



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

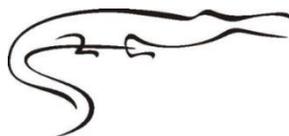
**RELACIÓN DE BACTERIAS AEROBIAS EN *Crocodylus moreletii*
(ARCHOSAURA: CROCODYLIDAE) Y EL MEDIO DONDE HABITA
EN LA LAGUNA LA COLORADA, COCODRILARIO TECOMÁN,
COLIMA**

T E S I S

**Para obtener el título de
BIÓLOGA**

P R E S E N T A

Frida Ximena Garnica Martínez



DIRECTO DE TESIS

Dr. Diego de Jesús Chaparro Herrera

Los Reyes Iztacala, Edo. de México 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Presencia de bacterias en cocodrilos	3
2.2 Calidad de agua	4
3. Hipótesis	6
4. Objetivos	7
4.1 Objetivo General	7
4.2 Objetivos particulares	7
5. Justificación	8
6. Descripción de Zona de Estudio	9
7. Materiales y Métodos	12
7.1 Método en campo	12
7.1.1 Toma de medidas morfométricas en cocodrilos	12
7.1.2 Toma de muestra bacteriológica en cocodrilos	14
7.1.3 Toma de muestra bacteriológica en el agua	15
7.2 Método de laboratorio	15
7.2.1 Análisis bacteriológico en <i>Crocodylus moreletii</i>	15
7.2.1.1 Género <i>Vibrio</i> en cocodrilos	15
7.2.1.2 Género <i>Enterobacter</i> en cocodrilos	17
7.2.1.3 Género <i>Pseudomonas</i> en cocodrilos	18
7.2.1.4 Género <i>Yersinia</i> y <i>Aeromonas</i> en cocodrilos	18
7.2.2 Análisis bacteriológico del agua	18
7.2.2.1 Aislamiento de <i>Vibrio</i> spp en el agua	18
7.2.2.2 Aislamiento de género <i>Enterobacter</i> en agua (Coliformes totales)	20
7.2.2.3 Aislamiento de género <i>Pseudomonas</i> en agua	21
7.2.2.4 Aislamiento de género <i>Yersinia</i> y <i>Aeromonas</i> en agua	21
7.2.3 Análisis de parámetros fisicoquímicos	22
7.2.3.1 Nutrientes	22
7.2.3.2 Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	24
7.2.3.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO)	26
7.2.4 Análisis Estadístico	27
7.2.4.1 ANOVA	27

7.2.4.2 Prueba de Tuckey	27
8 Resultados	28
8.2 Resultados bacteriológicos en <i>Crocodylus moreletii</i> en sus tres estadios y en el agua en donde habita en temporada de lluvias y secas	28
8.3 Análisis de Varianza por dos vías de las bacterias	32
8.4 Análisis fisicoquímicos	34
9 Discusión	43
10 Conclusiones	50
11 Bibliografía	51
ANEXOS I	59

Índice de Figuras

Figura 1. Vista dorsal y lateral de la cabeza de <i>Crocodylus moreletii</i>	1
Figura 2. Mapa Tecomán, Colima	10
Figura 2.1 Ubicación, Laguna “La colorada”	10
Figura 2.2 Ubicación, Cocodrilarío Tecomán	11
Figura 2.3 Cocodrilarío Tecomán	11
Figura 3. Captura con pértiga	12
Figura 3.1 Medidas morfométricas en <i>C. moreletii</i>	12
Figura 3.2 Medidas craneales de <i>C. moreletii</i>	13
Figura 4. Muestras en campo	14
Figura 5. Unidades Formadoras de Colonias, género <i>Vibrio</i> (cocodrilo)	16
Figura 6. Unidades Formadoras de Colonias, género <i>Enterobacter</i> (cocodrilo)	17
Figura 7. Unidades Formadoras de Colonias, género <i>Vibrio</i> (agua)	19
Figura 8. Tubos con caldo lactosado y caldo bilis verde brillante	20
Figura 9. Técnica por colorimetría para nutrientes	22
Figura 10. Preparación de muestras para Demanda Bioquímica de Oxígeno	25
Figura 11. Reacción de la prueba Demanda Química de Oxígeno	26
Figura 12. Tira reactiva de API 20 E	54

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies bacterianas en crías (exudado bucal y cloacal) y en el medio donde habitan (agua)	28
Tabla 2. Especies bacterianas en jóvenes (exudado bucal y cloacal) y en el medio donde habitan (agua)	29
Tabla 3. Especies bacterianas en adultos (exudado bucal y cloacal) y en el medio donde habitan (agua)	30
Tabla 4. ANOVA. Análisis de varianza por dos vías de las bacterias presentes en la cloaca de los cocodrilos en los tres estadios (Neonatos, Jóvenes y Adultos) por temporada (secas y lluvias)	32
Tabla 5. ANOVA. Análisis de varianza por dos vías de las bacterias presentes en la boca de los cocodrilos en los tres estadios (Neonatos, Jóvenes y Adultos) por temporada (secas y lluvias)	32
Tabla 6. ANOVA. Análisis de varianza por dos vías de las bacterias presentes en el agua de los cocodrilos en los tres estadios (Neonatos, Jóvenes y Adultos) por temporada (secas y lluvias)	32
Tabla 7. Coliformes Totales en el medio donde habita <i>C. moreletii</i>	34

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Coliformes Totales	34
Gráfica 2. Temperatura	35
Gráfica 3. Conductividad	35
Gráfica 4. pH	35
Gráfica 5. O ₂	37
Gráfica 6. DBO	37
Gráfica 7. DQO	37
Gráfica 8. Nitratos	39
Gráfica 9. Nitritos	39
Gráfica 10. Amonio	41
Gráfica 11. Fosfatos	41

1. Introducción

México cuenta con aproximadamente 125 sistemas lagunares costeros (con más o menos un millón de hectáreas) cuyo volumen de agua varía en ambos casos, en las distintas épocas del año (Agua.org.mx, 2012). Tienen cambios tan frecuentes y pronunciados en los factores bióticos y abióticos que provocan condiciones adecuadas para una alta productividad ecológica favoreciendo, a su vez, la riqueza de especies animales y de otros organismos tanto macroscópicos como microscópicos (Sánchez, 2003). Es así que se presentan numerosas especies bacterianas, que por sus funciones son un grupo muy importante en la biota. Proliferan en la superficie expuesta a la humedad formando una biopelícula. La mayor parte de bacterias se encuentran en zonas de planos lodosos anteriores a los manglares donde se hallan asociadas a las partículas de sedimentos, hojas de mangles muertas y a materia orgánica (Díaz y col., 2010). En este tipo de ecosistemas en el que se presenta comunicación entre aguas de clasificación baja y aguas profundas con acceso a zonas secas como lo indica Ramos – Targarona en 2013, le proporciona un hábitat ideal a *Crocodylus moreletii*

El área ocupada por *C. moreletii* en los tres países de su distribución es de 450 000 km², teniendo en México el 88% de esta superficie (Padilla y col., 2011). La altitud promedio donde se encuentra la especie es menor a los 500 m en sitios con temperaturas medias anuales entre 26 y 28°C y donde la temperatura mínima no es inferior a los 18°C, con precipitaciones entre los 600 y 4000 mm (Sigler y Gallegos, 2017). Este cocodrilo se distingue por ser de tamaño promedio entre 3 - 3.5 m y las crías al nacer entre 25 - 30 cm. La cabeza es aplanada y ancha, hocico relativamente corto y bastante redondeado en la punta. Su longitud es 1.5 a 1.7 veces al ancho basal. Dientes de tipo tecodonto, 5 dientes premaxilares, 13 o 14 maxilares y 15 mandibulares, sutura interpremaxilar considerablemente más corta que el ancho sumado de los premaxilares (SEMARNAP, 1999).

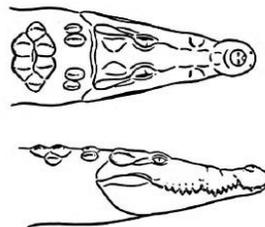
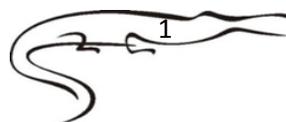


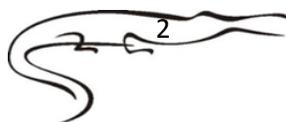
Figura 1. Vista dorsal y lateral de la cabeza de *Crocodylus moreletii*.
Tomado de: Guía de identificación de los cocodrilos protegidos por la CITES (1995)



Algunos ejemplares maduros presentan un par de crestas transversales frente a los ojos que se unen a la mitad dorsal de la mandíbula superior, en el cuello tiene cuatro o más escudos postoccipitales y seis o más nucales. Las escamas ventrales tienen glándulas foliculares y sin botones osteodérmicos. La cola es redondeada al principio y posteriormente comprimida, principalmente en la porción distal. Presenta verticilos intercalados en la parte ventral de la cola (Aguilar, 2005). La superficie dorsal de los adultos es generalmente amarillo-verdosa y puede llegar a ser casi negra. En los juveniles se presentan pequeños flecos amarillentos formando bandas cruzadas y la superficie ventral es blanca amarillenta sin marcas (SEMARNAP, 1999).

El género *Crocodylus* puede adquirir ciertos agentes bacterianos como *Aeromonas* y *Edwardsiella*, ya sea por contacto (Cortez – Martínez, 2015) o bien a partir del nacimiento, principalmente durante la eclosión. Por otro lado las *Firmicutes* y *Bacteroidetes* participan en el establecimiento del microbioma intestinal fundamental para procesos como la digestión, metabolismo y defensa como lo menciona Margulis – Lynn en 2014. A pesar de que la microbiota que poseen es muy diferente a la que presentan animales homeotermos; *Salmonella* spp se encuentra dentro del microbiota normal del tracto gastrointestinal (Carrquiriborde, 2010).

Sin embargo los cocodrilos suelen portar bacterias que tienen el potencial para causar una enfermedad en ciertas circunstancias (Tercero, 2011). Se conoce que en vida silvestre tienen un sistema inmunológico particularmente efectivo, pero cuando se crían en cautividad, el sistema inmunológico se puede ver comprometido, ya que se considera que los niveles de estrés asociados con el manejo afectan directamente a su inmunocompetencia (Hutton y Webb, 1990). Las desviaciones en las condiciones ambientales óptimas, en las rutinas de limpieza y otros procedimientos de manejo pueden tener como resultado debilitar a los animales, causando reducción de apetito y menos resistencia a las enfermedades (Hutton y Webb, 1990)



2. Antecedentes

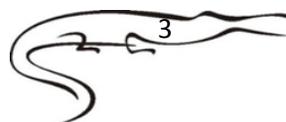
2.1 Presencia de bacterias en cocodrilos

Rubio-Limonta y cols. (2013), estudiaron diferentes ejemplares de cocodrilos (*Crocodylus acutus*) en el criadero Sabanalamar, Cuba, tomando muestras de mucosa ocular, bucal, hígado, riñón, corazón, bazo y cerebro bajo condiciones asépticas, posteriormente aislaron las bacterias de cada zona, encontrando que el 44% correspondían al género *Aeromonas* y el 25% a *Pseudomonas*. Otras bacterias identificadas en menos porcentaje fueron *Staphylococcus* (14%), *Vibrio* (3%), *Yersinia* (2%), *Streptococcus* (3%) y *Citrobacter freundii* (2%). En la mucosa bucal encontraron presencia de *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Citrobacter freundii*.

Otto y Sogbe en el 2000, analizaron por 14 años cuatro criaderos de cocodrilos en Venezuela, trabajaron con 80 neonatos, 130 crías, 60 jóvenes y 17 adultos de (*Crocodylus intermedius*). Encontraron *Edwardsiella tarda* en cloaca, *Proteus* spp, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp en intestino delgado, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus* spp, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* en el estómago, asimismo se reportaron *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus* sp y *Klebsiella pneumoniae* en la mucosa bucal.

Cupul-Magaña y cols. En 2005, realizaron un análisis bacteriano a ejemplares de *Crocodylus acutus* que habitan en la laguna costera de agua dulce "Boca Negra" localizada al norte de la mancha urbana de Puerto Vallarta, Jalisco, México, para conocer las bacterias presentes en la cavidad oral, para lo cual se revisaron dientes, paladar, región gular de la cavidad oral de tres machos adultos y cinco ejemplares jóvenes. Se encontró que en los adultos hay *Aeromonas hydrophila*, *Arizona* sp, *Citrobacter diversus*, *C. freundii*, *Enterococcus* sp, *Escherichia coli*, *Neisseria* sp, *Streptococcus viridans* y en jóvenes *Aeromonas hydrophila*, *Arizona* sp, *Citrobacter diversus*, *C. freundii*, *Enterococcus* sp, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* sp.

Charruau y cols. (2012), capturaron 43 organismos de *Crocodylus acutus* de los cuales 4 eran neonatos, 18 jóvenes, 4 semiadultos y 9 adultos; y 28 organismos de *Crocodylus moreletii* con 4 neonatos, 5 jóvenes, 7 semiadultos y 4 adultos. Aislaron en *Crocodylus acutus* 32 especies de bacterias de las cuales 5 se encontraron en cavidades orales y cloacales (*Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Rhodococcus equi*); mientras que en la cavidad oral solo se encontraron

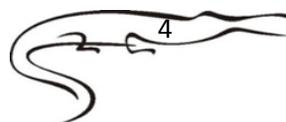


17 especies que son; *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium* sp, *Enterococcus durans*, *E. faecium*, *Fusobacterium* sp, *Moraxella catarrhalis*, *M. cuniculi*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. intermedius*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* sp y 10 especies en cavidad cloacal *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter diversus*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* sp, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Salmonella enterica arizonae*. En el caso de los cocodrilos de pantano *Crocodylus moreletii* se aislaron 29 bacterias diferentes, de las cuales 7 se encontraron en la cavidad oral y cloacal *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica arizonae*, *Serratia rubidaea*, 15 en la cavidad oral *Arcanobacterium pyogenes*, *Aerococcus viridans*, *Citrobacter freundii*, *Kluyvera* sp, *Obesumbacterium proteus*, *Shiguella* sp, *Fusobacterium necrophorum*, *F. sp*, *Listeria monocytogenes*, *Rhodococcus equi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. agalactiae*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus pneumoniae* y 7 en la cavidad cloacal *Citrobacter diversus*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter cloacae*, *E. gergoviae*, *Hafnia alvei*, *Salmonella enterica enterica ser. Typhi*, *Yersinia enterocolitica*

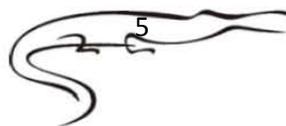
1.2 Calidad de agua

Escobedo y cols. (1999), En el sistema lagunar de san Ignacio-Navachiste, Sinaloa. De acuerdo a los estándares de calidad de agua para usos Recreativos con Contacto Primario y Protección de la Vida Acuática establecidos en los criterios Ecológicos de Calidad de Agua 1989, encontraron que la calidad fluctuó entre buena y regular, durante marzo de 1998 a febrero de 1999. De los parámetros analizados, los que tuvieron valores situados fuera de Norma fueron el pH con valores de 6.05 y 8.94 ya que los valores no deben tener intervalos mayores de 0.2 unidades de pH y las bacterias coliformes fecales tuvieron un rango de concentración de <30 org/100 ml a 1500 org/100 ml y la concentración de estas no debe excederse de 200 organismos como número más probable en 100 ml de agua.

Barrera y col. (1999), realizaron una evaluación microbiológica de la laguna Tamiahua, Veracruz. Tuvieron registros de temperatura bastante uniformes (29.1°C promedio), respecto al pH encontraron relación con los grupos de bacterias que se analizaron con un registro mínimo de 8.1 y el máximo de 9.0. El oxígeno disuelto no parece ser determinante en la presencia de los grupos bacterianos analizados. Mencionaron que la suspensión de bacterias del sedimento puede incrementar el contenido de bacterias en el agua,



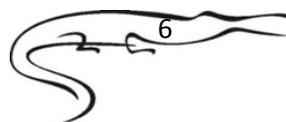
explicando las altas concentraciones de coliformes en la colecta de septiembre. Observaron que la entrada de materia orgánica y la re-suspensión de sedimento se han asociado a una disminución del oxígeno disuelto.



3. Hipótesis

Dada la importancia ecológica y económica en vida silvestre y cautiverio que tiene *Crocodylus moreletii*, se considera que si donde ellos habitan puede ser un factor de transmisión de bacterias posiblemente patógenas por la contaminación directa o indirecta causada por actividades antropogénicas, que esto a su vez cause estrés que afecta su sistema inmunológico.

Si se presentan bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Vibrio*, entonces se generará un impacto negativo en las poblaciones de *C. moreletii*, causando enfermedades, muerte y natalidad baja.



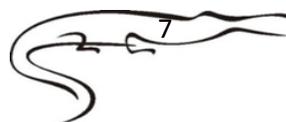
4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Analizar si existe una relación de la microbiota de *Crocodylus moreletii*, y el medio donde habita.

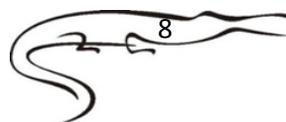
4.2 Objetivos particulares

- Clasificar por estadios (neonatos, jóvenes y adultos) a *C. moreletii* de acuerdo a sus dimensiones, para observar las diferencias en la microbiota por estadio.
- Conocer la diversidad de bacterias dentro del agua habitada por *C. moreletii* con la mejor resolución taxonómica posible.
- Conocer la diversidad de bacterias en cavidad oral y cloacal de *C. moreletii* en tres estadios.
- Registrar condiciones ambientales del área de estudio como la temperatura, pH, conductividad, O₂, demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO).
- Conocer las concentraciones de nutrientes dentro del agua como los nitratos, nitritos, amonio y fosfato.



5. Justificación

Crocodylus moreletii es de gran importancia para la dinámica del ambiente por ser especie sombrilla y depredador tope, actualmente se ha implementado la comercialización tanto de carne, órganos y piel como de individuos. El sistema inmunológico de los cocodrilos es eficiente para evitar patógenos en vida silvestre pues se ha visto que a pesar de tener heridas o pérdida de extremidades evitan infecciones, aunque el estrés al que son sometidos por la pérdida de su hábitat y por la contaminación de diferentes orígenes, trae consigo enfermedades de origen nutricional, infeccioso y tóxico, estas afectaciones se ven reflejadas en cautiverio y debido a esta condición están sometidos a un constante estrés, lo que baja sus defensas y permite la entrada de microorganismos como *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* sp y *Shigella* sp, entre otros, que pueden afectar a los cocodrilos. Se conoce poco acerca de la relación de su microbioma natural y las bacterias que se encuentran en el agua de su hábitat. Actualmente, el conocimiento sobre la biología de *C. moreletii* está en gran parte restringido a la genética de sus poblaciones, reproducción, anidación en cautiverio y vida silvestre, conservación, alimentación y estudios moleculares. Para la conservación de *C. moreletii*, en adición a estos temas, se requiere un buen conocimiento de las condiciones adecuadas del cultivo de estos cocodrilos, lo cual implica la calidad del agua en donde habitan ya que pueden presentar perturbación directa o indirecta, esto puede ser un factor de transmisión de bacterias afectando a los cocodrilos en sus diferentes estadios impidiendo que tengan un óptimo desarrollo bajando su tasa poblacional en vida silvestre y un declive en la reproducción de los organismos en cautiverio, impidiendo un buen manejo sustentable, ocasionando que a su vez exista un factor de transmisión de bacterias posiblemente patógenas para las personas que se dedican a su mantenimiento.



6. Descripción de Zona de Estudio

El estado de Colima se encuentra dentro de dos áreas que corresponden a dos grandes provincias fisiográficas del país: la del Eje Neovolcánico y la de la Sierra Madre del Sur. La segunda provincia la integran dos subprovincias, la Sierra de la Costa de Jalisco y Colima y la Cordillera Costera del Sur. La primera comprende los municipios de Comalá, Coquimatlán, Villa de Álvarez y Tecomán (INEGI, 1985).

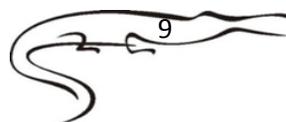
Dentro del estado se encuentra el municipio de Tecomán localizado en la porción sureste del estado entre las coordenadas 103°59' longitud oeste del Meridiano de Greenwich y 18° 41' 20" latitud norte. Limita al Norte con los municipios de Coquimatlán y Colima, al sur con el Océano Pacífico, al este con el municipio de Ixtlahuacán, al oeste con el de Armería y al sureste con el estado de Michoacán. Está situado a 33 metros sobre el nivel del mar.

En Tecomán predominan los climas: semiárido, semicálido con lluvias en verano (BS1hw) al norte y al centro del municipio y cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw) hacia el sur (García, 2004).

La temperatura media anual es de 26°C, con una precipitación media anual de 484.9 milímetros siendo el régimen de lluvias, principalmente en verano (Palomera, 2004).

Tiene dos zonas bien definidas: la costera conocida como el Valle de Tecomán y las estribaciones de la Sierra Madre Occidental con 365 km² la vegetación que predomina son Xolocoahuítl (*Cordia aeleagnoides*), Jabillo (*Hura crepitans*), Mojo (*Brosium alicastrum*), Guásima (*Guazuma ulmifolia*), Tepemezquite (*Lysiloma microphyllum*), Asmol (*Zizyphus mexicana*), Timúchil (*Pithecellobium timuchil*), Otate (*Guadua amplexifolia*), etc. En lo que respecta a la parte del Valle ésta fue reforestada con plantaciones de palmeras, frutales, limón y otros cultivos.

Parte de la fauna que habita en la zona es el coyote (*Cannis latrans*), tejón (*Taxidea taxus*), ardilla (*Sciurillus pusillus*), iguana (Iguana iguana), peces del río, cocodrilos en esteros y lagunas (*Crocodylus acutus* y *C. moreletii*), aves como la güilota (*Zenaida macroura*) y la chachalaca (*Ortalis poliocephala*) (Palomera, 2004).



Existen en la planicie costera dos lagunas: la de Amela que tiene una capacidad de almacenamiento de 30 millones de m³ y la de Alcuzahue que cubre un área de 160 hectáreas a 1 km de esta laguna se encuentra la Colorada, una laguna que se ha utilizado para el turismo en donde se encuentra el cocodrilario “Tecomán”.

El cocodrilario “Tecomán” es una Unidad de Manejo Ambiental (UMA) denominada “Centro Reprodutor de Cocodrilos” en donde SEMARNAT ha implementado varias estrategias de protección y conservación de la vida silvestre. Se encuentra a 8 kilómetros al este de la ciudad de Tecomán. Siendo sus coordenadas 18°54'45” N y 103°46'51” W.



Figura 2. Mapa Tecomán, Colima. Ubicación Tecomán, Colima México con 103°59' longitud oeste del Meridiano de Greenwich y 18° 41' 20" latitud norte. (Por Google earth INEGI, 2017).

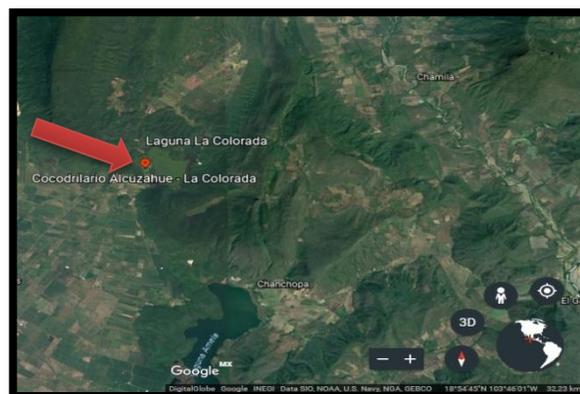


Figura 2.1. Laguna “La colorada”. Ubicación laguna “La colorada” Tecoman, Colima con 18°54'42” N y 103°46'39” W. (Por Google earth INEGI, 2017).



Figura 2.2 Cocodrilario Tecomán. Ubicación del cocodrilario Tecoman. Se encuentra dentro de la laguna “La Colorada” unida con la laguna de “Alcuzahue” cubriendo un área total de 160 ha. Coordenadas 18°54’45” N y 103°46’51” W (Por Google earth INEGI, 2017).



Figura 2.3 Cocodrilario Tecoman en Laguna “La colorada” Fotografía: F.X. Garnica- Martínez.

7. Materiales y Métodos

7.1 Método en campo

7.1.1 Toma de medidas morfométricas en cocodrilos

Se utilizó la técnica denominada “Manipulación directa” que consta de una captura con lazo de acero y pértiga más la utilización de cuerdas para una sujeción correcta de tensión a dos puntos (cola y hocico) (Domínguez-Laso y cols., 2011).

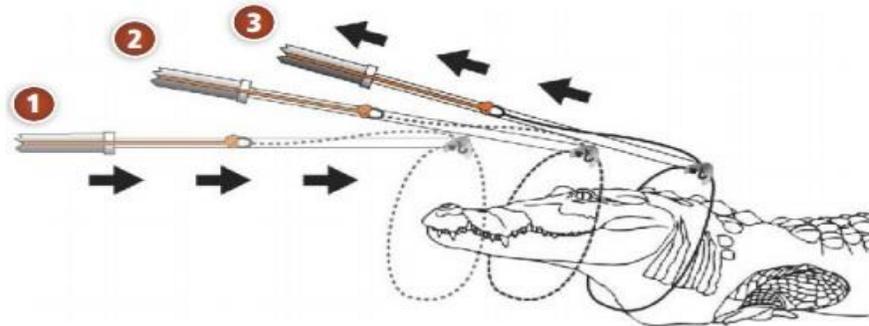


Figura 3. Captura con pértiga. Método recomendado para colocar una pértiga con lazo de acero desprendible. Imagen: J. Domínguez-Laso

En la Manipulación directa el lazo se inserta hasta el cuello del cocodrilo donde se asegurará que el ejemplar sea capturado: primero se acerca el aro del lazo de acero y se mete la cabeza, cuidando de no tocar la mandíbula del cocodrilo, llegando hasta el cuello. Después se tira de la cuerda, tensándola con alta resistencia, para cerrar el lazo de acero y así sujetar al ejemplar.

De cada individuo capturado se tomaron medidas morfométricas:

- Dos dimensiones generales del cuerpo (longitud hocico - cloaca)
- Cuatro mediciones del cráneo (longitud total del cráneo (LTC), anchura del cráneo (AMC), anchura entre protuberancias maxilares (AMX), anchura protuberancia premaxilares (APM)).

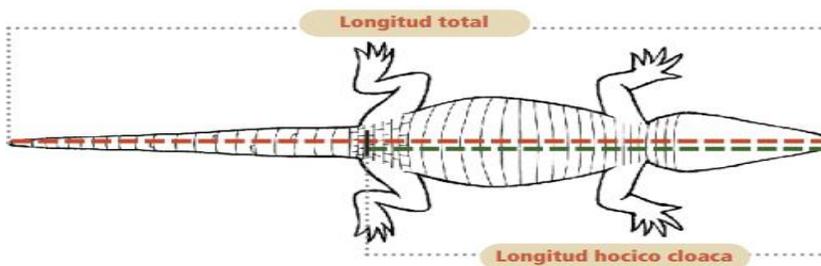


Figura 3.1. Medidas morfométricas. La manera correcta de tomar las medidas de longitud total (LT) y longitud hocico-cloaca (LHC) es en posición ventral. Imagen: S. Padilla-Paz.

Cada uno de los ejemplares debe estar colocado en posición de decúbito dorsal (vientre arriba), extendido lo más posible, de modo que quede totalmente recto sobre una superficie plana. Para la LT se medirá desde el extremo del cráneo o punta del hocico hasta el punto de inicio de la cloaca.

Basándose en la longitud total del animal se clasificó en grupos:

- Neonatos (0 - 30cm)
- Jóvenes (51 - 100 cm)
- Adultos (101 cm)

Las mediciones se tomaron en centímetros (Sánchez Herrera y col., 2011), éstas medidas se hicieron con una cinta métrica (0.1mm)

La longitud total del cráneo (LTC) se midió en línea recta desde el extremo del hocico hasta el borde posterior del hueso supraoccipital; la Anchura Mayor del Cráneo (AMC) se midió transversalmente, entre los extremos de los huesos cuadrado, la anchura entre las protuberancias maxilares (AMX), y la anchura entre las protuberancias premaxilares (APM) (Jerónimo et al., 2011).

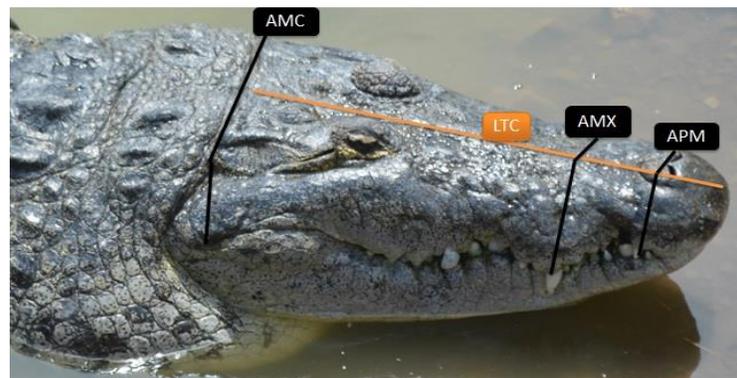


Figura 3.2. Medidas craneales. Serie de medidas craneales registradas. Fotografía: A. Acosta-Lugo.

7.1.2 Toma de muestra bacteriológica en cocodrilos

La toma de muestras bacteriológicas en los cocodrilos se realizó por medio de un frotis con un hisopo estéril en la cavidad oral y cloacal, posterior a esto cada hisopo se pasó a tubos de medio de transporte AMIES; en este medio los nutrientes están limitados a manera de evitar la multiplicación de los microorganismos. El tioglicolato de sodio proporciona un bajo potencial de óxido-reducción, haciendo que el medio sea favorable para conservar la viabilidad de los organismos durante su traslado (Oneeglio y Cruz, 2008). Las muestras en este medio se conservaron a temperatura ambiente durante el transporte.



Figura 4. Muestras en campo. Toma de muestra con hisopo estéril en cavidad oral y cavidad cloacal. Fotografía: A, Acosta-Lugo.

Otro medio utilizado para el transporte de las muestras bacteriológicas fue caldo nutritivo; con propósitos generales para desarrollar microorganismos con escasos requerimientos nutricionales, contiene pluripeptona y extracto de carne que constituyen una fuente de carbono y nitrógeno necesarias para el adecuado desarrollo bacteriano (Oneeglio y Cruz, 2008). Las muestras se conservaron en refrigeración antes y durante el transporte.

7.1.3 Toma de muestra bacteriológica en el agua

Se utilizó el método de “hisopo de moore” (Podlesky y Cardenas, 1995). Consistió en dejar un hisopo estéril en los cuerpos de agua donde se encuentra *Crocodylus moreletii* en sus diferentes estadios por 24 horas. Pasadas las 24 horas se retiró y se colocó en bolsas estériles con medio AMIES para el transporte al laboratorio donde se procesaron las muestras.

Las muestras para las pruebas fisicoquímicas se tomaron con tres botellas de dos litros forradas con aluminio, una para cada estadio de *C. moreletii*, llenando hasta el tope y cerrando bajo el agua para impedir la entrada de oxígeno, ya que al permitir la entrada de este, interfiere el oxígeno atmosférico en el oxígeno del agua. Se mantuvieron en hielo hasta el traslado al laboratorio en donde se corrieron las pruebas.

Para el análisis de coliformes totales y fecales en el agua se tomaron muestras con bolsas para transportar bacterias que se depositaron en una hielera con hielo para su posterior transporte al laboratorio en donde se realizó la técnica correspondiente.

7.2 Método de laboratorio

7.2.1 Análisis bacteriológico de *Crocodylus moreletii*

7.2.1.1 Género *Vibrio* en cocodrilos

De las muestras colectadas en campo en tubos con medio AMIES y Caldo nutritivo se tomó una alícuota para sembrar en placas de agar selectivo:

- **TCBS**, medio de recubrimiento primario utilizado universalmente, causa inhibición de bacterias gram-positivas por la incorporación de Oxgall. El tiosulfato sódico sirve como fuente de azufre y con el citrato férrico detecta la producción de sulfuro de hidrógeno, la sacarosa se incluye como carbohidrato fermentable para el metabolismo de los vibriones (Carrillo 1991).

✓ *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*.

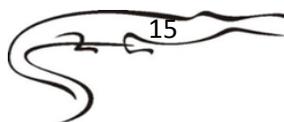
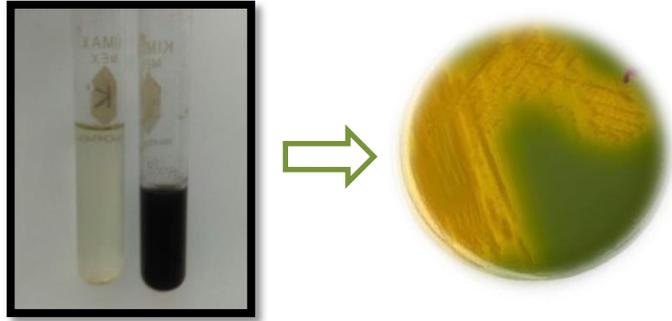


Figura 5. Unidades Formadoras de Colonias del género Vibrio.

Sembrado por estría cruzada en agar TCBS de los tubos de medio de transporte AMIES y caldo nutritivo



Se dejó incubar un periodo de 24 horas y posteriormente se inició el aislamiento por 3 días, resembrando en placas con agar TCBS por estría cruzada hasta encontrar una colonia aislada.

Una vez determinada la colonia se realizó la prueba de tinción Gram (Ver anexo) para diferenciarla como Gram positivo o Gram negativo, a su vez se sembró por picadura y estriado en tubos de TSI (Agar Hierro y Triple azúcar) para la diferenciación de bacterias, con base en la fermentación de los hidratos de carbono glucosa, lactosa y sacarosa y la producción de ácido sulfhídrico (McFaddin, 2003). Incubándose a 35°C por 24 horas. Al arrojar resultados de los tubos de TSI se realizó un tren de bioquímicas (Ver anexo) para determinar las características metabólicas de las bacterias utilizando:

- Agar hierro y lisina (LIA)
- Agar citrato de Simmons
- Medio MIO
- Oxidasa

Con los resultados negativos y positivos se creó un perfil bioquímico para cada bacteria que se corroboró en literatura.

Para verificar los resultados obtenidos por tren bioquímico se realizó prueba API20 E (Ver anexo).

7.2.1.2 Género *Enterobacter* en cocodrilos

De los tubos de Amies y caldo lactosado, se tomó una muestra que se pasó por estría a placas de agar Mac Conkey; Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. La lactosa y el indicador de pH rojo neutro, permiten la diferenciación de las bacterias lactosa positiva y las no fermentadoras (Oneeglio y Cruz, 2008).

A sí mismo se utilizaron placas de agar XLD para la identificación de enterobacterias pues la presencia de desoxicolato de sodio es el agente que inhibe a los microorganismos Gram positivos. La xilosa es fermentada por casi todas las bacterias entéricas a excepción de *Shigella*, la presencia de lisina ayuda a la diferenciación del grupo *Salmonella*. La lactosa y la sacarosa inducen la producción de ácido por los coliformes (Oneeglio y Cruz, 2008).

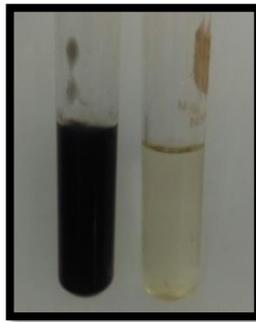


Figura 6. Unidades Formadoras de Colonias del género *Enterobacter*.

Sembrado por estría cruzada en agar McConkey de las muestras en tubos con medio de transporte AMIES y caldo nutritivo.

Los medios se incubaron a 35°C por 24 horas. -Tras las 24 horas se seleccionan colonias propias del género *Enterobacter* para ser aisladas resemebrándose en placas con agar de Mac Conkey o *Salmonella Shigella*; Los microorganismos Gram positivos son inhibidos por las sales biliares, citrato de sodio y verde brillante (Oneeglio y Cruz 2008), la diferenciación de las bacterias se logra mediante la lactosa.

Se llevaron a incubación a 35°C por 24 horas. Una vez concluido el aislamiento se hizo tinción Gram y se corrió el tren de bioquímicas:

El perfil bioquímico de cada enterobacteria, se corroboró mediante la prueba de API20 E.

7.2.1.3 Género *Pseudomonas* en cocodrilos

Se tomó una muestra de los tubos con medio Amies y Caldo nutritivo se sembró directo en placas de Agar leche; el extracto de levadura, la peptona de caseína y la leche descremada al 10% proporcionan al medio los nutrientes específicos para el desarrollo de microorganismos como: *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *P. aeruginosa*. Su pH es bajo, presenta un sales en porcentajes de de 0.4% de Sodio, 0.2% de Calcio, 0.1% de Magnesio y de metales 0.001% de Hierro y 0.0005% de Plomo, como máximo (Schlegel y Zaborosch, 1997) se incubaron por 24 horas a 35°C y se tomaron como resultados positivos las colonias amarillo verdoso fluorescente.

7.2.1.4 Género *Yersinia* y *Aeromonas* en cocodrilos

De los tubos con medio Amies y caldo nutritivo se tomaron alícuotas que se pasaron por estría directa a placas de Agar *Yersinia* y *Aeromonas*, incubándose por 24 horas a 35°C. Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron colonias típicas para posteriormente realizar prueba de tinción Gram y correr tren de bioquímicas.

Teniendo los resultados positivos o negativos se formó el perfil bioquímico que se corroboró con prueba API20 Enterobacteriaceae.

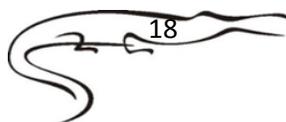
7.2.2 Análisis bacterial en el agua

7.2.2.1 Aislamiento de *Vibrio* spp en el agua

La identificación de *Vibrio* se dividió llevó a cabo en cuatro días.

Día 1: Primer enriquecimiento . Se abrió la bolsa del hisopo con la muestra y de ésta se tomaron 10ml con una pipeta serológica de 10 ml a un matraz de 125 ml con 100 ml de Agua Peptonada Alcalina doble concentración (APA 2X) para proporcionarles los nutrientes necesarios para la supervivencia y crecimiento abundante de los vibrios.

El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico en el medio. El pH es elevado y favorece el desarrollo de microorganismos que tienen la capacidad de crecer en este medio, inhibiendo a la biota acompañante (Schlegel y Zaborosch, 1997). Se incubó a 37°C durante 6 horas. Pasadas las 6 horas se tomó un inóculo de la biopelícula blanquecina y se sembró por estría cruzada en 3 de placas de TCBS (Tiosulfato, Citrato y Sales Biliares), se incubó a 37°C durante 24 horas.



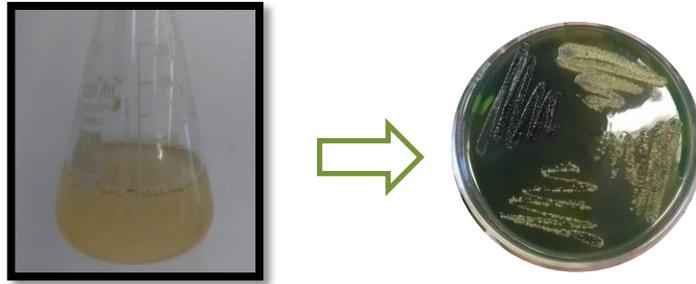


Figura 7. Unidades Formadoras de Colonias del género Vibrio. Sembrado por estría cruzada en agar de TCBS de la muestra en Agua Peptonada Alcalina.

Segundo enriquecimiento: Se tomó con una pipeta serológica 5 ml de la biopelícula del APA 2X y se inoculó en 100ml de APA concentración sencilla (APA 1x), incubando a 37°C durante 24 horas.

Día 2: se revisaron las placas de TCBS para observar si hubo presencia de crecimiento y se seleccionaron cinco colonias típicas (colonias de 1-2 mm, de color amarillo, ligeramente convexa, pegajosas con centro opaco y periferia ligeramente traslúcida), a cada colonia se le realizó tinción Gram, de esas colonias se sembró por picadura y estriado en tubos de TSI y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Segundo enriquecimiento: De los APA 1X , después de 24 horas, se tomó una asada de la biopelícula y se sembró por estría cruzada en 3 placas de TCBS, se incubaron a 37°C por 24 horas.

Día 3: se revisaron las placas de TCBS del segundo enriquecimiento, se seleccionaron cinco colonias típicas de Vibrio y por cada colonia se hizo tinción Gram y se sembró por picadura y estriado en tubos de TSI e incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente a los resultados de los TSI (primer enriquecimiento) se les realizó el tren de pruebas bioquímicas.

De igual manera se hizo el mismo procedimiento para los resultados de TSI del segundo enriquecimiento.

7.2.2.2 Aislamiento del género *Enterobacter* en agua (Coliformes totales)

Se utilizaron diez tubos con agua de dilución (1L de agua destilada + 1.25ml de solución de fosfatos + 5ml Solución de magnesio). De la muestra de agua de las bolsas transportadoras de bacterias, se tomó 1 ml pasándose al primer tubo ya preparado con agua de dilución, haciéndose diez diluciones. Se utilizaron las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , de cada dilución se tomó una alícuota de 1 ml y se pasó a series de 5 tubos con 10 ml de caldo lactosado; incubándose a 37°C por 24 horas. La pepetona y el extracto de carne proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos fermentadores de lactosa, se demuestra por la formación de gas que se observa en las campanas de Durham. (Cavallini, 2005).

Pasadas las 24 horas si los tubos presentaron turbidez y producción de gas (desplazamiento del medio) se consideraron resultados positivos para posteriormente realizar la fase confirmativa que consistió en; transferir en campo estéril a tubos con caldo bilis verde brillante; la bilis y el verde brillante inhiben el desarrollo indeseable de los microorganismos acompañantes de los coliformes totales y fecales, incluso suprimen el crecimiento de los anaerobios fermentadores de lactosa (Schlegel y Zaborosch, 1997) y caldo EC (*Escherichia coli*); la lactosa es fermentada por los Coliformes y *E. coli* con producción de gas. Las sales biliares inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. La peptona de caseína proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de las bacterias y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico (Schlegel y Zaborosch, 1997).

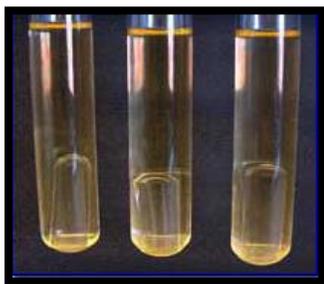


Figura 8. Tubos con caldo lactosado y caldo bilis verde brillante.

Se especificó cada dilución y se agitó para su homogenización, para bilis verde brillante se incubó a 35°C por 24 horas y para caldo EC a baño maría a 44°C por 24 horas.

Tras las 24 horas nuevamente se consideraron resultados positivos de caldo bilis verde brillante cuando los tubos presentaron turbidez y producción de gas.

Se registró el número de tubos positivos de cada serie y se consultaron las tablas de datos (concentraciones conocidas, volumen, fecha, zona de muestreo, positivo/negativo) para reportar el NMP por 100 ml.

Pasadas las 24 horas se consideró la prueba en EC (*Escherichia coli*) positiva si los tubos presentaban turbidez y producción de gas. Se registró el número de tubos positivos de cada serie, solo los obtenidos de la prueba confirmativa y se buscó el código en tablas para determinar el NMP de microorganismos coliformes fecales.

El crecimiento bacteriano de EC, se transfirió a agar Mac Conkey para identificar bacterias del genero *Enterobacter*, se hizo el procedimiento para aislar bacterias durante 3 días; pasados los 3 días con las colonias aisladas y purificadas se realizó tinción Gram y se corrió el tren de bioquímicas.

Terminadas las pruebas se realizó análisis de los perfiles bioquímicos y se corroboró el resultado con API 20E (BioMérieux).

7.2.2.3 Aislamiento del género *Pseudomonas* en agua

Se tomó 1ml del medio de transporte AMIES (hisopo de moore) y se sembró en caldo nutritivo dejándolo incubar a 35°C por 24 horas.

Pasadas las 24 horas se utilizó una alícuota que se sembró por estría cruzada en placas de Agar leche, incubándose a 35°C por 24 horas. Transcurridas las 24 horas se revisaron los resultados, considerándose como positivos las placas que presentaban colonias amarillas verdosas fluorescentes.

7.2.2.4 Aislamiento del género *Yersinia* y *Aeromonas* en agua

De la muestra de concentración bacteriana por la técnica del hisopo de Moore en medio de transporte AMIES, se tomó 1 ml para agregarlo a un matraz de 250ml con 100ml de caldo nutritivo, dejándose incubar a 35°C por 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación del matraz con 100ml de caldo nutritivo se tomó una alícuota que se sembró por estría directa en placas de agar Yersinia y agar Aeromonas incubándose a 35°C por 24 horas. Una vez pasado el periodo de incubación se

seleccionaron colonias pálidas con centro rojo carmesí de *Yersinia* y *Aeromonas* para realizarles prueba de tinción gram y correr el tren de bioquímicas, corroborándose por la prueba de API 20E.

7.2.3 Análisis de parámetros fisicoquímicos

7.2.3.1 Nutrientes

El análisis de los nutrientes se realizó a partir de las muestras de agua en bidones de dos litros. Se procesaron por el método de Colorimetría con un fotómetro marca: EcoSense, modelo: YSI 9500.



Figura 9. Técnica por colorimetría para nutrientes. Celdas con comprimidos para lectura de nutrientes.

Dada la alta concentración de nutrientes en las 3 muestras se realizaron diluciones ya que en las primeras pruebas el YSI 9500 no se pudo realizar la lectura con la celda, de acuerdo a cada nutriente se fue diluyendo la muestra con agua destilada hasta encontrar el nivel de detección del equipo.

Nitratos: Descripción de las diluciones para cada época del año y estadio de los ejemplares:

- Lluvias
 - Crías: 0.50ml muestra/19.50 ml agua destilada
 - Jóvenes: 0.50ml muestra/19.50 ml agua destilada
 - Adultos: 0.50ml muestra/19.50 ml agua destilada
- Secas
 - Crías: 0.50ml muestra/19.50 ml agua destilada
 - Jóvenes: 0.50 ml muestra/19.50 ml agua destilada
 - Adultos: 0.50ml muestra/19.50 ml agua destilada

A una celda de prueba, se le agregó 20ml de muestra hasta la marca, se le añadió una cucharada de polvo Nitratest (ceniza), se esperó un minuto para agregarle la tableta de YSI Nitratest, se agito hasta disolver y se dejó sedimentar el precipitado.

De la fase clara se transfiere a una celda, se le agregaron 10 ml de muestra hasta la marca, a esto se le añadió una tableta de YSI Nitricol y se trituro mezclándola hasta disolver, se esperaron 10 minutos hasta que presentara color rosa.

En el fotómetro se seleccionó el patrón de phot 63 y resultado mg/L de NO_3 (nitratos).

Amonio: El alto contenido de amonio no pudo determinarse directamente de la muestra, por lo que se hicieron las diluciones siguientes:

- Lluvias
 - Crías: 0.50 ml muestra/ 9.50 ml agua destilada
 - Jóvenes: 0.50 ml muestra/ 9.50 ml agua destilada
 - Adultos: 0.50 ml muestra/ 9.50 ml agua destilada
- Secas
 - Crías: 0.10ml muestra/ 9.90 agua destilada
 - Jóvenes: 0.50ml muestra/ 9.5ml agua destilada
 - Adultos: 0.10ml muestra/ 9.90 agua destilada

Los 10 ml de la muestra con su respectiva dilución se depositaron en una celda hasta la marca, se añadió una pastilla de YSI Amonia No.1, después otra pastilla de YSI Amonia No. 2, se trituraron y se dejaron reposar 10 minutos hasta que tomará un color verde o amarillo. En el fotómetro se seleccionó el patrón de medición phot 62 como resultado se obtuvieron mg/L de NH_4 (amonio).

Nitritos: Por la concentración tan alta de nitritos se hicieron las siguientes diluciones de las muestras:

- Lluvias
 - Crías: 0.50 ml muestra / 9.50 ml agua destilada
 - Jóvenes: 0.50 ml muestra / 9.50 ml agua destilada
 - Adultos: 0.50 ml muestra / 9.50 ml agua destilada
- Secas
 - Crías: 0.50 ml muestra/ 9.50 ml agua destilada

- Jóvenes: 0.50 ml muestra/ 9,50 ml agua destilada
- Adultos: 0.50 ml muestra/9.50 ml agua destilada

Tomando 10ml de las muestras diluidas se vaciaron en celdas, se les agregó una pastilla de YSI Nitricol se trituro y esperó 10 minutos hasta que tomara un color rosa. En el fotómetro se seleccionó el patrón de medición de phot 64 como resultado se leyeron mg/L de NO₂ (nitritos).

Fosfatos: Por concentraciones altas que no permitieron una lectura en YSI, se hicieron diluciones para poder leer los resultados

- Lluvias
 - Crías: 0.50 ml muestra / 9.50 ml agua destilada
 - Jóvenes: 0.50 ml / 9.50 ml agua destilada
 - Adultos: 0.50 ml / 9.50 ml agua destilada
- Secas
 - Crías: 0.50 ml muestra/ 9.50 ml agua destilada
 - Jóvenes: 0.50 ml muestra/ 9.50 ml agua destilada
 - Adultos: 0.50 ml muestra/ 9.50 ml agua destilada

Se tomaron 10ml de cada muestra diluida y se pasaron a celdas hasta la marca, se les agregó una pastilla de YSI Phosphate No.1 LR bajo rango y una pastilla de YSI Phosphate No. 2 LR bajo rango, se trituraron y se esperaron 10 minutos hasta tomar color azul. En el fotómetro, se seleccionó el patrón de medición de mg/L de PO₄ (fosfatos).

7.2.3.2 Demanda Bioquímica de Oxígeno

Es el método más tradicional que mide la cantidad de oxígeno que consumen los microorganismos al proliferar en el agua residual y degradar la materia orgánica esto es una medida indirecta de la materia orgánica en el sistema. Se utilizó el método como se describe en el manual de Evaluación de la calidad fisicoquímica y bacteriológica del agua y aguas de desecho de la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios Superiores Iztacala (Robles y cols., 2007).

En condiciones en las que se han inhibido los procesos fotosintéticos de producción de oxígeno en condiciones que favorecen su desarrollo, siendo que oxidan la materia orgánica de una muestra de agua en un periodo de 5 días a $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Es la cantidad de oxígeno que requieren los microorganismos para oxidar (estabilizar) la materia orgánica biodegradable en condiciones aerobias. En condiciones normales de laboratorio, esta demanda se cuantifica a 20°C , el ensayo estándar se realiza a cinco días de incubación y se conoce convencionalmente como DBO_5 , con valores numéricos expresados en mg/L de O_2 .



Figura 10. Preparación de muestras para Demanda Bioquímica de Oxígeno. Muestras triplicadas.

Para el análisis del DBO, se neutralizó el pH de las muestras, se colocó un volumen de muestra en los frascos winkler, de acuerdo a las muestras de agua de cada estadio dependiendo los mililitros para cada dilución, se llenó cada frasco con agua de dilución sin generar burbujas, se taparon sin inducir aire, se sellaron con agua destilada. Se hicieron tres repeticiones con dos diluciones porque una se dejó incubándose por cinco días a 20°C en la oscuridad.

A las primeras diluciones se les adicionó un mililitro de Sulfato manganoso, un mililitro de Álcali-Ioduro-Azida, se tapó y agitó, se dejó sedimentar el precipitado (color marrón), posteriormente se agregó un mililitro de Ácido Sulfúrico concentrado, se tapó y agito. Se tomó una alícuota por cada dilución de 100ml para titular con Tiosulfato de Sodio (0.025N), hasta un color amarillo paja, se le agregaron unas gotas de Almidón tornándose de color azul, se siguió titulando con el Tiosulfato de Sodio hasta el vire de azul a incoloro. Se anotó el volumen utilizado de tiosulfato para los respectivos cálculos.

Después de cinco días, se fijó el Oxígeno Disuelto y se calcularon los mg/L como en el procedimiento anterior.

7.2.3.3 Demanda Química de Oxígeno

Es el resultado de la concentración de la masa de oxígeno equivalente a la cantidad de Dicromato consumida por la materia disuelta y suspendida cuando una muestra de agua se trata con el oxidante bajo condiciones definidas. Es la medida del total de la materia oxidable en el sistema.

El análisis se realizó con base en el manual de Evaluación de la calidad fisicoquímica y bacteriológica del agua y aguas de desecho de la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala (Robles y col, 2007).



Figura 11. Reacción de la prueba Demanda Química de Oxígeno. Celdas procesadas con el digestor.

Se tomó un vial con reactivo integrado (solución digestiva para DQO: ácido crómico, sulfato de mercurio, sulfato de plata y ácido sulfúrico) para una gama entre 3-150 mg/L, utilizando el digestor marca: HACH Be Righth", con el principio de la degradación de la materia orgánica y cierto iones inorgánicos oxidables se utilizó una solución estándar de Bicromato de Potasio en presencia de Ácido Sulfúrico, usando como catalizador Sulfato de Plata para las sales iónicas.

Se presentó un precipitado con la sal de plata, se colocó el tubo con la solución digestiva con cinco ml de muestra, se realizó el análisis por triplicado por cada muestra con un blanco, en un bloque termostático marca: HACH be Righth", modelo: LT200-2, para las digestiones; se programó la digestión por dos horas a 150°C, se dejó enfriar y una vez terminada la digestión se añadió de dos a tres gotas de indicador ferroín, se procedió a la titulación con solución patrón de Sulfato Ferroso Amoniacal (0.25N), hasta el vire de azul-verde a un café-rojizo. Se anotó el volumen gastado para los cálculos.

Los parámetros de campo que se midieron fueron, temperatura, pH y conductividad, se utilizó un potenciómetro y un oxímetro.

7.2.4 Análisis Estadístico.

7.2.4.1 ANOVA

Para determinar si los resultados son homogéneos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia $p < 0.05$.

Se realizó con el paquete estadístico Sigmaplot para Windows, Versión 11.0 Build 11.0.0.77, 2008.

7.2.4.2 Prueba de Tuckey

Con las diferencias significativas de los resultados obtenidos, se aplicó la prueba estadística de Tuckey. Esta comprende calcular una única diferencia crítica para realizar todas las comparaciones entre las medias; el valor depende del número de comparaciones que se realicen (Blanco, 2011). Se realizó con el paquete estadístico Sigmaplot para Windows, Versión 11.0 Build 11.0.0.77, 2008.

8. Resultados

8.1 Resultados bacteriológicos en *Crocodylus moreletii* en sus tres estadios y el agua de su hábitat en temporada de lluvias y secas.

Tabla 1. Especies bacterianas en crías (exudado bucal y cloacal) y en el medio donde habitan (agua)

	Lluvias	Secas
Neonatos	Boca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Boca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahemolyticus</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Proteus mirabilis</i>
	Cloaca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Cloaca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahemolyticus</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Proteus mirabilis</i>
Agua	<i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>

Tabla 2. Especies bacterianas en jóvenes (exudado bucal y cloacal) y en el medio donde habitan (agua)

	Lluvias	Secas
Jóvenes	Boca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Boca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahemolyticus</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
	Cloaca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Klebsiella oxtcoca</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Cloaca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahemolyticus</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus mirabilis</i>
Agua	<i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholera</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Citrobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholera</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Critrobacter freundii</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>

Tabla 3. Especies bacterianas en adultos (exudado bucal y cloacal) y en el medio donde habitan (agua)

	Lluvias	Secas
Adultos	Boca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibriio cholerae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	Boca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahemolitycus</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
	Cloaca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	Cloaca <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahemolitycus</i> <i>Salmonella tphimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Yersinia entorocolitica</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus mirabilis</i>
Agua	<i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en neonatos de *C. moreletii* y el medio donde habitan (agua), observándose la presencia dominada por *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* y *Proteus mirabilis* tanto en la temporada de lluvias como en la temporada de secas, apareciendo en ambas cavidades (bucal y cloacal), así como en el medio donde habitan. Sin embargo existe una diferencia muy marcada en el número de especies presentes en la temporada de secas, por ejemplo se observa la presencia de *Vibrio parahemolyticus*, *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica* en la boca de las neonatos a diferencia de la época de lluvias; en cloaca también se observa un diferencia en el número de especies en temporada de secas como *Salmonella typhimurium*, *S. flexneri*, *Enterococcus faecalis*; y en el agua se releja el mismo caso para la temporada de secas con un aumento de especies por mencionar algunas a *S. typhimurium*, *S. flexneri* y *A. hydrophila*.

En la tabla 2 se observan los resultados obtenidos en organismos jóvenes de *Crocodylus moreletii* y el medio donde habitan (agua). Señalando mayor número de especies en temporada de secas y teniendo como especies más abundantes en ambas cavidades (bucal y cloacal) y el agua en las dos temporadas (lluvias y secas) a *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*. Pero se observa una diferencia en el número de especies presentes en la temporada de secas tanto en la cavidad bucal, cloacal y el medio donde habitan (agua) con la presencia de *Vibrio parahemolyticus*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica*.

En la tabla 3, se reportan los resultados obtenidos en adultos de *C. moreletii* y el medio donde habita (agua). Se observa la dominancia de *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella toxycara*, tanto en la temporada de lluvias y secas; dentro de ambas cavidades (bucal y cloacal), así como el medio donde habitan Pero existe una diferencia marcada en el número de especies presentes en la temporada de secas, como por ejemplo s *Vibrio parahemolyticus*, *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica* en las dos cavidades de los adultos. Para ambas cavidades se obtuvo mayor descripción de especies dentro de la temporada de secas; teniendo por ejemplo a las especies de *Vibrio parahemolyticus*, *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica*

8.2 Análisis de Varianza por dos vías de las bacterias.

Tabla 4. ANOVA. Análisis de varianza por dos vías de las bacterias presentes en la cloaca de los cocodrilos en los tres estadios (Neonatos, Jóvenes y Adultos) por temporada (secas y lluvias).

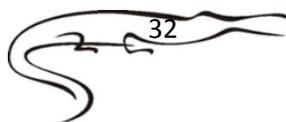
Análisis de Varianza por dos vías					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Probabilidad
Estadio	1	4.50	4.50	3.11	0.103
Temporada	2	8.11	4.05	2.80	0.100
Especies	2	1.00	0.50	0.34	0.714
Residual	12	17.33	1.44		
Total	17	30.94	1.82		

Tabla 5. ANOVA. Análisis de varianza por dos vías de las bacterias presentes en la boca de los cocodrilos en los tres estadios, por temporada.

Análisis de Varianza por dos vías					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Probabilidad
Estadio	1	18.00	18.00	21.60	0.001
Temporada	2	8.11	9.05	10.86	0.002
Especies	2	0.33	0.16	0.20	0.821
Residual	12	10.0	0.83		
Total	17	46.44	2.73		

Tabla 6. ANOVA. Análisis de varianza por dos vías de las bacterias presentes en el agua de los cocodrilos por temporadas.

Análisis de Varianza por dos vías					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Probabilidad
Temporada	1	16.66	16.66	100.00	0.010
Especies	2	2.33	1.167	7.00	0.125
Residual	2	0.33	0.167		
Total	5	19.33	3.867		



En el análisis de varianza por dos vías (Tabla 4), para los estadios (Neonatos, Jóvenes y Adultos) los valores de las medias excluyen la posibilidad de diferencia de probabilidad ($P=0.103$) ya que no entra dentro del intervalo de confianza del 95%, pues el valor es mayor a 0.05. Esto quiere decir que no hay una diferencia estadísticamente significativa. Por temporadas ($P=0.100$) y especies ($P=0.714$) tampoco se encontró una diferencia significativa, no hay una interacción estadísticamente significativa entre ellos.

La diferencia en los valores de las medias entre los estadios indica una diferencia significativa de probabilidad ($P=0.001$) entrando al intervalo de confianza, debido a los efectos de las diferencias que se encuentran dentro de las temporadas con diferencia de probabilidad de ($P=0.002$), aunque no haya interacción estadísticamente significativa entre ambos resultados (Tabla 5).

Los resultados obtenidos por el análisis de varianza por dos vías (Tabla 6) para el agua de los cocodrilos, tuvo diferencia significativa por los valores de probabilidad ($P= 0.010$) entre las temporadas (lluvias y secas) pues está dentro del intervalo de confianza del 95%, mientras que entre las especies se excluye la posibilidad de diferencia de probabilidad ($P= 0.125$) puesto que el valor es mayor a 0.05.

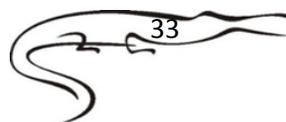


Tabla 7. Coliformes Totales en el medio donde habita *Crocodylus moreletii*. Descripción del Número más Probable (NMP) por 100 ml, en cada muestra tomada de cada estadio de *Crocodylus moreletii*, correspondiente **Ac**: Agua de los neonatos, **Aj**: Agua de los jóvenes, **Aa**: Agua de los adultos, respecto a las temporadas lluvias y secas.

Los valores del NMP se calcularon con la sig. fórmula:

$$\text{NMP/100mL} = \text{NMP}^* \times 10 / \text{valor mayor probado}$$

Temporada	Lluvias			Secas		
Zona	Ac	Aj	Aa	Ac	Aj	Aa
NMP/100 mL	6×10^7	1.5×10^7	7×10^7	240×10^8	2×10^7	34×10^7

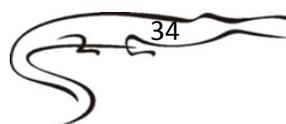
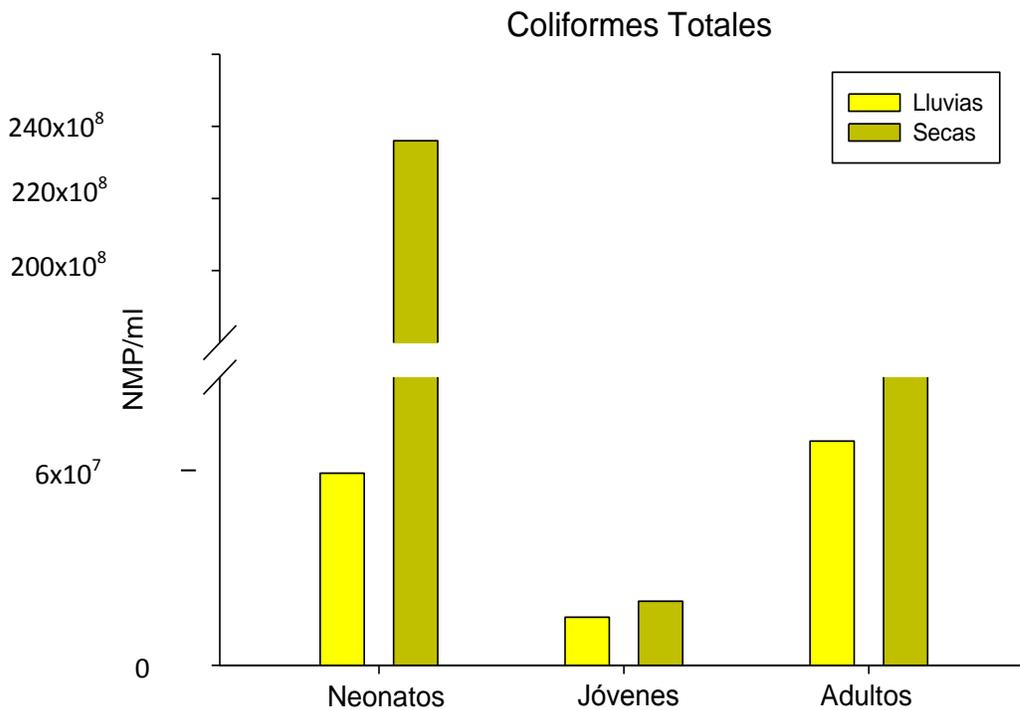


Gráfico 1. Coliformes totales. Datos de la temporada de lluvias y secas representando el número más probable (NMP) por 100 ml, para el agua habitada por crías, jóvenes y adultos por *Crocodylus moreletii*.

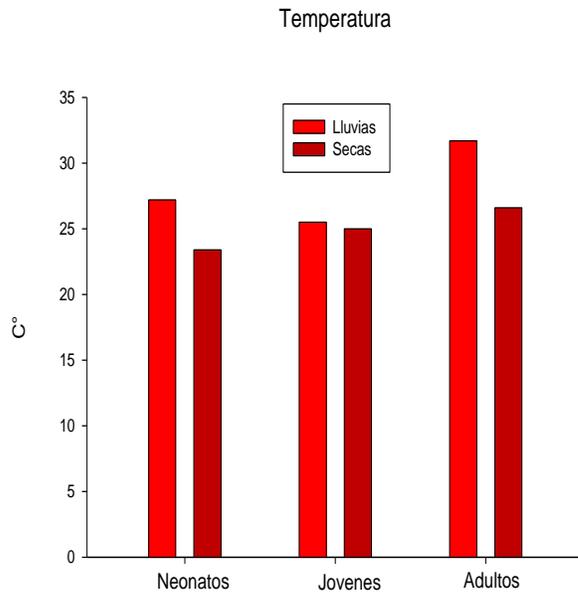


Gráfico 2. Registro de temperatura en el agua habitada por *Crocodylus moreletii* en los estadios de neonatos, jóvenes y adultos en dos temporadas

Gráfico 3. Registro de conductividad en el agua donde se encuentra *Crocodylus moreletii* en sus estadios de neonatos, jóvenes y adultos en temporada de lluvias y secas

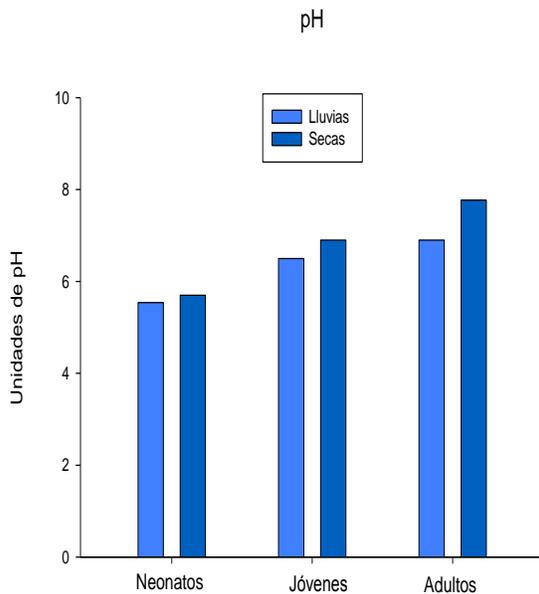
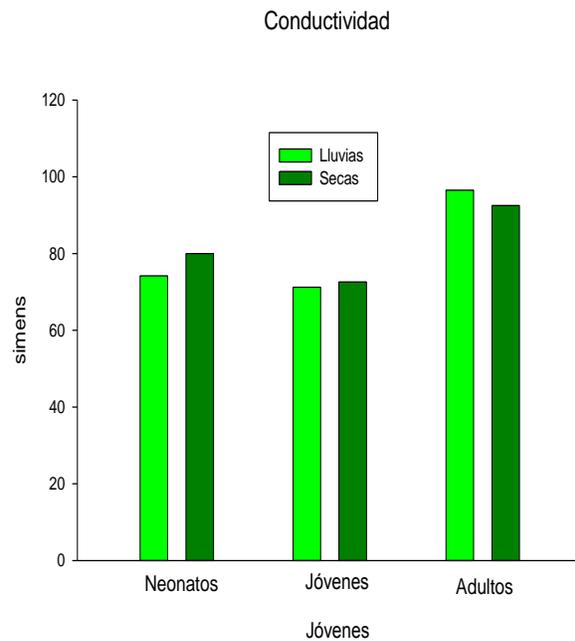


Gráfico 4. Potencial de hidrógeno. Registro de pH en el agua donde se encuentra *Crocodylus moreletii* en los estadios de neonatos, jóvenes y adultos en dos temporadas

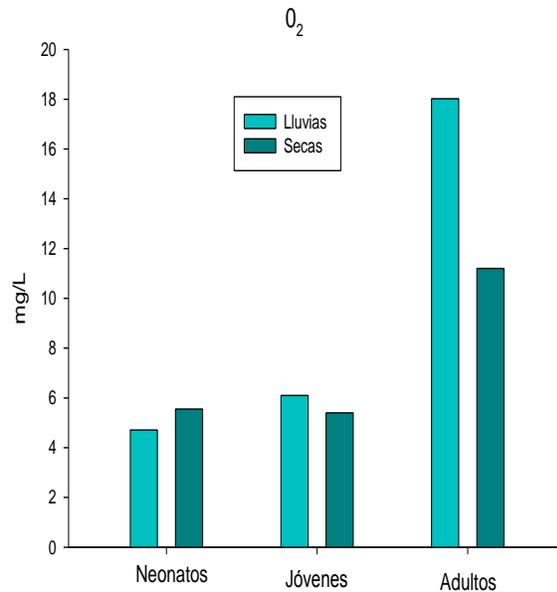
En la tabla 7 y gráfica 1 se muestra el registro de los datos del NMP de coliformes totales por 100 ml de agua. En temporada de lluvias se obtuvieron valores menores con promedio de 4.8×10^7 NMP/100 ml, en los tres estadios, mientras que en temporada de secas los valores aumentaron con promedio de 92×10^7 NMP/100 ml. En el estadio de crías se aprecia una alta diferencia en temporada de secas teniendo como valor máximo 240×10^8 NMP/100 ml. En el estadio de jóvenes se obtuvieron los menores resultados en ambas temporadas con valores de 1.5×10^7 NMP/100 ml para lluvias y 2×10^7 NMP/100 ml para secas. Por último los valores en el estadio de adultos tuvieron valores de 7×10^7 NMP/100 ml en lluvias y 34×10^7 NMP/100 ml en secas.

En la gráfica 2, las temperaturas mayores registradas fueron en lluvias, con un registro mínimo en el agua habitada por los jóvenes con 25.0°C , seguido por el agua en donde se encontraron los neonatos con 27.2°C y como registro de temperatura máxima en adultos con 31.7°C . Mientras que en temporada de secas se registraron temperaturas menores, la temperatura mayor fue de nuevo registrada para el agua habitada por los adultos con 29.0°C y el mínimo registro de temperatura fue para el agua con los neonatos con 23.4°C .

La conductividad tuvo un registro relacionado con las temperaturas registradas. Teniendo como valor máximo en la temporada de lluvias en el agua donde habitaban los organismos adultos con $96.5 \mu\text{Sims}$, seguido por el agua de las crías con $80 \mu\text{Sims}$ y el más bajo en el agua de los jóvenes con $71.2 \mu\text{Sims}$. En la temporada de secas el registro máximo registrado fue en el agua de los adultos con $92.5 \mu\text{Sims}$, después el agua habitada por las crías con $74.2 \mu\text{Sims}$ y el más bajo con $72.6 \mu\text{Sims}$ en los organismos jóvenes.

El pH registrado tuvo un mayor valor en la temporada de secas con un registro máximo en el agua habitada por los adultos con 7.77 unidades de pH, siguiendo el agua habitada por los jóvenes con 6.9 unidades de pH y un 5.7 unidades de pH para el agua con los organismos en estadio de neonatos. Para la temporada de lluvias de registraron menores unidades de pH para cada estadio, en el agua con los adultos se tuvo un registro de 6.9 unidades de pH, para el agua con los organismos jóvenes se obtuvo 6.5 unidades de pH y para el agua de las neonatos se registraron las unidades de pH menores con 5.54.

Gráfico 5. Registro de **oxígeno disuelto** en el agua habitada por *Crocodylus moreletii* en los estadios de neonatos, jóvenes y adultos en dos temporadas



DBO

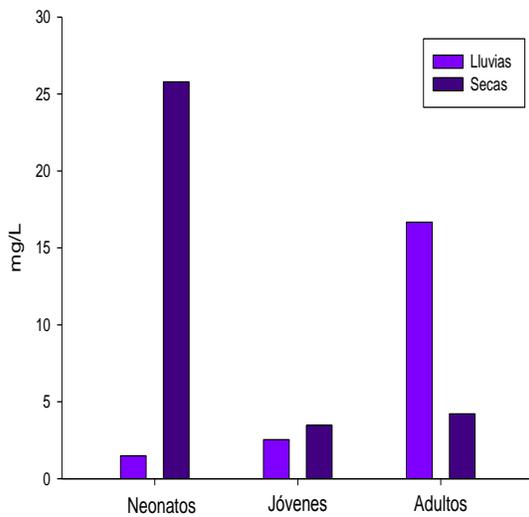
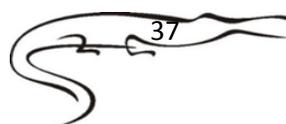
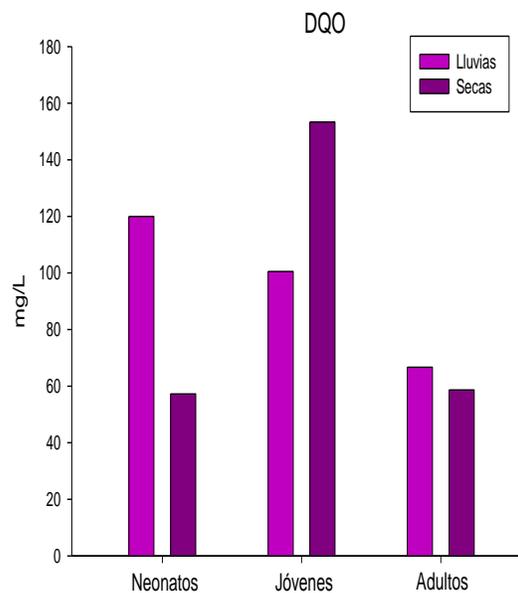


Gráfico 6. **DBO mg/L** en el agua donde se encuentra *Crocodylus moreletii* en los estadios de neonatos, jóvenes y adultos en dos temporadas

Gráfico 7. **DQO mg/L** en el agua habitada por *Crocodylus moreletii* en los estadios de neonatos, jóvenes, adultos en temporadas de lluvias y secas



El oxígeno disuelto tuvo mayor registro para el agua donde se encontraron a los organismos adultos en ambas temporadas, con 18.02 mg/L para lluvias y 11.2 mg/L para secas. Para el agua con los organismos jóvenes se tuvo un registro en temporada de lluvias de 6.1 mg/L y para temporada de secas de 5.40 mg/L. Mientras que en el agua habitada por las crías, se tuvo un registro de 4.71 mg/L para temporada de lluvias y 5.55 mg/L para temporada de secas.

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) tuvo un registro máximo en temporada de secas en el agua habitada por los organismos con estadio de neonatos con un valor de 25.7876 mg/L y se obtuvo un mínimo registro en temporada de lluvias en el agua habitada por las crías con 1.4870 mg/L. Para el agua de los organismos jóvenes se obtuvieron valores similares entre ellos con 2.5360 mg/L en temporada de lluvias y 3.4637 mg/L para la temporada de secas. Mientras que para el agua habitada con adultos el máximo valor registrado fue en temporada de lluvias con 16.6678 mg/L y en temporada de secas fue de 4.2139 mg/L.

En la demanda química de oxígeno (DQO) se obtuvo un registro mayor en el agua habitada por los organismos jóvenes con 153.3333 mg/L en temporada de secas, mientras que en temporada de lluvias tuvo 100.5 mg/L. Para el agua con los organismos en estadio de neonatos se obtuvo el mayor valor en temporada de lluvias con 120 mg/L y en temporada de secas 57.23 mg/L y para el agua con los adultos se obtuvo en temporada de lluvias 66.6667 mg/L y 58.6667 mg/L para la temporada de secas.

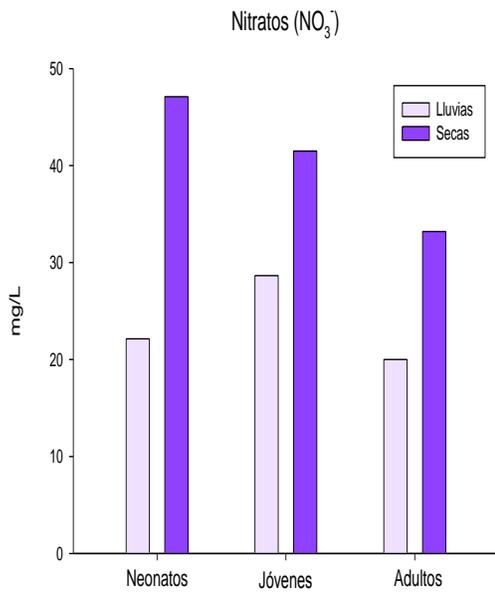
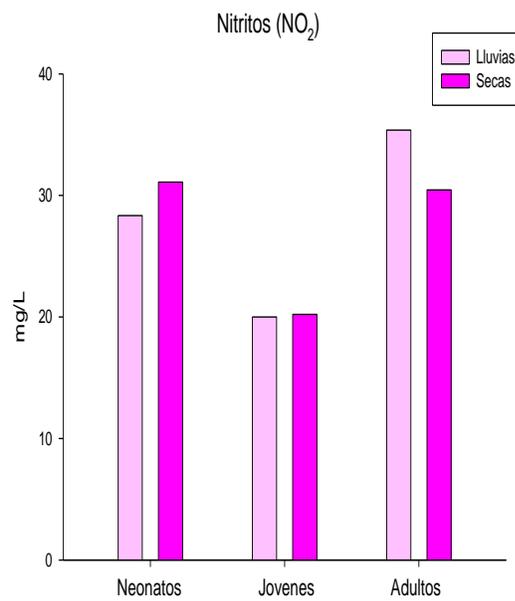


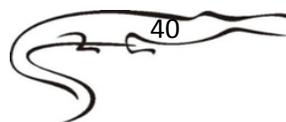
Gráfico 8. Registro de Nitratos para las temporadas de lluvias y secas en el agua habitada por *Crocodylus moreletii* en los estadios de neonatos, jóvenes y adultos

Gráfico 9. Registro de Nitritos para las temporadas de lluvias y secas en el agua habitada por *Crocodylus moreletii* en tres estadios



El nitrato registrado en temporada de lluvias tuvo un valor máximo para el agua de los organismos jóvenes con 28.65 mg/L, seguido con 22.1400 mg/L para el agua con los organismos en estadio de neonatos y para el agua habitada por los adultos se obtuvo 22.1400 mg/L. Para la temporada de secas el valor máximo fue registrado para el agua habitada por las crías con un valor de 47.10 mg/L y el valor mínimo fue de 33.20 mg/L para el agua con organismos adultos.

El nitrito registrado en temporada de lluvias tuvo un valor mayor en el agua de los organismos adultos con 35.3780 mg/L, 28.3450 mg/L para el agua con organismos neonatos y el mínimo registro fue de 20 mg/L para el agua con los organismos jóvenes.



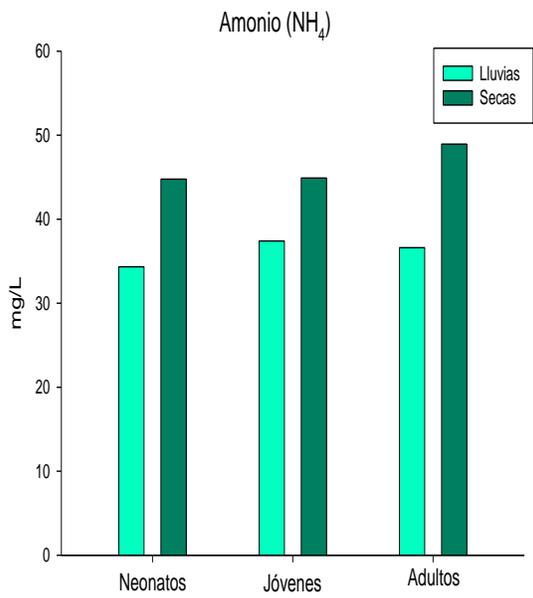
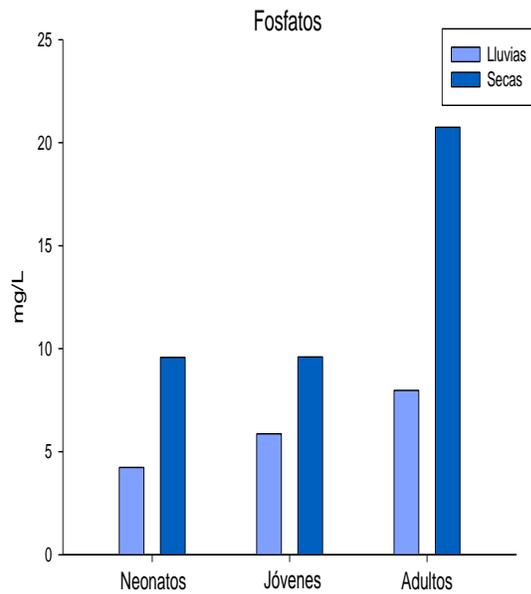


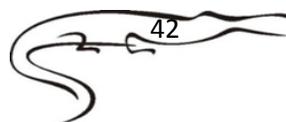
Gráfico 10. Registro de Amonio del agua habitada por *Crocodylus moreletii* en tres estadios por dos temporadas

Gráfico 11. Registro de fosfatos para el agua en las temporadas de lluvias y secas en el agua habitada por *Crocodylus moreletii* en tres estadios



El amonio para la temporada de lluvias tuvo los valores mínimos, en el agua habitada por los organismos neonatos se obtuvo un valor de 34.33 mg/L, para el agua con los organismos jóvenes fue de 37.40 mg/L y para el agua habitada con los organismos adultos se obtuvo un valor de 36.6 mg/L. Mientras que para la temporada de secas los valores fueron más elevados, para el agua de las crías fue de 44.76 mg/L, para el agua con los jóvenes fue de 44.8960 mg/L y para el agua con los adultos fue de 48.94 mg/L.

El fosfato en temporada de secas tuvo un valor máximo en el agua habitada por los organismos crías con un valor de 20.74 mg/L, el valor mínimo fue de 9.57 mg/L para el agua de las crías y para el agua con los organismos jóvenes se obtuvo un valor de 9.6 mg/L. Para la temporada de lluvias el valor máximo fue de 7.98 mg/L en el agua habitada por los organismos adultos, el valor mínimo fue de 4.2340 mg/L para el agua de los organismos cría y para el agua con los organismos en estadio de jóvenes se obtuvo un valor de 5.87 mg/L.



9. Discusión

Hutton y Webb en 1990 estudiaron la introducción y crianza de cocodrilianos, ellos observaron que los cocodrilos están expuestos a desordenes clínicos, y determinaron que los brotes de enfermedades pueden causar un índice de mortalidad alto, un pobre crecimiento, o una reducción en la calidad de la carne y piel ocasionando un impacto económico por el descenso de organismos en cautiverio. Lo antes mencionado fue observado en este trabajo, desarrollado en el cocodrilario de Tecomán con *Crocodylus moreletii*. Así mismo Hutton y Webb en el mismo estudio mencionan que la mayoría de los cocodrilos portan bacterias que posiblemente puedan ser patógenos como *Aeromonas* y *Edwardsiella*, las cuales son patógenos potenciales que pueden llegar a causar una septicemia.

Algunos de los síntomas del contagio por bacterias son la falta de apetito, pérdida de peso, disminución significativa en la capacidad motriz o parálisis completa, ojos parcial o completamente cerrados, lengua agrietada y deshidratada, diarrea evidente y heces con sangre. Rubio-Delgado y cols. en el 2000 mencionan que a pesar de que los cocodrilos son animales poco susceptibles a enfermedades, el hecho de no tener las medidas necesarias como una adecuada temperatura, alimentación y limpieza causa problemas patológicos. Por eso es que en el presente trabajo realizado con *C. moreletii* se observa una relevancia en la correlación con la calidad del agua presente en la laguna con las bacterias que portan los organismos de *C. moreletii*. Son pocos los estudios realizados sobre la microbiota de los cocodrilos, se tiene registro de 5 especies estudiadas en condiciones silvestres: *Alligator mississippiensis* (Flandry et al., 1989; Johnston et al., 2010), *Crocodylus acutus* (Cupul-Magaña, 2005), *C. niloticus* (Lovely y Leslie, 2008), *C. porosus* (Anderson 1999) y *C. johnstoni* (Anderson 1999).

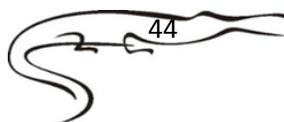
Diferentes estudios muestran la existencia de diversidad de bacterias en la cavidad oral de cocodrilos silvestres y en cautiverio (Doering y col., 1971; Gorden y col., 1979; Flandry y col., 1989; Matushima y Ramos 1995; Anderson 1999, Cupul-Magaña y col., 2005; Silva y col., 2009). En nuestros resultados encontramos una diversidad de bacterias en los tres estadios (neonatos, jóvenes y adultos) donde se analizó en la región oral y cloacal. Durante la temporada de lluvias las bacterias dominantes fueron *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, mientras que en la temporada de secas el registro para los tres estadios en sus dos cavidades fueron las

bacterias, *E. coli*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *P. mirabilis* y *Enterococcus cloacae*.

Nuestros resultados coinciden con lo encontrado en otros estudios como el de Charruau y cols. en 2012, realizado en un cuerpo de agua en Quintana Roo con el análisis de la microbiota en la cavidad oral y cloacal de *Crocodylus acutus* y *C. moreletii*, en el cual los resultados que ellos describen en las dos cavidades fueron: *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella arizonae*, *S. typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, y *Y. enterocolitica* en diferentes estadios (Neonatos, Jóvenes, Subadultos y Adultos). Por otro lado Eraz y cols. (2016) realizaron un estudio en la especie *Caiman crocodilus*, analizando las enterobacterias y la resistencia antimicrobiana, en el que reportan las siguientes bacterias: *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* spp, *P. mirabilis* y *Shigella sonnei*.

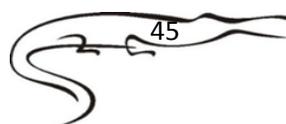
Existen trabajos con otros cocodrilianos, como el realizado con *Alligator mississippiensis*, donde se reporta que es normal encontrar a *Aeromonas hydrophila* en sus hábitats naturales, aparentemente no causa enfermedades a los organismos, en lo reportado por Gorden y cols. en 1979, sin embargo Huchzermeyer en 2003 demostró que podrían volverse patógenos cuando el huésped está sometido a estrés particularmente en condiciones de cautiverio. Novak y Seigel en 1986, indican también el caso de las bacterias dentro de la familia Enterobacteriaceae pues definieron casos de sepsis en *A. mississippiensis*, causados por las especies de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus* sp, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella oxytoca*, aunque estas especies hayan causado patologías en *A. mississippiensis*, en *C. moreletii* no se presentó algún organismo que a simple vista tuviera síntoma de enfermedad, tal vez debido a que no se encontraban en estrés ya que las condiciones eran similares a las condiciones naturales en las que se encuentra la especie. Se sabe que pueden tener una microbiota natural sin asociaciones a enfermedades como *E. coli* y *K. pneumoniae* en la cavidad oral y *E. coli*, *E. aerogenes* y *Shigella* sp en la cavidad cloacal como lo señala Silva y cols. en 2009, pero como se mencionó previamente por Gorden y col. en 1979 diferentes factores pueden influir en el desempeño del sistema inmune por un manejo excesivo y temperaturas elevadas que favorezcan la rápida proliferación de bacterias.

Cabe destacar que no se tuvo registro de *Pseudomona aeruginosa*, puesto que en el trabajo realizado en 1996 Hernández-Hurtado y Cupul, se señaló que la presencia de esta bacteria causó en *C. acutus* una ampulla sobre la lengua que le impedía la ingesta de



alimento y un par de días después el animal falleció. Aunque Ebani y cols. en el 2005 indican que los reptiles pueden ser portadores de diversos patógenos, así mismo Pachon (2009) refiere que son portadores asintomáticos de enterobacterias. Por otro lado Miller y Pegues (2000) así como Barrera-Escorcia y cols. (2013) sugieren que *Salmonella* y *Shigella* se consideran bacterias causantes de enfermedades digestivas severas, como salmonelosis, anemia, diarrea, enteritis y septicemia, a pesar de eso no se observaron cocodrilos enfermos en ninguno de sus estadios, aunque se haya encontrado presencia de estas dos bacterias en ambas cavidades. Esto es similar a los resultados que obtuvo Van der Walt y col. en 1997, ya que observaron que *Crocodylus niloticus* puede albergar una amplia variedad de serovariedades de subespecies de *Salmonella* y no estrictamente deben de ser considerados como cocodrilos enfermos.

Entre las bacterias reportadas dentro de este estudio es notorio el alto nivel de aislamiento de enterobacterias que puede sugerir contaminación fecal del agua de los recintos como lo alude Silva y col. (2009), por esto es que se realizó la determinación de coliformes totales con el método del Número Más Probable (NMP), de acuerdo a los límites permisibles dentro de los criterios ecológicos de 1989, los valores obtenidos con mayor representación (Tabla 1; Gráfico 1), se encuentran dentro de la temporada de secas, en la muestra de los neonatos con un valor de ≥ 240 NMP/100 mL; y en la muestra del agua de los adultos con un valor de 34 NMP/100 mL, aunque McFetres y Stuart en 1972, mencionan que las coliformes totales no suelen sobrevivir en el medio acuático por el estrés a las que son sometidas y a su vez la mortalidad depende de poblaciones con otras bacterias, efectos de la luz solar y temperatura del agua, se sabe que por encima de los 15°C se vuelve menos importante en la sobrevivencia, los datos que se obtuvieron de la temperatura en lluvias registraron mayores grados: neonatos 27.2°C, jóvenes 25.0°C, adultos 31.7°C sin embargo los datos de las coliformes totales a estos grados no fueron elevados: neonatos 6NMP, jóvenes 1.5NMP, adultos 7 NMP, no obstante Barrera-Escorcia y col. en 1999 menciona que al inicio de la estación de lluvias, pueden encontrarse altas concentraciones de bacterias, manteniendo esas altas concentraciones toda la temporada de lluvias, debido a la concentración que se acumula en temporada de secas. Es así que obtuvimos en la temporada de secas registros de temperaturas más bajas en los estanques de los adultos (29°C) y una temperatura de 23.5°C en el agua de los neonatos con un incremento de organismos por cada 100ml, debido a la presencia elevada de coliformes totales, ya que Arcos y col. (2005) discuten que este fenómeno se debe a la existencia de heces de animales homeotermos, teniendo

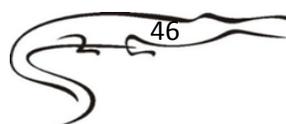


como referencia el modo que se ofrece el alimento a los cocodrilos ocasionando una influencia en la presencia de estas enterobacterias. Como factor importante a mencionar es que la diferencia entre cada muestra se debe a las condiciones en las que se encontraban los estanques, los organismos jóvenes estaban individuales, mientras que los adultos y los neonatos se encontraban por grupo.

De las tres muestras de agua, las bacterias obtenidas para ambas temporadas fueron *E. coli*, *V. cholerae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *E. aerogenes*, similares a las que se reportaron en el estudio de Botero y col. en 2002 dentro de las lagunas de estabilización donde se encontraron siete géneros bacterianos: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Leclercia*, *Proteus* y *Enterobacter*, que presentan un riesgo clínico por causar infecciones oportunistas.

Para la temporada de secas se vio un incremento en las especies aisladas teniendo bacterias como *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis*, *S. flexneri*, *S. typhimurium* y *A. hydrophila*. Algunas de las bacterias reportadas según Arcos y col. en 2005, se encuentran en presencia de contaminación fecal como *E. coli* sin embargo Apella y Araujo en 2005, sugieren que otros patógenos dentro de las enterobacterias son: *Shigella*, *Salmonella* y *Klebsiella*. Carriquiriborde en 2010, indica que son causantes de gastroenteritis en humanos o bien causar salmonelosis en reptiles, mientras que Audisio y col. en 2005 señala que el grupo *Vibrio* se encuentra en aguas marinas o dulces y la especie más representativa es *V. cholerae*, la transmisión es casi exclusivamente por vía hídrica, por otra parte Ávila y col. en 2014, mencionan que algunas son habitantes normales de fuentes de agua como el género *Aeromonas*.

Las concentraciones y presencia de bacterias en el agua no se vio afectado por la temperatura, pues la elevación de temperatura no indicó aumento en el registro de más especies en ninguna de las dos temporadas, aunque en el trabajo de Escobedo y col. en 1999 hubo influencia debido a que se obtuvieron valores máximos cuando había menos estrés térmico. Rodríguez en 2009, afirma que la conductividad por su capacidad de conducir electricidad por iones se ve relacionada con las temperaturas, la viscosidad disminuye y el transporte iónico aumenta, es por esto que mientras va aumentando la temperatura, los valores de la conductividad sean mayores, reportando el valor máximo de 96.5 μ Sims dentro de la temporada de secas en el agua habitada por organismos adultos, donde se registró el valor más alto en temperatura. El valor más bajo de

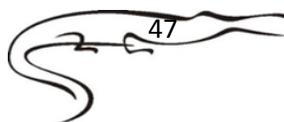


conductividad fue en el agua de los organismos jóvenes con 71.2 μ Sims pero este valor no se presentó a la par con el valor más bajo de temperatura.

Rodríguez (2009), dice que el registro de pH en las aguas puede variar entre 4.5 y 8.5. Según los criterios ecológicos del agua CE-CCA-001/89 el pH no podrá tener variaciones mayores a 0.2 unidades de pH, tomando como base el valor natural estacional, siendo el primer estudio que se hace sobre el agua de la laguna y encierros de la UMA. No existe punto de referencia para evaluar un criterio mínimo o máximo permisible, pero con datos obtenidos de diferentes estudios sobre lagunas y lagos se estimó que los resultados obtenidos estuvieron dentro del rango normal de registros, teniendo como valores más altos en temporada de lluvias con 7.77 unidades de pH dentro del agua habitada por adultos y el valor mínimo registrado en temporada de secas con 5.54 en al agua de las crías. Estos valores a su vez Gómez-Alvares y cols. en el 2004 hacen mención que se ve reflejados por la conductividad, debido a la elevada actividad de los iones hidrógeno (Valor bajo de pH).

Bajos niveles de oxígeno disuelto podrían considerarse como un indicador de contaminación por materia orgánica, las concentraciones bajas pueden localizarse donde la materia orgánica se encuentra en descomposición. El porcentaje de este parámetro por debajo del 40% daña a la mayor parte de los organismos (Benavides y col. en 2007), los resultados obtenidos son mayores que ese porcentaje teniendo el valor mayor en temporada de lluvias dentro del agua de los cocodrilos adultos con 240% de OD y el porcentaje menor se presentó en el agua de los neonatos con 64.53% de OD, a pesar de que al aumentar la temperatura la cantidad de oxígeno disuelto disminuye, en las muestra de agua de los organismos adultos se observó lo contrario presentando mayor cantidad de OD (18.02 mg/L - lluvias y 11.2 mg/L – secas) a mayor temperatura, según Velázquez y cols. (2016) varios factores se involucran al determinar esta concentración pues el principal factor de consumo de oxígeno libre es la oxidación de la materia orgánica por respiración a causa de microorganismos descomponedores.

Por otra parte la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) mide la cantidad de oxígeno que necesitan los microorganismos para descomponer la materia orgánica en el agua, Sardiñas y cols. (2016) en el trabajo evaluación físico-química y microbiológica del agua de la presa El Cacao, Cuba, señala que los niveles por encima de 100 mg/L está muy contaminado y sugiere la presencia de mucha materia orgánica, los resultados obtenidos en este análisis no rebasan los 100 mg/L, el valor más alto está registrado para temporada

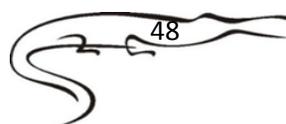


de secas en el agua donde se encuentran los neonatos con 25.78 ml/L y el valor más bajo fue de 2.5 ml/L en el agua de los organismos jóvenes en temporada de lluvias. CIECE, 2006 remarca que para niveles elevados de DBO corresponden concentraciones de oxígeno disuelto bajas, debido a que el oxígeno disuelto disponible en el agua es consumido por las bacterias, los datos de ambos análisis tienen concordancia con los mencionado anteriormente a excepción en los datos del agua de los cocodrilos adultos.

En cuanto a la demanda química de oxígeno (DQO) Sawyer y col. en 2011 apuntan que es considerada como la cantidad de oxígeno consumida para oxidar completamente la materia orgánica por medio de agentes químicos y suele relacionarse con la DBO/DQO (4.0/0.8), el máximo resultado obtenido para la DQO se presentó en temporada de secas en el agua habitada por organismos jóvenes con 153 mg/L, el valor menor también se registró durante la misma temporada en el agua de los neonatos con valor de 57.23 mg/L, éstos valores representan un alto contenido de materia orgánica los resultados dentro de la investigación de Hidalgo y cols. en 2003 quienes reportan una DBO <30mg/L consideran que el agua es de buena calidad.

Las formas iónicas (reactivas) de nitrógeno inorgánico más comunes en los ecosistemas acuáticos son el amonio (NH_4^+), el nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-). Camargo y Alonso en 2007 mencionan que la presencia y reacción de éstos forman contaminantes reduciendo la alcalinidad o bien reduciendo el valor de pH del agua. También suelen estar muy relacionados con la materia orgánica como lo reporta Díaz-Vargas y col. en 2005. El valor máximo de nitratos (NO_2) se obtuvo dentro de la temporada de secas con 47.10 mg/L y el registro mínimo fue de 22.14 mg/L en temporada de lluvias (Gráfico 8), saliendo de los límites permisibles mayores a 0.04 mg/L- NO_2 para la CE-CCA-001/89. De acuerdo a Garzón-Zuñiga en 2005 afirman que la presencia de ciertas bacterias nitrificantes heterótrofas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nocardia* y *Streptomyces* llevan a cabo la nitrificación, inhibiendo el proceso por formación de glucosa causando bajos rangos de nitrato, la nula presencia de estos géneros puede reflejarse en los valores tan altos mencionados.

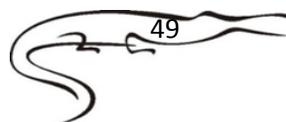
De los nitratos presentes en la laguna, por reacciones reversibles puede producirse también nitrito debido a procesos de desnitrificación, al combinarse el nitrato con el carbono que se libera de los procesos de descomposición de materia orgánica como lo propone Fernández y Vázquez en el 2006. La presencia de nitritos también está relacionada con la contaminación de carácter fecal reciente como lo menciona Jifkins en



2017. El valor más alto en este estudio fue de 35.37 mg/L en el agua de los organismos adultos, esto se debe a la cantidad de cocodrilos que había en el estanque, el registro menor fue de 20 mg/L en el agua de los cocodrilos jóvenes, puesto que estos estaban separados, a pesar de ser el valor más bajo sale de los límites permisibles de la CE-CCA-001/89.

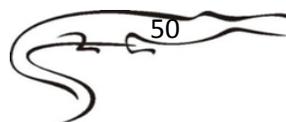
Las concentraciones de amonio dependen del pH y la temperatura del agua como lo señala González y Sánchez en 2014, a medida que los valores de pH y temperatura aumentan, la concentración de NH_3 también aumenta pero la concentración de NH_4^+ disminuye. García-Rodríguez y col. en 2015 afirman que niveles altos de materia orgánica incrementa los niveles de amonio siendo característico de los sistemas eutróficos, los resultados en ambas temporadas rebasaron los límites máximos permisibles para la vida acuática (CE-CCA-001/89) teniendo como valor máximo 48.94mg/L en el agua de los cocodrilos adultos durante secas, en cuanto al valor mínimo registrado 34.33 mg/L fue en el agua con organismos neonatos en temporada de lluvias, cabe resaltar que el factor de dilución de las lluvias interviene en la cantidad de materia presente dentro de los estanques.

Los valores de fosfatos (PO_4) para las temporadas de lluvias y secas tuvieron valores mayores al límite máximo permisible de 0.05 mg/L $-\text{PO}_4$ para la CE-CCA-001/89, como el mayor valor 20.74 mg/L, se obtuvo en el agua de los organismos neonatos en temporada de secas y el menor valor fue de 5.85 mg/L para el agua con los cocodrilos jóvenes. Garzón-Zúñiga en 2005 indica que existen microorganismos heterótrofos, con la capacidad de almacenar y eliminar fósforo como *K. pneumoniae*, *A. hydrophila* y *Enterobacter* spp, pero está registrado que si el fósforo se precipita, se forma fosfato de calcio por el aumento del pH a 8.0, dados los resultados de pH antes mencionados que van desde los 5.54 a 7.77 unidades de pH, el registro de valores altos de fosfatos refleja que las bacterias no están metabolizando adecuadamente por la saturación de este ion dentro del agua (cita).



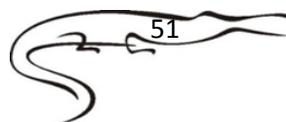
10. Conclusiones

- A través del análisis bacteriológico en los cocodrilos y el agua, se encontraron bacterias como: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca* siendo parte de las enterobacterias que a su vez causa enfermedades. Se registraron diferentes grupos causantes de diferentes enfermedades en cocodrilos como: *Salmonella*, *Shigella* y *Aeromonas*.
- A pesar de obtener bacterias que se reporta causan enfermedades en cocodrilos, no se encontraron condiciones aparentes que afecten al sistema inmunológico permitiendo la entrada y propagación de bacterias registradas
- Existe una relación de las bacterias registradas en los cocodrilos y el agua, puesto que existe una transmisión de ellas, aumentando cuando los organismos se encuentran en condiciones de estrés.
- Los valores registrados para los fisicoquímicos como Temperatura, pH, O₂, Conductividad, DBO, DQO, están en los valores óptimos para la proliferación microbiológica, pero salen de los límites permisibles para la conservación de vida acuática, indicando un medio óptimo para actividad microbiológica y conflictos en la fauna acuática.
- Debido a las concentraciones promedio de nitratos (36.02 mg/L), nitritos (27.57 mg/L), amonio (41.15 mg/L) y fosfatos (9.6 mg/L) ocasionan que las bacterias no puedan metabolizar por completo y propicie una eutrofización causando que la vida acuática vaya en picada.
- La laguna “La colorada” y los recintos que se vierten de esta agua presentan grados de perturbación debido a que no hay circulación del ambiente, la alimentación de los cocodrilos es por medio de cadáveres de un rastro y no hay posterior limpieza permitiendo desarrollar un buen ambiente para la propagación de microorganismos.

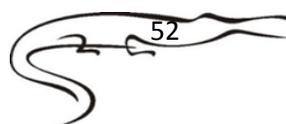


➤ Literatura citada

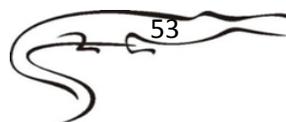
- Agua.org.mx (2012). Centro Virtual de información del Agua. Fondo para la comunicación y la educación ambiental, A.C. Recuperado de <http://www.agua.org.mx/el-agua/agua-en-mexico/lagosylagunasdemexico/25992-lagos-y-lagunas-de-mexico>.
- Anderson JR (1999) Characterization of the oral and cloacal flora of wild and farmed crocodiles (*Crocodylus porosus* and *C. johnstoni*) in Northern Australia. BSc (Hons) thesis, James Cook University, Townsville
- Apella, C. M., & Araujo, Z. P. (2005). Microbiología del agua. Conceptos Básicos. *Tecnologías Solares para la Desinfección y Descontaminación del Agua*, 33-50.
- Arcos, P.M. D. P., Ávila N. S. L., Escupiñan, T. S. M., & Gómez, P, A. C. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*, 3(4).
- Audisio, M. C., Terzolo, H. R., & Apella, M. C. (2005). Bacteriocin from honeybee beebread *Enterococcus avium*, active against *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 71(6), 3373-3375.
- Ávila de Navia, S., Estupiñán Torres, S. M., Chavarro, F. H., & Acero, D. A. (2014). Indicadores bacterianos no habituales de la calidad de aguas naturales. *UNED Research Journal/Cuadernos de Investigación UNED*, 5(2).
- Barrera-Escorcía, G., Wong-Chang, I., Sobrino-Figueroa, A. S., Guzmán-García, X., Hernández-Galindo, F., & Saavedra-Villeda, F. (1999). Evaluación microbiológica de la laguna de Tamiahua, Veracruz, en el ciclo 1994-1995. *Hidrobiológica*, 9(2), 125-134.
- Benavides, A., Moreno, M., Sosa, M., Puga, S., Alcalá, J., & Quintana, C. (2008). Evaluación de la Calidad del Agua en las Principales Lagunas del Estado de Chihuahua. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 4(2), 84-88.
- Bolaños, Ir., I Sánchez R. Y L. Piedra, C. (1996). Inventario y estructura de crocodílidos en tres zonas de Costa Rica. *Biología Tropical* 44,15-20.
- Botero, L., Zambrano, J., Oliveros, C., León, D., Sarcos, M., & Martínez, M. (2002). Calidad microbiológica del agua de un sistema de lagunas de estabilización a ser empleada en irrigación. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 19(4).
- Casas–Andreu, G. y A. Guzmán. (1970). Estado actual de las investigaciones sobre cocodrilos mexicanos. Serie de Divulgación 3. Instituto Nacional de Investigaciones Biológicas Pesqueras, México, D.F. 50.



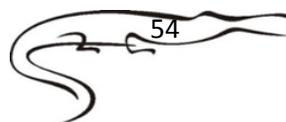
- Camargo, J. A., & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Caldicott DGE, Croser D, Manolis C, Webb G, Britton A (2005) Crocodile attack in Australia: an analysis of its incidence and review of the pathology and management of crocodilian attacks in general. *Wilderness Environ Med* 16: 143–159
- Carbajal, Ángeles (2000). Importancia del agua en las personas mayores En “Agua. El arte de buen comer”. Academia española de Gastronomía. Barcelona.
- Carrillo C., Bravo N., Aguilar J., Guillén A., Yi A., (1991). Manual de Laboratorio de Cólera. Instituto Nacional de Salud, Serie de Normas Técnicas N° 2. Lima.
- Carriquiriborde. M., (2010). Enfermedades zoonóticas asociadas a reptiles. Temas de Zoonosis IV. Capítulo 48. Argentina.
- Charruau, P., Pérez-Flores, J., Pérez-Juárez, J. G., Cedeño-Vázquez, J. R., & Rosas-Carmona, R. (2012). Oral and cloacal microflora of wild crocodiles *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in the Mexican Caribbean. *Diseases of aquatic organisms*, 98(1), 27-39.
- Center for Innovation in Engineering and Science Education. Estudio Internacional Ambiental de la Calidad del Agua, 2006. Disponible en: <http://www.k12science.org/curriculum/diproj/es/>
- CONABIO, INE, CONAFOR, CONAGUA e INE, (2006). Minuta de la Reunión Interinstitucional para la definición de manglar. INEGI- Aguascalientes.
- Cortez Martínez, M. A. (2015). Perfil hemático y presencia de hemoparásitos en reptiles del Parque Zoológico Nacional, El Salvador (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).
- Cupul-Magaña, Rubio-Delgado & Reyes-Juárez (2005). La mordida del cocodrilo americano (*Crocodylus acutus*), ¿es potencialmente séptica? Departamento de Ciencias, Centro Universitario de la Costa, Universidad de Guadalajara, Departamento de Ecología, Subdirección de Medio Ambiente y Ecología, H. Ayuntamiento de Puerto Vallarta, Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Díaz Mendoza., C., Castro Angulo., I., Manjarez Paba., G. (2010). Mangles de Cartagena de indias: “Patrimonio Biológico” y fuente de biodiversidad. Joven Investigador de Grupo de Investigaciones Ambientales –GIA. Fundación Universitaria Tecnológico Comefanalco.



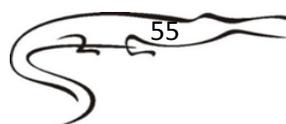
- Díaz-Vargas, M., Elizalde Arriaga, E. E., Quiróz Castelán, H., García Rodríguez, J., & Molina Estudillo, I. (2005). Caracterización de Algunos Parámetros Físico Químicos del Agua y Sedimento del Lago Zempoala, Morelos, México. *Acta Universitaria*, 15(2).
- Doering EJ III, Fitts CT, Rambo WM, Bradham GB (1971) Alligator bite. *J Am Med Assoc* 218: 255–256
- Ebani V, Fratini F. Bacterial Zoonose Among Domestic Reptiles. *Annali Fac Med Vet.* 2005; LVIII: 85-91.
- Erazo, N, C., del Prado-Reyes, Y. N., Gonzales-Ore, V. H., & Capuñay-Becerra, C. (2016) Enterobacterias y su resistencia antimicrobiana en el caimán blanco (*Caiman crocodilus*) de vida libre en el río Madre de Dios, Tambopata–Perú.
- Escobedo, D. U., Real, M. T. H., Moreno, N. H., Pérez, A. E. U., & Ozono, Y. C. (1999). Calidad bacteriológica del sistema lagunar de san Ignacio-Navachiste, Sinaloa. *Ciencia y Mar*, 3(9).
- Fernández, C, M, & Vázquez-Taset, Y. M. (2006). Origen de los nitratos (NO₃) y nitritos (NO₂) y su influencia en la potabilidad de las aguas subterráneas. *Minería & Geología*, 22(3), 9.
- Flandry F, Lisecki EJ, Domingue GJ, Nichols RL, Greer DL, Haddad RJ Jr (1989) Initial antibiotic therapy for alligator bites: characterization of the oral flora of Alligator mississippiensis. *South Med J* 82: 262–266
- García-Rodríguez J, Molina-Astudillo FI, Miranda-Espinoza E, Soriano-Salazar MB, Díaz-Vargas M. 2015. Variación fitoplanctónica en un lago urbano del municipio de Cuernavaca, Morelos, México. *Acta universitaria*. 25, 1: 03-11.
- Garzón-Zúñiga MA. 2005. Mecanismos no convencionales de transformación y remoción del nitrógeno en sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Ingeniería Hidráulica en México*. 20, 4: 137-149.
- Gómez Álvarez, A., Villalba Atondo, A., Acosta Ruíz, G., Castañeda Olivares, M., & Kamp, D. (2004). Metales pesados en el agua superficial del Río San Pedro durante 1997 y 1999. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 20(1).
- González., A, E., & Sánchez Muñoz, D. A. (2014). *Sistema de lodos activados para la reducción de nitrógeno amoniacal efluente de un sistema de estabilización por contacto* (Doctoral dissertation).



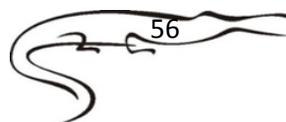
- Gorden RW, Hazen TC, Esch GW, Fliermans CB (1979) Isolation of *Aeromonas hydrophila* from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *J Wildl Dis* 15: 239–243
- Grajales, J. G., & Luna, M. A. L. (2010). Análisis bibliográfico del conocimiento de los crocodilianos en México. *Revista Latinoamericana de Conservación| Latin American Journal of Conservation*, 1(2).
- Gruen RL (2009) Crocodile attacks in Australia: challenges for injury prevention and trauma care. *World J Surg* 33: 1554–1561.
- Hernández, A. E. (2000). H₂O Elixir de la vida. Importancia del agua para los seres vivos. *Elementalwatson "la" revista*. Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina. 9.
- Hernández-Hurtado, H. Cupul-Magaña. (1996). *Rev Biomed*, 7, 245-248.
- Hidalgo, M. D. V., Meoni, G. S., Barrionuevo, M. A., Navarro, G., & Paz, R. (2003, September). Variabilidad de la relación DBO/DQO en Ríos de Tucumán Argentina. In *Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente*, 13 (pp. 1-11). AIDIS.
- Huchzermeyer, F. W., Henton, M. M., Riley, J., & Agnagna, M. (2000). Aerobic intestinal flora of wild-caught African dwarf crocodiles *Osteolaemus tetraspis*.
- Huchzermeyer FW (2003) Crocodiles: biology, husbandry and diseases. CABI Publishing, Wallingford.
- Hutton, J. M. & G. J. W. Webb. (1992). An introduction to the farming of crocodilians. pp. 1-39 in: luxmoore, r. a. (ed.). *directory of crocodilian farming operations*. Second Edition. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge. UK.350.
- Johnston MA, Porter DE, Rhodes GI, Webster LF (2010) Isolation of faecal coliform bacteria from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J Appl Microbiol* 108: 965–973
- López García, F. A., Ortega Rivera, F., Rodríguez García, R., Reyna Cepeda, T., & Rojas Peña, C. (2015). Sistema de captación y conducción para el uso eficiente del agua, en el ejido San Juan del Cohetero, Municipio de General Cepeda, Coahuila.
- Lovely, C. J., & Leslie, A. J. (2008). Normal intestinal flora of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Okavango Delta, Botswana. *Journal of the South African Veterinary Association*, 79(2), 67-70.
- Mac Faddin J., (2003). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. Buenos Aires, Ed. Panamericana, 3° Edición, 850 pp.



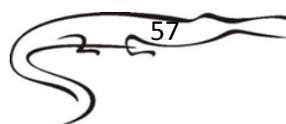
- McFeters, G. A., & Stuart, D. G. (1972). Survival of coliform bacteria in natural waters: field and laboratory studies with membrane-filter chambers. *Applied microbiology*, 24(5), 805-811.
- Magnino S, Colin P, Dei-Cas E, Madsen M and others (2009) Biological risks associated with consumption of reptile products. *Int J Food Microbiol* 134: 163–175
- Margulis, L. Bassler, B. Sandín, M. Restrepo, J. Labrador, J. Ruipérez, V. Mata, F. Santos, E. Pozuelo, P. Mier, J. Goldman, M. Lázaro, L., A. Urderra, A.(2014). Microbiótica, Nutrición simbiótica y microorganismos regeneradores, Una revolución para salvar la Tierra y el ser humano. Ediciones i. Madrid, España.
- Matushima ER, Ramos MCC (1995) Algunas patologías na criação de jacarés no Brasil. In: Larriera A, Verdade LM (eds) La conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos de América Latina, Vol 1. Fundación Banco Bico, Santo Tomé, Santa Fé, p 171–187.
- Mermin J, Hutwagner L, Vugia D, Shallow S and others (2004) Reptiles, amphibians, and human Salmonella infection: a population-based, case-control study. *Clin Infect Dis* 38: S253–S261.
- Miller, S., & Pegues, D. (2000). Mandell, Douglas, and Bennet's principles and practice of infectious diseases. *Edited by: Gerald L Mandell, John E Bennet, Raphael Dolin, 4*, 2013-2033.
- Oneeglio, A. G., & Cruz, N. B. (2008). Preparación de medios de cultivo y reactivos para el laboratorio de microbiología clínica. 1° Edición., Lima.
- ONU-DAES, (2015). Decenio Internacional para la Acción ‘El agua fuente de vida’ 2005-2015. Naciones Unidas. Recuperado de http://www.un.org/spanish/waterforlifedecade/water_and_sustainable_development.shtml.
- Otto, Boede Ernesto & Sobge Elías. (2000) Enfermedades en caimanes del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) y caimanes de la costa (*Crocodylus acutus*) mantenidos en zocriaderos venezolanos. *Revista científica, FCV-LUZ/ Vol. X, N° 4*. Venezuela.
- Pachón Cubillos, D. A. (2009). Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género salmonella en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical *Roberto Franco EBTRB de la Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio-Meta* (Bachelor's thesis).



- Padilla S.E., Weber M. and E. R. Jacobson. 2011. Hematologic and plasma biochemical reference intervals for Morelet's crocodiles (*Crocodylus moreletii*) in the northern wetlands of Campeche, Mexico. *J. of Wildlife Diseases* 47(3): 511–522.
- Palomera, J. V. (2004). Monografía sobre Colima y el municipio de Tecomán. *Revista Vinculando*.
- Pérez-Castillo, A. G., & Rodríguez, A. (2008). Índice fisicoquímico de la calidad de agua para el manejo de lagunas tropicales de inundación. *Revista de Biología Tropical*, 56(4), 1905-1918.
- Podlesky, E., & Cardenas, O. (1995). Modificación de una técnica de muestreo para mejorar la recuperación de *Vibrio cholerae* en aguas superficiales y residuales. *Biomédica*, 15(2), 75-82.
- Ramos Targarona, R. (2013). Ecología y conservación del cocodrilo cubano (*Crocodylus rhombifer*) en la " Ciénaga de Zapata", Cuba.
- Rodríguez, Z, J. (2009). Parámetros fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio, pH, conductividad y temperatura del agua potable analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto,(ASADAS), de cada distrito de Grecia, cantón de Alajuela, noviembre. *Pensamiento Actual*, 9(12-13).
- Rubio Caiza, C. L., Moreno, T., & Lisvet, K. (2016). *Evaluación in vitro de la capacidad bacteriana para remover cadmio en aguas residuales sintéticas* (Bachelor's thesis).
- Rubio Limonta, M., Silveira Coffigny, R., Aguilera Soto, Y., Pozo Escobar, M., & Gonzalez Herrate, N. (2014). Pathology affecting *Crocodylus acutus* (Cuvier, 1807) in the Sabanalamar hatchery, Cuba. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 22(1-2).
- Sánchez Oscar. (2003) Ecosistemas acuáticos:diversidad, procesos, problemática y conservación.
- Sawyer, Clair, N., Perri L. McCarty F. Parkin, (2001). *Química para ingeniería Ambiental*, McGraw-Hill Inc, 4ta Edición. Bogotá, Colombia.
- Schlegel, H. G. & Zaborosch, C (1997). *Microbiología general*. Omega. Barcelona, España. Pp: 654.
- Sigler L. & J. Gallegos M. 2017. El conocimiento sobre el cocodrilo de Morelet *Crocodylus moreletii* (Duméril y Duméril 1851) en México, Belice y Guatemala. México, D.F. 216pp.



- Silva JSA, Mota RA, Pinheiro JWJ, Almeida MCS, Silva DR, Ferreira DRA, Azevedo JCN (2009) Aerobic bacterial microflora of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) oral cavity and cloaca, originating from Parque Zoológico Arruda Câmara, Paraíba, Brazil. *Braz J Microbiol* 40: 194–198
- Suárez MC, Pérez L, Murcia LM, Sarmiento LM, Casilimas S (2000) Intoxicación alimentaria por consumo de carne de caimán negro (*Melanosuchus niger*) en el internado indígena de Nazareth, Amazonas, abril de 1997. *Biomédica* 20: 42–48.
- Tercero Pérez, A. (2011). Evaluación de la calidad de la carne de cocodrilo (*Crocodylus moreletti*) y sus cambios fisicoquímicos y microbiológicos durante el almacenamiento en refrigeración.
- Toledo, V. M. (2005). Repensar la conservación: ¿ áreas naturales protegidas o estrategia bioregional. *Gaceta ecológica*, (77), 67-83.
- Toledo, A. (2006). *Agua, hombre y paisaje*. Instituto Nacional de Ecología.
- Unnerstad, H. E., Lindberg, A., Waller, K. P., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., & Bengtsson, B. (2009). Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary microbiology*, 137(1), 90-97.
- Van Derwalt, Marthal., Huchzermeyer, F.W. & Steyn, Helenac.(1997). Salmonella isolated from crocodiles and other reptiles during the period 1985-1994 in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 64:277-283.
- Velázquez, P, A., Iturvide, F. A., & Lucio, M. A. M. (2016). ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE DOS CUERPOS DE AGUA DEL ESTADO DE GUANAJUATO:“LA PRESA LA PURISIMA” Y “LAGUNA DE YURIRIA”. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 2(1), 71-75.
- Vázquez, S. H. (2001). Observaciones diurnas del cocodrilo de río *Crocodylus acutus* en el estero La Manzanilla, Jalisco, México. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 35(3).
- Wamisho BL, Bates J, Tompkins M, Islam R, Nyamulani N, Ngulube C, Mkandawire NC (2009) Ward round—crocodile bites in Malawi: microbiology and surgical management. *Malawi Med J* 21: 29–31
- Weng Alemán, Z., Iglesias Hernández, B., Abreu Orta, M., & Beltrán Díaz, J. R. (2004). Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 42(1), 0-0.



- Rodríguez, R, Z. (2009). Parámetros fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio, pH, conductividad y temperatura del agua potable analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto,(ASADAS), de cada distrito de Grecia, cantón de Alajuela, noviembre. *Pensamiento Actual*, 9(12-13).

ANEXOS

1. Técnica de identificación de bacterias API 20E

El método API 20E se basa en combinaciones bioquímicas estandarizadas por medio de tiras reactivas, contienen sustratos deshidratados (Unnerstand, 2009). El kit API 20E se conservó en refrigeración (-1.9 °C). Se utilizó en condiciones de asepsia, añadiendo 5ml de agua destilada en la base de la cámara para obtener una atmosfera húmeda.

Para la preparación del inóculo, se tomó una muestra de siembra con menos de 18 horas de incubación, se diluyeron los microorganismos en un medio de suspensión (NaCl al 1%), una vez teniendo la dilución con una micropipeta de 100 µm y puntas estériles se tomó una muestra para depositarla en las celdas, cada una de estas tiene indicaciones ya que cada una tiene diferente forma de llenado, se tiene que evitar la formación de burbujas; se incubaron a 37°C por 18 horas. Sí el resultado se considera dudoso la prueba debe ser incubada durante 24 horas más para su posterior lectura.

La lectura se hizo a través de una tabla estandarizada; para los resultados que necesitaron reactivos para la revelación se les agregó una gota de cada uno: TDA (triptófano desaminasa), TDA (percloruro de hierro), IND (Producción de Indol), reactivo de JAMES (ácido clorhídrico 1N y componente J2183 (confidencial)), VP (producción de acetoina), VP1 (hidróxido de potasio al 40%) y VP2 (etanol), GLU (fermentación/oxidación de glucosa). Para la reducción de los nitratos en nitritos y en nitrógeno se agregó una gota de los reactivos NIT1 (ácido sulfanílico y ácido acético) y NIT2 (N, N-dimetil-1-naftilamina y ácido acético). Se realizó la identificación de especies bacterianas por la cifra numérica de siete dígitos obtenida en la lectura de las pruebas anteriores. Con base al Catálogo Analítico se buscó el perfil numérico para determinar las especies bacterianas.

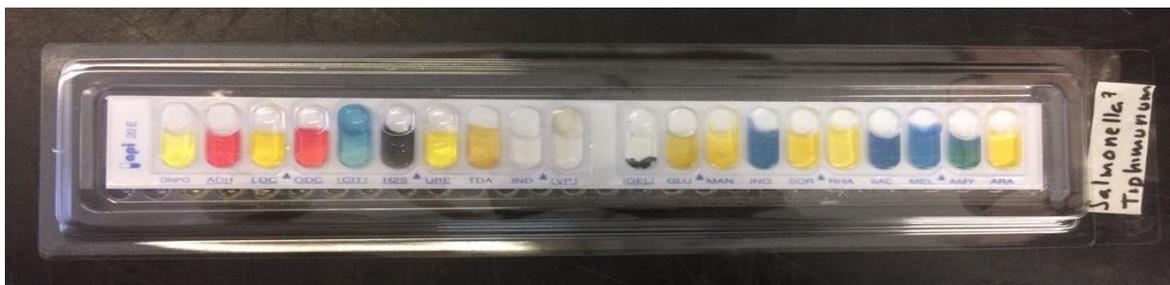


Figura 12. Tira reactiva de API 20E. Se observa los resultados obtenidos después de la incubación de 24 hrs.

2. Agar TSI (Hierro y Triple azúcar)

Para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa en el fondo.

El extracto de carne y la pluripeptona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico (como resultados positivos en las lecturas). Por la fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro (Cavallini, 2005).

3. Agar MIO (Motilidad Indol Ornitina)

Para diferenciación de Enterobacterias, basándose en las pruebas de movilidad, ornitina descarboxilasa y la producción de indol.

Es un medio semisólido, con contenido de peptonas que proporcionan fuentes de nitrógeno y carbono, el extracto de levadura proporciona vitaminas y la dextrosa es la fuente de energía. Exclusivo para la diferenciación de Enterobacterias, basándose en las pruebas de movilidad, la cual se pone en manifiesto por la turbidez difusa alrededor de la línea de inoculación. La ornitina descarboxilasa tiene la facultad de formar la amina putrescina y liberando bióxido de carbono (coloración violeta-purpura); el triptófano por acción de la triptofanasa forma Indol, y otros compuestos (escatol e indol-acético), al agregar el Reactivo de Kovacs (p-NNdimetil-amino benzaldehído), se produce un compuesto color rojo como reacción positiva a la producción de Indol, si se produce un color amarillo, el resultado es negativo (Schlegel y Zaborosch, 1997)

4. Agar LIA (Hierro-Lisina)

Por su capacidad de diferenciar enterobacterias en base a su capacidad de descarboxilar o desaminar la lisina y producción de ácido sulfhídrico.

La peptona de gelatina funciona como soporte de crecimiento, el extracto de levadura proporciona la fuente de vitaminas necesarias y la dextrosa es el carbohidrato fermentable. En este medio se observa la fermentación de la glucosa, la producción de ácido sulfhídrico, la descarboxilación y desaminación de la lisina. Los microorganismos que tienen la enzima descarboxilasa, descarboxilan el aminoácido lisina a cadaverina (amina primaria, liberando CO₂), debido a la alcalinidad, el pH se modifica. La desaminación de la lisina a ácido alfa cetocarbónico, forma compuestos pardo-rojizos en la superficie del medio con la sal de hierro y por la acción del oxígeno. La formación de ácido sulfhídrico se observa por una coloración negra debida al sulfuro de hierro producido (Schlegel y Zaborosch, 1997).

5. Citrato de Simmons

El citrato de sodio es la única fuente de carbono. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico del medio. Cuando las bacterias utilizan el citrato, el medio se alcaliniza y cambia el color inicial verde (neutro), que está dado por la presencia del azul de bromotimol a color azul (alcalino, prueba positiva). La reacción negativa se manifiesta por ausencia de crecimiento y no hay cambio de color (Weng y [eolscol](#), 2004).

6. Tinción GRAM

Se realizó con la extensión del cultivo aislado en un portaobjetos, previamente se colocó una gota de agua, consecutivamente con el asa se tomó una colonia, mezclando con la gota de agua destilada extendiendo en movimientos circulares, se dejó secar por evaporación al aire en un campo estéril, se realizó la fijación de los microorganismos al portaobjetos por la llama.

El método se empleó de acuerdo a la tinción de la pared celular de las bacterias dividiéndose en dos grandes grupos, según retengan o no el colorante primario (Gram (+) o Gram (-), tras sufrir la acción de un colorante (Suárez y Reyes, 2002). Conforme a lo anterior se utilizaron cuatro reactivos diferentes para realizar el método de tinción Gram, si se tiñen con el colorante primario se denominaron “Gram (+)” (color violeta); acorde al agente decolorante que se colocó por segundos (alcohol-acetona), después se lavó con agua destilada, hasta evaporación, se le colocó un colorante de contraste (safranina) durante tres minutos, lo que determinó la decoloración de las bacterias, denominadas “Gram (-)” (color rojizo). Después del tiempo establecido se lavó con agua destilada y se secaron con un papel filtro para su observación en un microscopio de contraste de fases (Rubio y col. en 2016).