no mostró el desarrollo de bacterias coliformes en ninguna de las muestras trabajadas, en las diferentes temperaturas de incubación (temperatura ambiente y a 37°C).

Los acociles cocidos pasan por un proceso térmico que es la cocción, aproximadamente 100°C por 15 minutos, ésta disminuye significativamente los recuentos bacterianos (ICMSF, 2001). Cuando las muestras son positivas a bacterias coliformes esto puede deberse a una mala higiene de los equipos donde se procesan o conservan los acociles, la posible contaminación por manipulación de personas y la exposición de estos productos que son exhibidos para su venta a la intemperie, esto fomenta la proliferación de las bacterias, por lo cual la calidad sanitaria de este alimento es cuestionable (Forsythe, 2003). Muñoz *et al.*, 2008 indica que la presencia de bacterias coliformes en alimentos implicada la probable presencia de bacterias patógenas causantes de enfermedades en el hombre.

6.2 Bacterias Mesófilas aerobias

6.2.1 Macerado a partir de acociles crudos

Los resultados de los conteos de mesófilas aerobias en las muestras de macerado de acociles crudos a las dos temperaturas de incubación; (temperatura ambiente y 37°C), están dentro del límite permitido por la NOM-242-SSA1-2009, el cual es de

10 000 000 UFC/g, igual al límite máximo permitido para mesófilas aerobias por La Internacional Comisión on Microbiological Specifications for foods (ICMSF por su siglas en inglés) de 10^7 UFC/g. En contraste con el con el límite permitido por la Unión Europea que establece 500 000 UFC/g, 4(20%) muestras están por arriba del límite permitido y 16(80%) están dentro de este límite permitido.

Al comparar el número de mesófilas aerobias para el macerado y el agua de lavado incubadas a temperatura ambiente se encontró diferencia significativa ($P=0.043$), siendo menores los conteos en el agua de lavado.

En la comparación de los conteos de mesófilas aerobias en muestras incubadas a temperatura ambiente en el agua de lavado entre los dos sitios de muestreo (Tlaxcala y Lagunas de Zempoala), se observo una diferencia significativa ($P=0.028$), de igual manera siendo mayores los conteos en las muestras procedentes de las Lagunas de Zempoala, posiblemente debido a la forma en la que se obtuvieron los acociles, en Tlaxcala se obtenían por medio de una red de arrastre, y en las Lagunas de Zempoala se obtenían sacando una planta llamada Elodea (*Elodea canadensis*), los acociles estaban escondidos en esta planta, la cual tenia gran cantidad de fango, y por lo tanto gran cantidad de microorganismos.

En las muestras agua de embalse, procedentes del mismo sitio de muestreo, se encontró una diferencia significativa ($P=0.042$), al comparar dos temperaturas de incubación, siendo mayor el conteo en las muestras incubadas a temperatura ambiente.

Bracho *et al*, 2009, realizaron un estudio de calidad microbiológica en camarones en el cual manejan un límite máximo de 10 000 000UFC/ml tomado de la

COVENIN (Comisión Venezolana de Normas Industriales) 453-93, para camarones crudos congelados, de las 16 muestras que procesaron de camarón el 62.5% sobrepasan el valor del límite permitido, a diferencia de nuestro estudio en el cual todas las muestras se encuentran dentro de este límite.

6.2.2 Agua de lavado a partir de acociles crudos

En cuanto al agua de lavado de los acociles no hay una norma específica para límite máximo de este tipo de muestra, al igual que para el agua de embalse, por lo cual se tomó en cuenta el límite máximo permisible que establecen Félix *et al*, 2007, el cual es de 200 UFC/ml de Bacterias mesófilas aerobias en agua para consumo humano, utilizando este criterio las 20 muestras trabajadas de agua de lavado mostraron resultados fuera del límite establecido. Cabe mencionar que el agua que se utilizaba para el lavado era estéril, y el conteo de bacterias mesófilas aerobias en esta va estrechamente relacionado con las bacterias presentes en los acociles, y con el agua del embalse de donde fueron capturados, ya que esta es agua no potabilizada. Bracho *et al*, 2009 menciona que en los tejidos de los crustáceos suelen acumularse microorganismos y partículas presentes en el medio en el que se desarrollan y la contaminación biológica que estos presentan tiene relación directa con el agua donde son capturados.

6.2.3 Agua de embalse a partir de Acociles crudos

De las 18 muestras procesadas de agua de embalse a las dos temperaturas de incubación, presentaron conteos de bacterias mesófilas aerobias desde 0 hasta 7 000 000 UFC/ml. De estas muestras 1(5.5%) presentó conteos dentro del límite

establecido por Félix *et al.*, 2007 (200 UFC/ml) y fue incubada a 37°C, y 17 (94.5%) muestras incubadas a las dos temperaturas presentaron valores fuera del límite permitido. Bracho *et al.*, 2009 también trabajan con agua de embalse, en la cual no cuentan con un límite máximo permitido pero reportan valores de 120 000 a 4 300 000, valores que sobrepasan a los encontrados en los conteos de este trabajo.

El conteo de bacterias mesófilas aerobias, bacterias coliformes y presencia de coliformes fecales son indicadores de la calidad sanitaria de aguas para cultivo de moluscos y mariscos (Martínez *et al.*, 2008).

6.2.4 Macerado acociles cocidos

Las muestras de macerado de Acociles cocidos presentaron cuentas de Bacterias mesófilas aerobias desde 2 250 hasta 478 750 000 UFC/g, valores considerados fuera del límite permitido que establece la NOM-093-SSA1-1994, la cual señala la ausencia de estos microorganismos. El análisis estadístico nos indica que haciendo la comparación entre los conteos de muestras de macerado y agua de lavado incubadas a 37°C, se encontró una diferencia significativa ($P=0.028$), siendo mayores los conteos en el agua de lavado, debido a que al lavar los acociles se retira el exceso de bacterias en estos, y en el agua de lavado queda gran parte de los microorganismos. Al comparar las dos temperaturas de incubación de las muestras de agua de lavado se encontró una diferencia significativa ($P=0.028$), siendo mayor el conteo en las muestras incubadas a temperatura ambiente, esto debido a que los acociles eran exhibidos para su

venta a temperatura ambiente, por lo cual las bacterias contaminantes que adquirirían pueden crecer a esta temperatura.

Flores *et al*, 1996, en el estudio realizado en el Estado de Yucatán maneja un límite máximo permisible de 500 000 UFC/g en crustáceos parcialmente cocidos con calor, en el estudio los resultados indican que de 51 muestras de camarones 44(33.3%) están dentro del límite establecido por SCSPEY (Servicios Coordinados de Salud Pública en el estado de Yucatán). Este autor menciona que las bacterias mesófilas aerobias presentes en grandes cantidades en alimentos con algún proceso de conservación, como en este caso los acociles cocidos, refleja las condiciones de manipulación así como el grado de descomposición y la calidad sanitarias de este. Por otra parte la ANMAT, 2005 establece que no hay una relación directa entre la cantidad de mesófilas aerobias y la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos, sin embargo la temperatura que requieren la mayoría de los microorganismos patógenos para desarrollarse esta dentro del rango de las mesófilas.

6.2.5 Agua de lavado de acociles cocidos

En el agua de lavado los conteos van de 12 500 hasta 2950 000 000 UFC/ml, tomando como referencia el límite máximo establecido por Félix *et al*, 2007, los cuales indican un límite establecido de 200 UFC/ml en agua para consumo humano, solo una de las 12 muestras cumple con este límite establecido y las 11 restantes rebasan este límite. Cabe mencionar que el agua que se utiliza para el lavado de los acociles es estéril, por lo cual el conteo de mesófilas aerobias tiene relación directa con las bacterias contenidas en los acociles cocidos.

Los altos conteos de mesófilas aerobias presentes en alimentos procesados, como en este caso los acociles cocidos, son indicadores de un peligro potencial para la salud del consumidor, ya que la presencia en grandes cantidades de estas bacterias nos revelan que no se respetaron los principios de higiene, desinfección y almacenamiento y por lo tanto son considerados inadecuados para el consumo humano, aún cuando estos microorganismos no hayan sido identificados como patógenos o no hayan alterado visiblemente las características organolépticas del alimento en cuestión (ICMSF, 2000).

Es importante señalar que tres de las muestras de acociles cocidos fueron conservadas en refrigeración, pero las exhibían para su venta, presentaron recuentos de mesófilas aerobias de 2250 hasta 205 000 000 UFC/g por arriba del límite máximo permisible, de la NOM-093-SSA1-1994, que indica que los conteos de estos microorganismos no deben ser mayores de 150 000 UFC/g. En las 3 muestras que eran exhibidas para su venta a temperatura ambiente los conteos también fueron más elevados, de 14 625 000 hasta 350 000 000 UFC/g, que en las muestras de acociles conservados en refrigeración (4°C) antes de su venta.

La temperatura de almacenamiento no controlada es un factor importante de la colonización de un alimento por bacterias mesófilas, ya que la exposición a temperaturas inadecuadas da como resultado cambios notables en la cantidad de bacterias presentes (Mossel *et al*, 2003), y cuando hay deficiente refrigeración o falta de esta, existe el peligro de una progresiva multiplicación de dichos microorganismos (Fehlhaber *et al*, 1995). Normalmente, el medio principal de conservación de los alimentos para detener la actividad microbiana es la refrigeración, sin embargo tiempos prolongados de almacenamiento pueden

proliferar algunas bacterias como *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp. y *Proteus* spp. bacterias que en asociación son causantes de la putrefacción superficial de carnes (Fehlhaber *et al*, 1995), además *Proteus* spp. es considerado como un agente potencial de ocasionar enteritis (Mossel *et al*, 2003).

6.3 Aislamiento de *Salmonella* spp.

A pesar de que el 100% de las muestras tanto de acociles crudos, como de acociles cocidos dieron negativas a la presencia de *Salmonella* spp., tal como lo indican las normas; no se excluye la presencia de otros microorganismos patógenos que puedan causar enfermedades en el humano, ya que se determinaron altos conteos de bacterias coliformes y mesófilas aerobias, dentro de las cuales no podemos descartar la presencia de bacterias causantes de enfermedad.

6.4 Bacterias asociadas

6.4.1 Bacterias aisladas con mayor frecuencia

Las bacterias aisladas mas frecuentemente en las muestras de acociles crudos *Corynebacterium* spp (13.23%), *Corynebacterium kutsheri* (8.82%), *Acinetobacter* spp. (7.35%), *Acinetobacter calcoaceticus* (6.61%), *Enterobacter* spp. (5.88%), *Serratia* spp. (5.51%). Todas estas bacterias fueron constantemente aisladas del macerado, del agua de lavado y agua de embalse, no se logró el aislamiento de *Corynebacterium* en el agua de lavado.

Las corinebacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose en el suelo, el agua, productos alimenticios, pertenecen a la flora normal de piel y mucosas de humanos y también se encuentran en animales y plantas. Se han aislado en algunos problemas bacterianos en crustáceos como el cangrejo de río (Edgerton, 2001).

Las bacterias del género *Acinetobacter* son aerobias Gramnegativas, ampliamente distribuidas en agua y tierra, pero también pueden aislarse a partir de piel y mucosas. *Serratia* y *Enterobacter* son bacterias clasificadas dentro de las enterobacterias, distribuidas también en agua, suelo y en el tracto intestinal de los humanos, por las características antes mencionadas no es difícil aislarlas frecuentemente en el tipo de muestras trabajadas de acociles (Madigan *et al*, 2007). Algunas especies de *Serratia*, han sido aisladas en acocil, como es el caso de *Serratia marcescens* y *Serratia* spp. (Sánchez, 2007).

6.4.2 Bacterias aisladas en acocil asociadas a enfermedades en humanos

Las bacterias aisladas en los acociles crudos que pueden estar asociadas a enfermedades en humanos fueron; *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., las cuales están clasificadas dentro del grupo de las enterobacterias. Además, se aislaron *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio cholerae.*, *Bacillus cereus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo.

El número de aislamientos de *E. coli* en muestras de acociles crudos en macerado y agua fue de 10, que corresponde a un 3.6% de los aislamientos totales, la presencia de esta bacteria en las muestras de acociles y agua puede deberse a

varias fuentes de contaminación ambiental, como excretas de ganado que pastorea cerca del cuerpo de agua, o debido a la filtración de bacterias provenientes de letrinas con una ubicación cercana a los embalses (Sandoval *et al.*, 2008). Por otra parte Centeno, 2007 cita a *Escherichia* como parte de la microbiota normal de los crustáceos recién capturados.

Elmossalami, 1999, realizó un trabajo con cangrejos de río provenientes del Río Nilo, en el 40% de las 30 muestras se aisló *E coli*, por lo que plantea que la contaminación de mariscos con esta bacteria puede deberse a la contaminación por aguas residuales del cuerpo de agua donde son obtenidos, o durante el transporte, manipulación o venta.

Muñoz *et al.*, 2008, en Venezuela realizaron un estudio, con un molusco conocido comúnmente como pepitona, la que comercializan precocida, reportaron 119 aislamientos, distribuidos en 10 especies de bacterias, de los cuales *E coli* se aisló con mayor frecuencia (25%), consideran a este microorganismo de importancia desde el punto de vista sanitario ya que su aislamiento a partir de alimentos implica que otros microorganismos de origen fecal que pueden ser patógenos para el humano pueden estar también presentes. En los productos de la pesca precocidos la flora bacteriana que es sensible al calor resulta destruida, pero en condiciones de higiene deficiente esta flora es remplazada por bacterias contaminantes, ya sea por inclusión mecánica (moscas u otros insectos), por contaminación directa de microorganismos que están en el aire o por la manipulación. Actualmente *E coli* y otros coliformes fecales son utilizados como monitores de la calidad del agua para cultivo de mariscos y moluscos bivalvos (Martínez *et al.*, 2008).

Bracho *et al.*, 2009, en un estudio realizado con camarones en Maracaibo, Venezuela, obtuvieron porcentajes de *E coli* de 31.5% en camarón crudo y un 25% aislado del agua de embalse, determinaron que en el tejido de estos organismos se tienden a acumular microorganismos presentes en el medio en el que se desarrollan, por lo que la contaminación biológica de los cuerpos de agua donde se adquieren estos organismos ha cobrado importancia en cuanto a su calidad sanitaria, ya que se ha encontrado presentes microorganismos patógenos para el humano.

Forsythe, 2003 menciona que *E. coli* es un microorganismo que se aísla abundantemente del intestino de humanos y animales de sangre caliente, en su mayoría se aíslan cepas no patógenas, sin embargo existen otras que lo son para el humano. Estas cepas patógenas se dividen en 6 grupos; enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), difuso adherente (DAEC) y enteroagregativa (EAEC). Que por diversos mecanismos causan daño en el humano produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.

Moreno, 2003 afirma que las infecciones producidas por *E. coli* transmitidas por alimentos son consecuencia de contaminación fecal, y que generalmente si el alimento está contaminado al almacenarlo, le sigue una multiplicación de estos microorganismos si la temperatura a la que se conserva es deficiente.

El 3.9% del total de aislamientos de acociles crudos, agua de lavado y agua de embalse corresponden a *Aeromonas hydrophyla*, este microorganismo se ha encontrado en aguas superficiales, en el intestino de humanos y animales, en alimentos de origen animal como pescados y mariscos, y además ha sido aislado

como causante de intoxicaciones alimentarias. Un reservorio para esta bacteria son las aguas con alto contenido de materia orgánica (Fehlhaber, 1995), como lo son los lugares de donde se obtuvieron las muestras.

Aeromonas caviae está asociada a problemas diarreicos en humanos, pero no se ha confirmado del todo como agente causal (Fehlhaber, 1995). En ocasiones pueden estar implicadas en infecciones de individuos inmunodeprimidos, y aunque se pueden aislar de pescado por ejemplo, no se han vinculado definitivamente a brotes de gastroenteritis (ICMFS, 2001).

Estudios realizados confirman la existencia de una gran variedad de patógenos bacterianos asociados al consumo de mariscos, de los cuales un 20 se vinculan a brotes de infecciones alimentarias causados por una flora endógena que incluye los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* (Muñoz *et al.*, 2008).

Enterobacter spp., *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, están clasificadas dentro del grupo de las enterobacterias, son microbiota intestinal en animales y humanos, la ICMFS, 2000, considera que estas bacterias son contaminantes comunes de alimentos, y que su presencia no necesariamente causa enfermedad, por otra parte Mossel, 2003 afirman que han sido comúnmente aisladas como causantes de afecciones intestinales en humanos y específicamente a *Citrobacter spp.* ocasionando diarreas.

Citrobacter spp. se ha reportado aislada en otros trabajos como en el de Becerra *et al.*, 1996, en el que realizaron un estudio del agua del sistema lagunar Chantuto- Panzacola, Chiapas, justificando la presencia de esta bacteria por la contaminación de los embalses estudiados con aguas residuales.

Elmossalami, 1999, relaciona la presencia de estas bacterias en mariscos cuando estos son capturados de aguas contaminadas, o que las condiciones de manejo son inadecuadas, considera que encontrar este tipo de bacterias es un riesgo para el comerciante y el consumidor.

Muñoz *et al*, aisló con baja frecuencia estos géneros bacterianos a partir de carne de pepitona, sin embargo se deben tomar su presencia como una advertencia de un posible riesgo para la salud pública.

El género *Yersinia* spp. incluye varias especies patógenas para el humano, la especie de importancia en enfermedades transmitidas por alimentos es *Yersinia enterocolitica* la cual puede ser aislada de diversos hábitats medioambientales como agua contaminada y del suelo, sin embargo Mossel, 2003 menciona que no todas las cepas aisladas de medio ambiente son patógenas, y las denomina como cepas ambientales. Pero la presencia de esta bacteria en el suelo, agua y animales, contribuye a que sea alta la probabilidad de encontrarla como contaminante de alimentos (Forsythe, 2003) tales como los crustáceos. Por otra parte la ICMFS, 2000 establece que *Yersinia enterocolitica* asociada a gastroenteritis se aísla frecuentemente de diversos alimentos.

Los vibrios se encuentran entre las bacterias más comunes de aguas poco profundas de todo el mundo (Madigan, 2007). Estas bacterias no son muy resistentes en el medio ambiente, sin embargo pueden permanecer viables el tiempo suficiente para producir la enfermedad, incluso pueden sobrevivir a temperaturas de refrigeración (Felsefed, 1974) (ICMSF, 2000).

Flores *et al*, 1996 indica que *Vibrio* spp. esta asociado a diferentes productos de la pesca, sobre todo si se consumen crudos, su presencia gira en torno a la posible

contaminación del agua de donde se pesca, o de la que se utiliza durante su procesamiento.

Bracho *et al*, 2009, aisló en un 12% a *Vibrio* spp. a partir de muestras de camarón y en un 18.7% a partir de muestras de agua, y menciona que pueden ocasionar infecciones en humanos si los crustáceos no se cosen adecuadamente. Se obtuvieron solamente 2 aislamientos de *Vibrio* spp., en acociles crudos.

Muñoz *et al.*, 2008, menciona que las bacterias del genero *Vibrio* spp. se caracterizan por ser miembros autóctonos de la biota bacteriana del agua, y que varias de las especies que están dentro de este género son patógenas para el hombre, llegando a ocasionar diarreas, infecciones en piel y septicemias. En el estudio realizado aislaron 5 cepas de *Vibrio algynoliticus* las cuales representan un 41.6% del total de las cepas aislada y 1 (8.3%) de *Vibrio mimicus*, en nuestro estudio se aislaron 2 cepas de este *Vibrio algynoliticus* y 1 de *Vibrio mimicus*. *Vibrio algynoliticus* es mencionado por los mismos autores como agente causal de infecciones gastrointestinales, infecciones en ojos, en heridas en humanos y también se aísla frecuentemente en agua, peces y crustáceos.

Vibrio mimicus es causante de diarreas cuando se encuentra como contaminante de pescados y mariscos, además de que ha sido asociado con infecciones de heridas y tejidos blandos, y aunque no es muy común su aislamiento se debe dar importancia a la presencia de este (Madigan, 2007).

Vibrio cholerae fue aislado sólo en una muestra, en comparación del estudio realizado por Morillo *et al*, 2007, en el cual 30% de las 304 muestras fueron cepas de esta bacteria, el porcentaje aislado en el presente estudio fue muy bajo (0.3%).

Vibrio cholerae es el agente causal del cólera, enfermedad que a lo largo de la historia ha provocado pandemias de importancia. Produce una inflamación del tracto intestinal lo que origina una descarga casi continua de heces (agua de arroz) que contienen sangre y mucosidad, la transmisión se creía que únicamente era de persona a persona, pero se ha observado que una epidemia se presenta particularmente cuando el agua se encuentra contaminada con afluentes cloacales (Forsythe, 2003), la ICMSF, 2002, menciona que *Vibrio cholerae* no se multiplica en agua pero sobrevive en ella desde días hasta semanas

Fehlhaber, *et al.*, 1995, mencionan que la enfermedad del cólera se puede transmitir por medio del consumo de alimentos como pescado y mariscos que estén contaminados.

Vibrio vulnificus ha sido aislado de pescados y mariscos, sobre todo en temporadas de calor, y a diferencia de las otras especies de *vibrio* este se multiplica en el torrente sanguíneo por lo cual puede causar una bacteremia, aunque también está asociado en cuadros de gastroenteritis, sobre todo causa enfermedad en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades hepáticas, su vía de entrada al organismo es por medio del consumo de pescados y mariscos contaminados (Forsythe, 2003) (Madigan, 2007)

Todas las especies de *Bacillus* son saprofitos prevalentes en suelo, agua, vegetación y del pelo de algunos animales. Estas se encuentran frecuentemente de alimentos, y también se ha aislado de superficies de plantas procesadoras de pescados (Centeno, 2007). Una especie de *Bacillus* de relevancia en intoxicaciones alimentarias es *Bacillus cereus*, una bacteria que puede proliferar y esporular en alimentos que han pasado por un proceso térmico, por lo cual se cree

que es termoresistente. Produce 2 tipos de toxinas: una emética y tres enterotoxinas, dos de las cuales están implicadas en toxiinfecciones alimentarias. Además en personas inmunocomprometidos pueden ocasionar meningitis, endocarditis, conjuntivitis o gastroenteritis aguda. Los acociles fueron extraídos de cuerpos de agua donde habitan escondidos en la vegetación por lo cual es probable que los *Bacillus* aislados de estos provengan del agua de su entorno (Forsythe, 2003) (Brooks, 2005, Mossel, 2003, Madigan, 2007).

Los *Staphylococcus* coagulasa negativos son microbiota norma de la piel y mucosas de humanos y animales y frecuentemente aislados en infecciones nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos o causando algún tipo de pioderma en animales (Brooks, 2005).

6.4.3 Bacterias aisladas en acocil asociadas a enfermedades en crustáceos

Aunque no se ha reportado que afecten directamente al *Cambarellus montezumae*, algunas bacterias como *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Bacillus* spp., *Citrobacter* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp. y *Staphylococcus* spp., han sido reportadas como organismos comensales causantes de enfermedades, tales como la Bacteriemia asintomática, en la cual el principal agente asociado es *Vibrio* spp., infección entérica bacteriana y la enfermedad bacteriana del caparazón. Estas enfermedades han sido reportadas en algunas especies de cangrejos de río tales como *A.astacus*, *C. destructor albidus*, *C. quadricarinatus* and *Procambarus clarkii* (Edgerton, 2001).

La bacteriemia asintomática o septicemia bacteriana, ha sido reportada en cangrejos de río aparentemente sanos. Se caracteriza por la presencia de una población mixta de bacterias en muestras de hemolinfa colectadas bajo

condiciones de asepsia. Se dice que las bacterias involucradas en esta enfermedad son flora normal de la hemolinfa de los cangrejos de río y de otras especies de crustáceos. Aunque en estudios realizados en otras especies de crustáceos sugieren que normalmente no están presentes estas bacterias de otros crustáceos, se han logrado aislar de langostas y camarones.

Otros autores (Scott and Thune, 1986; Thune, 1994), sugieren que la presencia de estas bacterias en la hemolinfa de los crustáceos sanos es resultado de la exposición de estos, a factores de estrés medioambientales.

En el caso de la infección entérica bacteriana las bacterias involucradas en esta patología se consideran microbiota normal del cangrejo de río, sin embargo en condiciones de estrés, pueden proliferar y causar necrosis del epitelio intestinal.

La enfermedad bacteriana del caparazón también se asocia a bacterias oportunistas y factores de estrés medioambientales (Barrera, 2006).

6.4.4 Bacterias aisladas en acociles cocidos

Las bacterias aisladas con mayor frecuencia de acociles cocidos fueron *Staphylococcus* coagulasa negativo (63.82%) y *Acinetobacter calcoaceticus* (12.76%). En acociles cocidos el número de bacterias aisladas fue menor, y de las dos bacterias aisladas con mayor frecuencia solo *Staphylococcus* spp. puede ser causante de enfermedad en humanos ya que *Acinetobacter calcoaceticus* es una bacteria que esta ampliamente distribuida en el ambiente que es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración, que es la temperatura a la que se almacenaban 6 de las 12 muestras trabajadas, pero no se ha reportado como causante de enfermedades en humanos (Brooks, 2005). Otra Bacteria aislada en menor

proporción (1.06%), fue *Aeromonas* spp., varias especies que están ubicadas dentro de este género han sido asociadas a problemas diarreicos en humanos.

Cuando se transmite una enfermedad por consumo de alimentos cocidos indica que hubo una mala higiene ya sea en el agua o utensilios que se utilizaron para la preparación de estos (Mossel, *et al.*, 2003) (Forsythe, 2003).

Este trabajo permitió establecer que las muestras de acociles crudos que están por arriba del límite permitido por la NOM-242-SSA1-2009 en cuanto a las especificaciones sanitarias para bacterias coliformes y mesófilas aerobias, así como las bacterias aisladas que pueden ocasionar enfermedades en humanos no son un riesgo directo para la salud del consumidor ya que los acociles se consumen cocidos. Las bacterias aisladas a partir de agua de embalse deben de servir como un indicador de la calidad del agua y se debe de tener presente un riesgo indirecto hacia el consumidor ya que esta en contacto directo con el agua para poder recolectar los acociles.

Los conteos obtenidos de mesófilas aerobias y los aislamientos obtenidos de en acociles cocidos nos indican que existe un riesgo para el consumidor ya que en algunas muestras los conteos de bacterias mesófilas están por arriba del límite permitido por la NOM-093-SSA1-1994, y en cuanto a las bacterias aisladas en acociles cocidos capaces de ocasionar enfermedad en humanos fueron: *Staphylococcus* spp. y *Aeromonas* spp., estas son causantes de enfermedad en humanos, por lo que la calidad de este alimento es un cuestionable riesgo de salud pública.

CONCLUSIONES

1.- Del total de muestras de acociles crudos, procesadas a 37°C el 40% rebasaron el límite permitido mientras que las de temperatura ambiente el 80% no cumplen con la especificación que indica la NOM-242-SSA1-2009. Productos de la pesca frescos-refrigerados congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Respecto al límite máximo permitido para bacterias coliformes (400NMP/g). En los acociles cocidos el total de las muestras incubadas a 37°C están dentro de los límites que establece la NOM-093-SSA1-1994 (<10NMP/g), en contraste las muestras incubadas a temperatura ambiente el 16% están por encima del límite establecido.

2.-En la determinación de mesofilicas aerobias, el total de las muestras cumplen con lo establecido por la NOM-242-SSA1-2009, el límite máximo permitido es de 10 000 000 UFC/g. Se observó que el 83.3% de las muestras de acociles cocidos incubadas a las dos temperaturas no cubrieron el límite establecido por la NOM - 093-SSA1-1994 (150 000 UFC/g).

3.-El total de las muestras de acociles crudos y cocidos, en las dos temperaturas, fueron negativas a la presencia de *Salmonella* spp., como lo especifica la NOM-242-SSA1-2009 (ausencia de *Salmonella* spp. en 25 g).

4.- Las bacterias aisladas en los acociles crudos: *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas caviae*, *Aeromonas*

hydrophila, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo., no representan un riesgo directo a la salud del consumidor, debido a que los acociles los consumen cocidos, sin embargo la presencia de estas bacterias en el agua de embalse representa un indicador de la calidad del agua y un riesgo indirecto para el pescador o comercializador de estos organismos.

5.-Las bacterias aisladas de acociles cocidos; *Aeromonas* spp. y *Staphylococcus coagulasa* negativo, son un riesgo en salud pública, estos microorganismos presentes en el alimento son indicadores de un manejo, almacenaje y preservación inadecuados.

6.-El estudio realizado nos muestra que los acociles crudos por el medio ambiente en el que se desenvuelven presentan una gran diversidad de microorganismos, algunos de los cuales pueden causar enfermedad en los humanos, afortunadamente los acociles se consumen cocidos lo cual disminuye considerablemente el riesgo, siempre y cuando se llevan a cabo las buenas prácticas en su manejo después de la cocción de lo contrario pueden llegar a ser un riesgo potencial para los consumidores por la presencia de microorganismos como lo es *Staphylococcus*, así que los acociles representan una buena opción para la alimentación del ser humano.

8 REFERENCIAS

- ④ DE SAHAGÚN FB. Historia general de las cosas de la Nueva España, Libro XI, capítulo 3. De los animales del agua. México DF, PORRUA, 1975.
- ④ MORONES BF. Aspectos reproductivos bajo condiciones de laboratorio de *Cambarellus montezumae* proveniente de la zona lacustre de Xochimilco (tesis de licenciatura). DF, México: UAM, 1991.
- ④ PALACIOS GA. Aspectos de reproducción, alimentación y crecimiento en cautiverio de *Cambarellus montezumae*, Saussure, 1858; (Crustácea; Decápoda) de Xochimilco (tesis de licenciatura). D F, México: UAM, 2003.
- ④ ARRIGNON J. Cría del cangrejo de río. Zaragoza, España: ACRIBIA, 1985.
- ④ HUNER JV. Crustacean and mollusk Aquaculture in the United Sates. Wesport: AVI Publishing Co. Inc, 1985.
- ④ GARCÍA OSA. Efecto de diversas dietas sobre sobrevivencia y crecimiento de crías de Acocil *Cambarellus montezumae* (tesis de licenciatura). D F, México: UNAM, 1991.
- ④ SANTIAGO MC. Evaluación de la tasa de crecimiento de *Cambarellus montezumae* Saussure, 1858; (Crustácea; Decápoda) a diferentes temperaturas bajo condiciones de laboratorio y algunos aspectos de su ciclo biológico (tesis de Licenciatura). D F, México: UAM, 2001.

- Ⓢ VILLALOBOS FA. Observaciones sobre *Cambarellus montezumae* y algunas de sus formas con descripción de una subespecie nueva. Anales del instituto de biología. Tomo XVI. Núm. 2. D F México: UNAM, 1943.
- Ⓢ CANTÚ LL. Contribución al conocimiento de la embriología de una especie de acocil: *Cambarellus montezumae montezumae*. Crustácea: Decápoda (tesis de licenciatura). D F. México: UNAM, 1959.
- Ⓢ HOBBS HH. Crayfish dsitribution, adaptative radiation and evolution. TIMBER PRESS. Portland: 1988.
- Ⓢ SANTOS CE. Estudios limnológicos del Estado de Tlaxcala. Departamento del hombre y su ambiente. Consejo divisional de ciencias biológicas. México: 2002.
- Ⓢ HOFMAN J. Así se crían cangrejos de río, biología, mantenimiento e importancia económica. BARCELONA. España: 1983.
- Ⓢ PÉREZ RR, MALPICA SA, BALDERAS J. Sedimentología y Fauna Bentónica (Presa de Atlangatepec, Tlaxcala). Cuadernos C.B.S. D F. México, 1989.
- Ⓢ INCLAN RV, MALDONADO SJ, HERRERA L JL. Reproducción de acociles en cautiverio. Acuavisión. Revista Mexicana de acuacultura. 1990. Año IV, Núm.20 23-26 p.
- Ⓢ RODRIGUEZ SM, CARMONA OC. Balance energético del Acocil *Cambarellus montezumae*. Perdida de energía en la tasa metabólica. Universidad y Ciencia. 2002; vol. 18. Núm. 36: 128-134.

- Ⓒ ROJAS PY. Revisión taxonómica de las especies de *Cambarellus* (Crustácea: Decápoda: Astacidae: Cambaridae) Análisis morfológico (tesis de maestría en ciencias). D F. México: UNAM, 2003.
- Ⓒ SÁNCHEZ MP. Aprovechamiento de los ambientes reducidos en los canales de Xochimilco para el cultivo de acocil *Cambarellus montezumae*, para consumo humano (tesis de maestría en ciencias). D F. México: UAM, 2007.
- Ⓒ HOPCRAFT D. La tecnología de la naturaleza Banco del Atlántico. México, 1980.
- Ⓒ GUTIÉRREZ YPJ. El papel ecológico del cangrejo rojo (*Procambarus clarkii*), en los ecosistemas acuáticos del Parque Nacional de Doñana. Una perspectiva ecofisiológica y bioenergética (tesis de Doctorado) España: UAM, 1997.
- Ⓒ ROSAS MM. Datos biológicos sobre el acocil del lago de Patzcuaro *Cambarellus montezumae patzcuarensis*. Memorias del simposio sobre pesquerías en aguas continentales. 1976; Tuxtla Gutiérrez (Chiapas) México. Programa Cultivos Diversos Instituto Nacional de Pesca.
- Ⓒ PILLAY TVR. Acuicultura Principios y Prácticas. 1ra. Edición. LIMUSA: México, 1997.
- Ⓒ ABRAHAMSSON SA. The crayfish *Astacus astacus* in Sweden and the introduction of the American crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Freshwater Crayfish, 1973.1:27-40.

- ④ GONZALEZ R. Estudios Bromatológicos del Acocil de la Presa de Atlangatepec, Tlaxcala. Manuscrito. D F. México: UAM-X, 1989.
- ④ RODRIGUEZ MA. Cultivo Semi-Intensivo del acocil *Cambarellus montezumae* en estanquería rústica en el estado de Tlaxcala. Segundo encuentro Regional de Investigaciones en Flora y Fauna zona V de Anvies. Hidalgo: Univ. Aut. de Hidalgo, 1991.
- ④ GIL S, ALBA T. Ecology of the native and introduced crayfishes *Astropotamobius pallipes* and *Procambarus clarkii* in southern Spain. Implications for conservation of the native species. Biol. Conserv 2002, 105: 75-77
- ④ ADAMS MR. Microbiología de los alimentos, Zaragoza, España: Acribia, 1997.
- ④ Internacional Comisión on Microbiological Specifications for foods. Microorganismos de los alimentos 1. Su significado y métodos de enumeración. Segunda edición. Zaragoza, España: Acribia, 2000.
- ④ GRAÜ C, LA BARBERA A, ZERPA A, SILVA S. Aislamiento de *Vibrio* spp. y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos *Arca zebra* y *Perna zebra* procedentes de la costa nororiental del estado de Sucre, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIV, Nº 6, 513 - 521, 2004.
- ④ Food and Agriculture Organization, Journal Food, Nutrition and Agriculture, México: 2001.

- Ⓢ NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-029-SSA1-1993**, Bienes y Servicios.
 Productos de la Pesca. Crustáceos Frescos-Refrigerados y Congelados.
- Ⓢ NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-113-SSA1-1994**, Bienes y Servicios.
 Método para la cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa.
- Ⓢ REMFRY JC. Euthanasia of animals in the schools-Trends and methods.
 Universities Federation For Animal Welfare (UFAW), 1986.
- Ⓢ Internacional Comisión on Microbiological Specifications for foods.
 Microorganismos de los alimentos. Técnicas de Análisis Microbiológico.
 Volumen I. Segunda edición. Zaragoza: Acribia, 1983.
- Ⓢ ROLANI VG. Applied Food Microbiology. Belmont, Ca: Star Publishing
 Company, 1997.
- Ⓢ NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-110-SSA1-1994**, Bienes y Servicios.
 Preparación y Dilución de Muestras de alimentos para su análisis
 microbiológico.
- Ⓢ NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-092-SSA1-1994**, bienes y Servicios.
 Método para la cuenta de aerobias en Placa.
- Ⓢ NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-112-SSA1-1994**, bienes y Servicios.
 Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del número más Probable.
- Ⓢ ELIOTT RP. Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis
 Microbiológico. Volumen I. Zaragoza: Acribia, 1983.

- Ⓢ NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-114-SSA1-1994**, Bienes y Servicios.
Método para la Determinación de Salmonella en Alimentos.
- Ⓢ CARTER GR, COLE A. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and
micology. 5ª ed.: Academic Press, 1990.
- Ⓢ DAVIS BD. DULBECCO R, EISEN HN, GINSBERG HS. Tratado de
Microbiología. 4ª edición. Barcelona: Masson S.A, 1996.
- Ⓢ BARROW GI, FELTHAM KA, Cowan and Steel's, Manual for the identification
of Medical Bacteria, Third Edition, Cambridge University Press, 1993.
- Ⓢ WHITFORD HW, ROSENBUSCH RF, LAUERMA LLH. Mycoplasmosis in
Animals: Laboratory Diagnosis. Iowa Ames Iowa, 1994.
- Ⓢ MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. Brock, Biología de los
Microorganismos. Prentice hall, 2007.
- Ⓢ BRACHO MG, MONTIEL M, BOTERO L. Virus entéricos, bacterias
enteropatógenas y organismo indicadores de contaminación en camarones y
en el agua y el sedimento de sus bancos de producción. Ciencia 2009; 17: 14-
24.
- Ⓢ COVENIN 453-93. Norma venezolana camarones congelados.
- Ⓢ NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental, Agua
para uso y consumo humano-límites permisibles de Calidad y Tratamientos a
que debe someterse el agua para su potabilización

- ② BECERRA TN, BOTELLO AV. Bacterias coliformes totales, fecales y patógenas en el sistema lagunar Chantuto-Panazacola, Chiapas, México. *Hidrobiológica* 1995; 5: 87-94.
- ② PROYECTO DE LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-242-SSA1-2005, Productos y Servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.
- ② Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires Argentina: 2005.
- ② FORSYTHE SJ, HAYES PR. Higiene de los Alimentos, Microbiológica y HACCP. Zaragoza, España: Acribia, 2002.
- ② GOURMELON M, CAPRAIS MP, MIEZSKIN S, MARTI R, WÉRY N, JARDE E, DERRIEN M, *et al.* Development of microbial and chemical MST tolos to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water research* 2010; 44: 4812-4824.
- ② EDGERTON BT, EVANS LH, STEPHES FJ, OVERSTREET RM. Synopsis of freshwater crayfish diseases and comensal organism. *Acuaculture* 2002; 206: 57-135.
- ② SANDOVAL PEJ, SABORIO CA. Calidad bacteriológica del agua en los sitios de recolección de “conchas negras” (*Anadara tuberculosa* y *Anadara similis*) en Chinandega, Nicaragua. *Encuentro* 2008; 81: 30-47.

- ④ CENTENO S, RODRIGUEZ BR. Actividad enzimática de bacterias frecuentes en camarones (*Litopenaeus schmitti*), mejillones (*Perna viridis*) y calamares (*Loligo plei*) congelados producidos en Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*; 2007, vol.27. 1: 349-363.
- ④ ELMOSSALAMI MK, EMARA M. Safety and quality of fresh water crayfish *Procambarus clarkii* in the river Nile. *Nahrung* 1999; 43:126-128.
- ④ Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2005.
- ④ FLORES AJJ, SUÁREZ HG, HEREDIA NMR, PUC FMA, FRANCO MJ. Calidad microbiológica de los alimentos marinos en la ciudad de Mérida, Yucatán. *Vet. Méx.* 1996; 27(4): 319-324.
- ④ FERNANDEZ EE. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Guadalajara (Jalisco) México, Univ. Guad. 1981.
- ④ MUÑOZ D, GRAÜ C, MARTÍNEZ C, MARVAL H, ZERPA A. Prevalencia de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. y enterobacterias en carne de pepitona, *Arca zebra*, comercializadas en Cumaná, Venezuela. *Zootecnia Trop.*; 2008: 505-513.
- ④ FELIX FA, CAMPAS BON, AGUILAR AMG. Calidad microbiológica del agua de consumo humano de tres comunidades rurales del sur de Sonora (México). *RESPYN* 2007; 3.

- ② MARTÍNEZ O, RODRÍGUEZ CJM, SANTOS A, OTERO A, GARCÍA LMI. Foodborne and indicator Bacteria in Farmed Molluscan Shellfish before and after Depuration. Journal of food protection 2009; 7: 1443-1449.
- ② MOSSEL DAA, MORENO B, STRUIJK CV. Microbiología de los alimentos. Segunda edición. Zaragoza, España: Acribia, 2003.
- ② FEHLHABER K, JANETSCHKE P. Higiene veterinaria de los alimentos. Zaragoza, España: Acribia, 1995.
- ② Internacional Comisión on Microbiological Specifications for foods. Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentarios. Zaragoza, España; Acribia, 2001.
- ② BROOKS GF, BUTEL J, MORSE S. Microbiología medica de Jawetz, Melnick y Adelberg. D F. México: Manual Moderno, 2005.
- ② MORILLO N, RONDÓN I, VALERO LK, BRACHO SU. Bacterias patógenas en carne de cangrejo comercializado fresco y pasteurizado. Maracaibo, Venezuela. Revista científica 2007; 3: 288-293.