

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

DETECCION DE *Vibrio cholerae* O-1 EN DIFERENTES HABITATS

DE LA BAHIA DE TODOS SANTOS, B.C., MEXICO

**TESIS QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS EN
OCEANOGRAFIA COSTERA PRESENTA:
AMELIA PORTILLO LOPEZ**

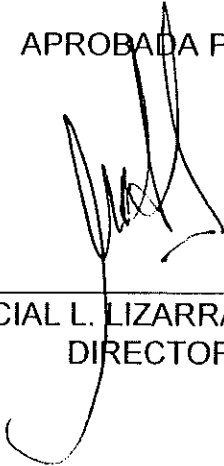
ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, ABRIL DE 1996.

DETECCION DE *VIBRIO CHOLERAE* O-1 EN DIFERENTES HABITATS DE LA
BAHIA DE TODOS SANTOS, B.C., MEXICO.

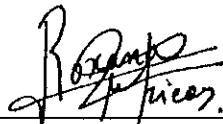
TESIS QUE PRESENTA

AMELIA PORTILLO LOPEZ

APROBADA POR:



Dr. MARCIAL L. LIZARRAGA PARTIDA
DIRECTOR



Dra. ROXANA RICO MORA
SINODAL



M en C. RAMON CAJAL MEDRANO
SINODAL

RESUMEN

Se analiza la presencia de *Vibrio cholerae* O-1 cultivable y no cultivable en agua, plancton, sedimento y mejillón, durante enero-agosto de 1995 en la Bahía de Todos Santos, B.C.

Se analizaron un total de 52 muestras en las cuales no se encontró *V. cholerae* O-1, sin embargo, *V. cholerae* No O-1 estuvo presente en un 28.8%.

Se aislaron un total de 43 cepas características de *V. cholerae* No O-1, 44% del plancton, 37% en agua, 19% en sedimento. En mejillón no se detectó la presencia de *V. cholerae* No O-1.

En la parte Norte de la Bahía se presentaron las mayores concentraciones microbianas de Coliformes totales y fecales, Bacterias heterótrofas viables, Vibrios totales y el mayor número de cepas características de *V. cholerae* No O-1. La parte sur de la Bahía, donde se realizan cultivos de mejillón, cumplió con las normas bacteriológicas de calidad de agua durante todo el periodo del estudio para el cultivo de moluscos, así como también presentó las menor cantidad de cepas características de *V. cholerae* No O-1.

A mis Padres, Eduardo Portillo y Rafaela López.

A mi Esposo Raúl Yépiz, por su amor y paciencia.

A Dios por darme a mi hijo Daniel y al que viene en camino

AGRADECIMIENTOS:

A mi director de Tesis Dr. Marcial Leonardo Lizarraga Partida por su apoyo y ayuda profesional durante la realización de este trabajo.

A Lupita Vargas Cardenas por su colaboración en el laboratorio y en el análisis de las muestras, así como también por su amistad.

A Dahren Gomez T. y Fausto Arellano C. por su colaboración en los muestreos y en el análisis de los mismos, mil gracias.

A Cesar O.Almeda J. por su gran ayuda en la realización de este trabajo.

A mis sinodales Dra. Roxana Rico y M.C. Ramón Cajal, por sus atinadas correcciones.

A mis amigos (as) que de alguna u otra forma ayudaron en la realización de este trabajo, así como también por su apoyo durante mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior en Ensenada (C.I.C.E.S.E.), por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su apoyo económico durante mis estudios de Maestría y en la realización de este trabajo.

Contenido

I INTRODUCCION:	1
I.1 ANTECEDENTES:	5
I.2 OBJETIVOS:	11
II AREA DE ESTUDIO:	12
III METODOLOGIA:	14
III.1. COLECCION DE MUESTRAS:	14
III.2 DETECCIÓN DE <i>VIBRIO CHOLERAE</i> O-1	16
III.2.1. CULTIVABLE	16
III.2.2. PRUEBAS DE IDENTIFICACION	18
III.2.3. NO CULTIVABLE	19
III.3. CUANTIFICACION DE OTROS GRUPOS DE BACTERIAS	19
III.3.1. COLIFORMES TOTALES Y FECALES	19
III.3.2. HETEROTROFAS VIABLES	20
III.3.3. VIBRIOS TOTALES	20
III.3.4 BACTERIAS TOTALES	20
III.4. PARAMETROS FISICOS	20
IV RESULTADOS	21
IV.1. <i>VIBRIO CHOLERAE</i> O-1	21
IV.2. ANALISIS DE AGUA	24
IV.2.1. BACTERIAS HETEROTROFAS VIABLES	24
IV.2.2.) BACTERIAS TOTALES	24
IV.2.3. VIBRIOS TOTALES	27
IV.2.4. COLIFORMES TOTALES	27
IV.2.5.) COLIFORMES FECALES	27
IV.3. SEDIMENTO	31
IV.3.1. BACTERIAS HETEROTROFAS VIABLES	31
IV.3.2. VIBRIOS TOTALES	31
IV.3.3.) COLIFORMES TOTALES	34
IV.3.4. COLIFORMES FECALES	34
IV.4.) MEJILLON	37
IV.4.1.) BACTERIAS HETEROTROFAS VIABLES Y VIBRIOS TOTALES	37
IV.4.2.) COLIFORMES TOTALES Y FECALES	37
IV.5.) TEMPERATURA	37
V DISCUSION	40

VI CONCLUSIONES:.....	48
IX LITERATURA CITADA:	50
VIII APENDICE.....	62

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Localización geográfica del área de estudio y estaciones de muestreo, en la Bahía de Todos Santos, B.C.	15
2	Técnica FDA/BAM modificada para el aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> O-1.	17
3	Número de cepas características de <i>Vibrio cholerae</i> no O-1 durante enero-agosto de 1995 en la Bahía de Todos Santos, B.C. a) mensual y b) por estaciones.	23
4	Concentración promedio de Bacterias Heterótrofas Viables en agua superficial a) mensual, b) por estaciones de muestreo.	25
5	Concentración promedio de Bacterias Totales en agua superficial a) mensual, b) por estaciones de muestreo.	26
6	Concentración promedio de Vibrios Totales en agua superficial, a) mensual, b) por estaciones de muestreo.	28
7	Número más probable de Coliformes Totales en agua superficial, a) mensual, b) por estaciones de muestreo.	29

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN...)

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
8	Número más probable de Coliformes Fecales en agua superficial, a) mensual, b) por estaciones de muestreo.	30
9	Concentración promedio de Bacterias Heterótrofas Viables en sedimento, a) mensual, b) por estaciones de muestreo.	32
10	Concentración promedio de Vibrios Totales en sedimento a) mensual, b) por estaciones de muestreo.	33
11	Número más probable de Coliformes Totales en sedimento, a) mensual, b) por estaciones de muestreo	35
12	Número más probable de Coliformes Fecales en sedimento, a) mensual, b) por estaciones de muestreo	36
13	Concentración promedio de Bacterias Heterótrofas Viables y Vibrios Totales en mejillón.	38
14	Número más probable de Coliformes en mejillón, a) Totales, b) Fecales.	39

LISTA DE TABLAS

<u>Tabla</u>		<u>Página</u>
1	Aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> No O-1 en los diferentes hábitats estudiados, durante enero-agosto de 1995, en la Bahía de Todos Santos, B.C.	22

I. INTRODUCCION:

Vibrio cholerae es un bacilo gram negativo perteneciente a la familia Vibrionaceae, causante de una enfermedad entérica en el hombre, llamada cólera. Este microorganismo se le ha considerado recientemente como autóctono de aguas salobres, estuarinas (Colwell *et al.*, 1977; Colwell *et al.*, 1990). Se ha registrado su presencia en el medio ambiente a temperaturas superiores a los 10°C y en ambientes dulceacuicolas a salinos (Singleton *et al.*, 1982 b).

Vibrio cholerae presenta una estructura antigénica somática "O" y de acuerdo a ella está dividido en 139 serogrupos. Los del serogrupo O-1 han estado asociados con el cólera en el ser humano, mientras que el resto de los serogrupos están agrupados como los No O-1, o vibrios no coléricos (Colwell y Spira, 1992; Manning *et al.* 1994), sin embargo, a partir de 1992 un serogrupo No O-1 denominado O139 ha estado causando una epidemia con la misma sintomatología que el cólera, en la región de la India y Bangladesh. La característica principal de los vibrios del grupo O-1 y del O139 es la producción de una toxina, causante de la enfermedad en los huéspedes susceptibles (Lee *et al.*, 1982; West y Lee, 1982). Se han definido dos biotipos de *Vibrio cholerae* O-1 que producen epidemias, el denominado "EL clásico" y "El Tor", este último fue el causante de la séptima epidemia mundial (pandemia), la cual afectó al Continente Americano en 1991 (Kaper *et al.*, 1979). Recientemente se ha estado considerando a la epidemia del O139 como la octava epidemia (Morris, 1994).

Hasta los años setenta y principios de los ochenta se creía que *V. cholerae* O-1 era capaz de sobrevivir sólo en el tracto intestinal del hombre sin embargo, en estudios recientes se ha encontrado también como un habitante de ambientes salobres y estuarinos (Colwell *et al.*, 1977; Singleton *et al.*, 1982 a, b; West y Lee, 1982; Colwell y Spira, 1992). En el medio ambiente su estado principal es el no toxigénico que, bajo ciertas condiciones de temperatura, pH, salinidad y nutrientes, puede revertirse a un estado toxigénico. Este posible revertimiento podría ser la explicación de la presencia de brotes infecciosos en ciertas regiones donde no hay una causa aparente (Kaper *et al.*, 1979; Colwell y Spira, 1992).

Una de las principales fuentes de contaminación por *Vibrio cholerae* O-1 son los reservorios de agua dulce y marina. Existe, hasta hoy en día, gran controversia sobre la ecología de este género en el ambiente marino debido a que, los estudios hechos hasta la década de los 70's utilizaban en su detección métodos tradicionales, como el del número más probable (NMP), y medios de cultivo para muestras clínicas, siendo éstos de poca confiabilidad. De acuerdo a Colwell *et al.* (1985), en el ambiente marino existe un estado fisiológico de las bacterias denominado latente, probablemente producto del estrés ambiental, que las mantiene como células viables pero no cultivables. Los organismos en este estado fisiológico pueden ser detectados por técnicas de fluorescencia, específicas al vibrión colérico en muestras de agua, tales como la tinción de anticuerpos monoclonales, la cual es específica para el antígeno "A" del lipopolisacárido de la parte externa de la membrana de los O-1. Estos anticuerpos marcados con Isotiocianato de fluorosceína dan el color

verde fluorescente de la bacteria (Kaper *et al.*, 1979; Xu *et al.*, 1982; Brayton *et al.*, 1987; Colwell y Spira, 1992).

Uno de los mecanismos de dispersión y transmisión de *V. cholerae* propuesto recientemente (Colwell y Spira, 1992) y que se ha estado estudiando, es el plancton marino y los organismos planctívoros implicados en la cadena alimenticia. Dentro de estos últimos se menciona a los moluscos, peces y crustáceos como susceptibles de contaminarse y ser vectores, hacia el ser humano, cuando se les ingiere con poca higiene y una escasa o nula cocción (Huq *et al.*, 1983; De Paola *et al.*, 1987; Puente *et al.*, 1992; Epstein *et al.*, 1993), sin embargo, los resultados de algunos estudios sugieren que la asociación de *V. cholerae* con el plancton se dá básicamente con copépodos, Huq *et al.* (1990) han observado la fijación de *V. cholerae* O-1 en rotíferos y cladoceros. Así mismo se ha encontrado también en fitoplancton, en *Volvox* sp., *Pediastrum simplex* y Cianobacterias (Huq *et al.*, 1983; Tamplin *et al.*, 1990).

Los estudios antes mencionados se han llevado a cabo en ambientes tropicales, por lo que sería importante determinar la presencia de esta especie en muestras de plancton de zonas costeras con clima templado, tal como es el caso de la Bahía de Todos Santos, en Baja California, México.

Las zonas costeras como la Bahía de Todos Santos presentan florecimientos de fitoplancton, seguidos posteriormente por el de zooplancton, condiciones a las cuales podría estar asociada la presencia de *V. cholerae* O-1. Además, el puerto recibe constantemente barcos extranjeros de turismo y

cabotage, factor considerado como muy importante en la dispersión de esta enfermedad (McCarthy y Khambaty, 1994). Estas condiciones de la Bahía de Todos Santos la sitúan como una área importante para la determinación de *V. cholerae*, a fin de establecer su potencial epidemiológico. Así mismo, este estudio es de interés económico, debido a que actualmente la parte sur de la Bahía está siendo explotada por sistemas de acuicultura.

I.1 ANTECEDENTES:

El cólera es un padecimiento conocido desde tiempos remotos. El agente productor de esta enfermedad *Vibrio cholerae* o *V. comma*, denominado anteriormente así por su morfología curva, fue descubierto por Roberto Koch en 1883 (Colwell *et al.*, 1977; Kaper *et al.*, 1979; Fernández de Castro, 1991; Olarte, 1991).

El bacilo del cólera es endémico en el delta del río Ganges y desde esta área se difundió extensivamente por todo el mundo abarcando los cinco continentes, esto sucedió por varias ocasiones durante el siglo XIX. Desde entonces a la fecha se han registrado seis epidemias mundiales (Pandemias), durante los años de 1817-1823, 1829-1851, 1852-1859, 1863-1879, 1881-1896 y 1899-1923 (Fernández de Castro, 1991; Blake, 1994).

La enfermedad se expandió siguiendo las rutas comerciales, turísticas o religiosas. Al continente americano llegó en 1832, iniciándose en Canadá. A México entró en 1833 por el puerto de Veracruz, seguido por Acapulco y Salina Cruz de donde se extendió a todo el país (Malvido y Cuenya, 1991). La principal ruta de distribución fue, y probablemente sigue siendo, la vía marítima, medio a través del cual, en esos años se distribuyó también a centroamérica y sudamérica. A fines del siglo XIX y principios del siglo XX los conocimientos sobre la causa y la transmisión del cólera, propiciaron medidas drásticas de sanidad en puertos y fronteras, a consecuencia de lo cual la enfermedad se redujo notablemente. Sin embargo, en 1962 se inicia la séptima epidemia mundial, originándose en el sureste de Asia, la cual no se manifiesta

en este continente sino hasta 1991 (Fernández de Castro, 1991; Malvido y Cuenya, 1991).

Esta epidemia mundial, a diferencia de las anteriores fue ocasionada por una variante del *V. cholerae* El clásico, denominado *V. cholerae* variedad El Tor, no conocido antes de 1905. *Vibrio* El Tor se diferencia del clásico por la producción de hemolisina (Kaper *et al.*, 1979; Olarte, 1991).

Los estudios orientados a conocer el origen de *Vibrio cholerae* O-1, principalmente en el sureste de la costa de Estados Unidos, comenzaron a enfocarse al ambiente marino y su relación con la epidemiología. Se encontró que este microorganismo era capaz de subsistir fuera del huésped y mantenerse de alguna forma u otra en el ambiente marino (Kaper *et al.*, 1979; Fernández de Castro, 1991; Swerdlow y Ries, 1992).

Es poco lo que se conoce acerca de la ecología de esta especie. Existen algunos trabajos que señalan a esta bacteria como un organismo autóctono de aguas salobres y marinas (Kaper *et al.*, 1979; Singleton *et al.*, 1982 a). Sin embargo, *V. cholerae* en el medio acuático ha sido aislado tanto en aguas continentales como estuarinas y marinas. Aunque la mayoría de las cepas aisladas son serotipo No O-1, se ha demostrado la presencia del grupo O-1 (Colwell *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1982; Garay *et al.*, 1985).

Colwell *et al.* (1981) reportaron la presencia *V. cholerae* O-1 en muestras de agua en la Bahía de Chesapeake y en la Bahía de Louisiana, E.U.A. Así mismo Hood *et al.* (1981) aislaron *V. cholerae* O-1 en el ostión

Crassostrea virginica de la Bahía de Apalachicola, Florida, en donde se cosechan anualmente de 1,362 a 2,270 toneladas de ese molusco.

Uno de los primeros reportes de moluscos como vectores de transmisión del cólera fue en Malasia en 1969 (139 casos). Posteriormente, los reportes incluyeron otras áreas como Italia (278 casos) y Texas (1 caso) en 1973, Portugal en 1974 (2,400 casos) y Alabama en 1977 (1 caso). Así mismo, se reportaron otro tipo de mariscos como, camarones crudos en Filipinas en 1961 (330 casos) y pescado crudo en Guam en 1974 (6 casos). En España (1979), Estados Unidos (1973, 1980, 1983, 1984, 1986, 1988, 1991, 1992), México (1982, 1991), Perú (1991), Se presume que *Vibrio* El Tor provino directamente de mariscos contaminados (Colwell *et al.*, 1977, Fernández de Castro, 1991, Kaysner y Hill, 1994). No obstante, no se sabe, con certeza, cual fue el vector que originó el brote de Perú, en 1991, sin embargo, *Vibrio cholerae* se detectó en el plancton y mariscos de la región (Fernández de Castro, 1991; Kaysner y Hill, 1994).

Aún cuando la mayor parte de los *Vibrio cholerae* son No O-1, se ha observado que, bajo ciertas condiciones ambientales, algunas de estas cepas pueden producir la enterotoxina (Colwell *et al.*, 1990). También se ha observado que las cepas que la producen pierden esta característica, de tal forma que se pueden revertir (Kaper *et al.*, 1979; Hood *et al.*, 1981; Nair *et al.*, 1988). Aún cuando algunos de los *V. cholerae* No O-1 pueden producir la toxina, existen estudios que señalan que la toxina es similar pero no idéntica a la toxina producida por los *V. cholerae* O-1 (Ohashi *et al.* 1972; Zinnaka y

Carpenter, 1972; Craig *et al*, 1981). La toxina producida por los No O-1 es baja en concentración, aunque se puede incrementar por métodos de laboratorio. La mayoría de los *V. cholerae* O-1 y No O-1 aislados del medio ambiente son no toxigénicos (Morris, 1994; Nair y Takeda, 1994).

Tamplin y Colwell (1986) determinaron, en análisis de laboratorio, que la producción de toxina en cepas No O-1 se incrementaba cuando la salinidad era mayor de 30 ppm o cuando la disponibilidad de nutrientes era baja y la salinidad oscilaba entre 20 y 25 ppm.

La asociación de los vibrios con el zooplancton se debe a la producción bacteriana de dos enzimas; la mucinasa y la quitinasa, las cuales les confieren la posibilidad de adherirse y alimentarse al estar degradando la quitina de estos organismos. Esta información permitió establecer las condiciones fisicoquímicas ambientales para la proliferación bacteriana. Cuando las condiciones son favorables se producen florecimientos de microalgas, posteriormente ocurre el aumento de las poblaciones de zooplancton que, a su vez, serían el sustrato al cual se asocia una mayor concentración de bacterias (Huq *et al.*, 1983; Colwell y Spira, 1992; Epstein *et al.*, 1993).

Desde 1960, los investigadores en Bangladesh han estado estudiando la estacionalidad del cólera en esta área endémica y la han relacionado ampliamente con los florecimientos de microalgas en la zona costera (Epstein *et al.*, 1993), sin embargo, existen muchas dudas con respecto a éllo.

Balakrish *et al.* (1988), al estudiar la presencia de *V. cholerae* cultivable en aguas de Calcuta, una de las principales regiones endémicas, encontraron muy poca abundancia del *V. cholerae* O-1, y grandes proporciones de *V. cholerae* No O-1. Por lo que consideran la posibilidad del revertimiento del no toxigénico al productor de la toxina, cuando se dan las epidemias en el área. Posteriormente Huq *et al.* (1990), al realizar un estudio similar en otra área endémica (Matlab, Bangladesh), mediante la técnica de anticuerpos fluorescentes monoclonales, encuentran una abundancia notable de *V. cholerae* O-1 aún cuando no se detectó en medios de cultivo en placa. Esto comprueba la existencia de la forma latente del *V. cholerae* O-1 en el medio ambiente y explica la estacionalidad de la enfermedad cuando *V. cholerae* O-1 se revierte a un estado toxigénico al cambiar las condiciones ambientales. En el estado latente, el bacilo se encuentra con una tasa metabólica reducida y una morfología contraída, de tal manera que al cambiar las condiciones de desfavorables a favorables el *V. cholerae* se revierte a un estado cultivable e infeccioso (Garay *et al.*, 1985; Tamplin y Colwell, 1986; Brayton *et al.*, 1987; Colwell y Spira, 1992; Epstein *et al.*, 1993).

Los resultados de los estudios sobre la ocurrencia del *V. cholerae* O-1 en el ambiente acuático y su relación con los brotes esporádicos, sin una fuente aparente, pueden ser explicados por la teoría de Colwell y Spira (1992), que proponen una naturaleza autóctona de esta especie en el ambiente marino. Otra de las bases de esta teoría es que en los estudios de áreas impactadas por aguas residuales no se han encontrado correlaciones con respecto a la cantidad de coliformes encontradas y la presencia de *V. cholerae* (Singleton *et*

al., 1982 a; West y Lee., 1982; Xu *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1984; Garay *et al.*, 1985).

Uno de los estudios más cercanos a nuestra región fue llevado a cabo por Kaysner *et al.* (1987) en 24 estuarios de los Estados Unidos, que abarcó desde los estados de Washington (Oregon) y California, hasta Tijuana, B.C., México. En su mayoría encontraron *V. cholerae* No O-1, aunque también aislaron cepas O-1 del serotipo Inaba en la Bahía Morro, California, E.U. Esto señala la posibilidad de encontrarlo en las costas del Pacífico Mexicano.

I.2 OBJETIVOS:

1.- Determinar la presencia-ausencia de *Vibrio cholerae* O-1, cultivable y no cultivable, en diferentes habitats de la Bahía de Todos Santos.

2.- Determinar la concentración de bacterias totales, bacterias heterótrofas viables, bacterias tipo *Vibrio* y bacterias coliformes en los habitats estudiados, para situar las condiciones bacteriológicas en las que se detectará la presencia-ausencia de *Vibrio cholerae* O-1.

II. AREA DE ESTUDIO:

La Bahía de Todos Santos se encuentra en la costa Noroeste de la Península de Baja California entre los paralelos 31°43' y 31°54' Norte y entre los meridianos 116°36' y 116°49' Oeste, con una superficie aproximada de 200 Km². Se comunica con el océano abierto por, prácticamente, dos entradas limitadas al Oeste por las islas de Todos Santos. La entrada al Noroeste es de 12 Km de ancho y tiene profundidades menores de 50 m con algunos bajos de 6m a la mitad de la sección. La entrada Suroeste es de 6 Km de ancho y presenta pendientes pronunciadas en las proximidades de las islas. A 1 Km de distancia de la isla Sur, en dirección a Punta Banda, la profundidad alcanza los 150 m y a 2 Km es de aproximadamente 400 m en el fondo del cañón submarino (Argote-Espinoza *et al.*, 1991).

Los vientos predominantes, a lo largo de la costa, provienen del Noroeste a una velocidad de ocho nudos, soplando aproximadamente en esa dirección ocho meses del año. Los vientos secundarios provienen del oeste y Norte con velocidades variables. Durante el invierno los vientos del Sureste están acompañados constantemente de lluvias torrenciales. La precipitación promedio anual para esta región es de 150 mm, siendo los meses de invierno los de mayor precipitación (Jiménez-González, 1989).

El patrón de circulación dentro de la Bahía se caracteriza por una circulación superficial provocada por los vientos Noroeste y Norte, estos vientos inducen una corriente dentro de la Bahía a lo largo de las costas de Punta Banda y Punta San Miguel. Cuando los vientos del Noroeste son de alta

intensidad, desplazan las corrientes en dos direcciones principales dentro de la Bahía. Una de ellas entra por el Norte a través de Punta San Miguel y fluye a lo largo de la costa Norte y arriba al estero, donde se desvía hacia mar adentro. En esta zona es donde la mayor parte del drenaje urbano e industrial es descargado. La otra corriente entra a través de Punta Banda, en la parte Sur de la Bahía, y fluye a lo largo de Punta Banda hasta el estero. Esta zona se caracteriza por tener baja contaminación de fuentes puntuales. En la boca del estero ambas corrientes convergen y desarrollan un flujo hacia adentro de la Bahía, en dirección a las Islas de Todos Santos. Cuando los vientos del Este son de baja intensidad, el flujo es en la dirección opuesta a la de los vientos del Noroeste y Norte (Argote *et al.*, 1992; Lizárraga-Partida y Vargas-Cárdenas, en prensa).

III. METODOLOGIA:

Para el estudio de *Vibrio cholerae* O1 en la Bahía de Todos Santos se asignaron cuatro estaciones de muestreo: la primera estación se localizó dentro de la rada portuaria, zona afectada por embarcaciones de carga y descarga, barcos turísticos, influencia del arroyo de Ensenada y el arroyo El Gallo. La segunda estación se localizó frente al arroyo El gallo, en este arroyo son descargados los desechos de la industria pesquera, así como también las aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas negras de la Ciudad de Ensenada. La tercera estación se localizó frente a la boca del estero Punta Banda, por lo que esta zona estará impactada principalmente por las aguas del estero y tendrá una escasa influencia del arroyo El Gallo. La estación cuatro se localizó en la parte sur de la Bahía y se caracterizó por no presentar aportes de contaminación por fuentes puntuales. Esta última, es además una zona donde se realizan cultivos del mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Fig. 1).

Los muestreos se llevaron a cabo bimensualmente durante los periodos de invierno-verano de 1995, abarcando las estaciones de lluvia y estiaje.

La presencia de *Vibrio cholerae* O-1 se analizó en muestras de agua, sedimento, plancton y mejillones. En las estaciones 1, 2 y 3 se muestreó sólo en los tres primeros habitats, ya que no se cultivan mejillones en estas áreas.

III.1 COLECCION DE MUESTRAS:

Para el análisis de agua se colectó agua superficial en recipientes de vidrio de 4 lts de capacidad, previamente esterilizados.

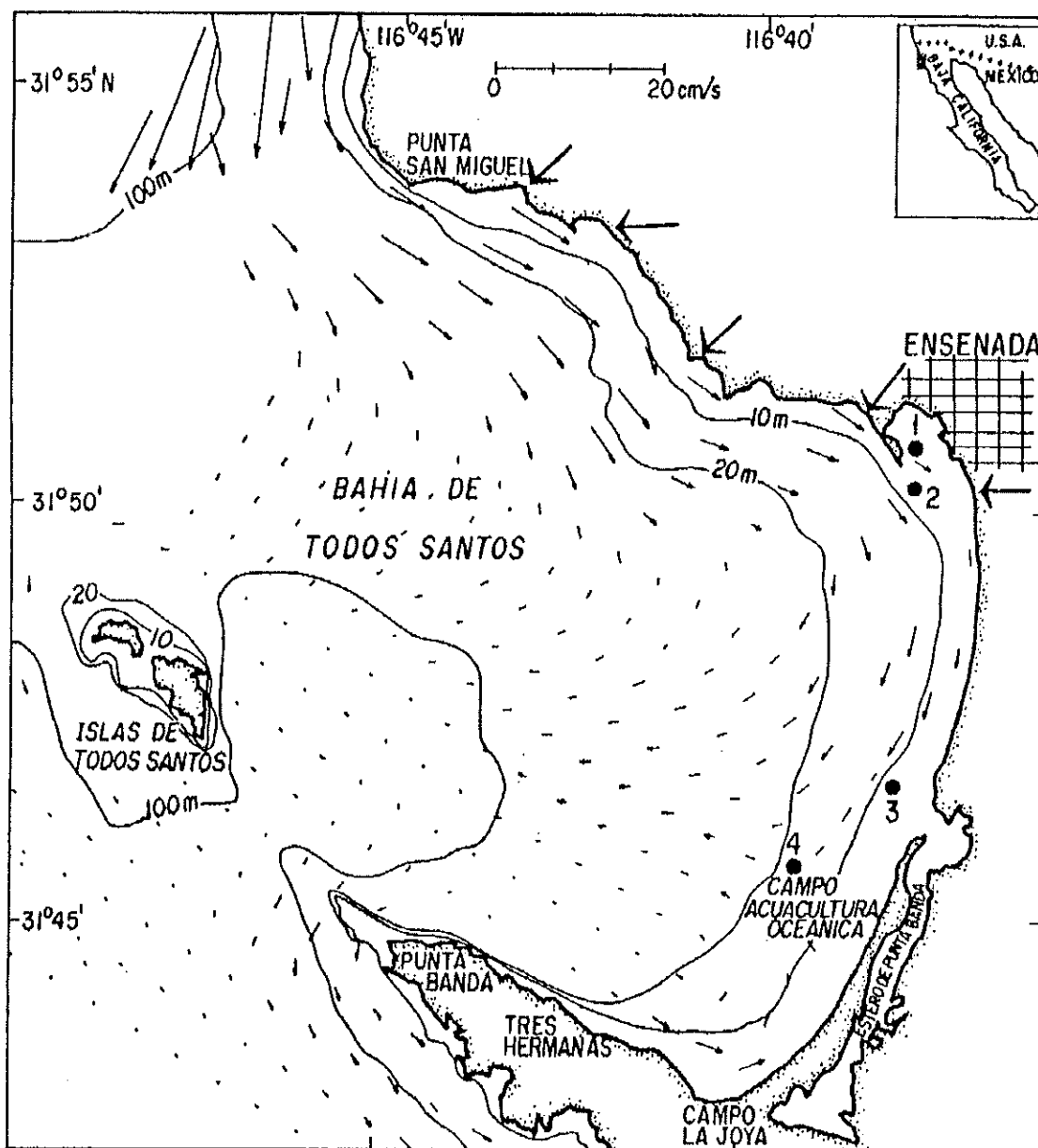


Fig. 1. Localización geográfica del área de estudio y estaciones de muestreo, en la Bahía de Todos Santos, B.C. (Circulación de agua con vientos del Noroeste, Argote *et al.*, 1991)

El sedimento se colectó con una draga Van Been, para el análisis se tomaron los primeros diez centímetros y se depositaron en frascos de vidrio estériles, en la estación 4 el muestreo fue efectuado por buceo.

La colecta de muestras de plancton se realizó con una red cilindro cónica de 0.30 m de diámetro por un metro de largo y 73 μm de luz de malla, llevándose a cabo arrastres superficiales con una duración de diez minutos en cada estación de muestreo.

Para la determinación de *V. cholerae* O-1 en mejillón se colectaron de 1 a 3 docenas de organismos, dependiendo de su tamaño, en el área de cultivo de Acuicultura Océánica, localizado al sur de la Bahía. Se colocaron en bolsas de plástico para su transporte.

Todas las muestras, debidamente etiquetadas, se transportaron dentro de una hielera a temperatura ambiental, para posteriormente procesarse en el laboratorio, en un tiempo no mayor de 6 hrs desde su recolección.

III.2 DETECCIÓN DE *Vibrio cholerae* O-1

III.2.1 CULTIVABLE

Para la detección de *V. cholerae* O-1 cultivable en mejillón se llevó a cabo con base a la técnica descrita por FDA/BAM (1992), incubando a 37 y 42°C en agua de peptona alcalina (Fig 2).

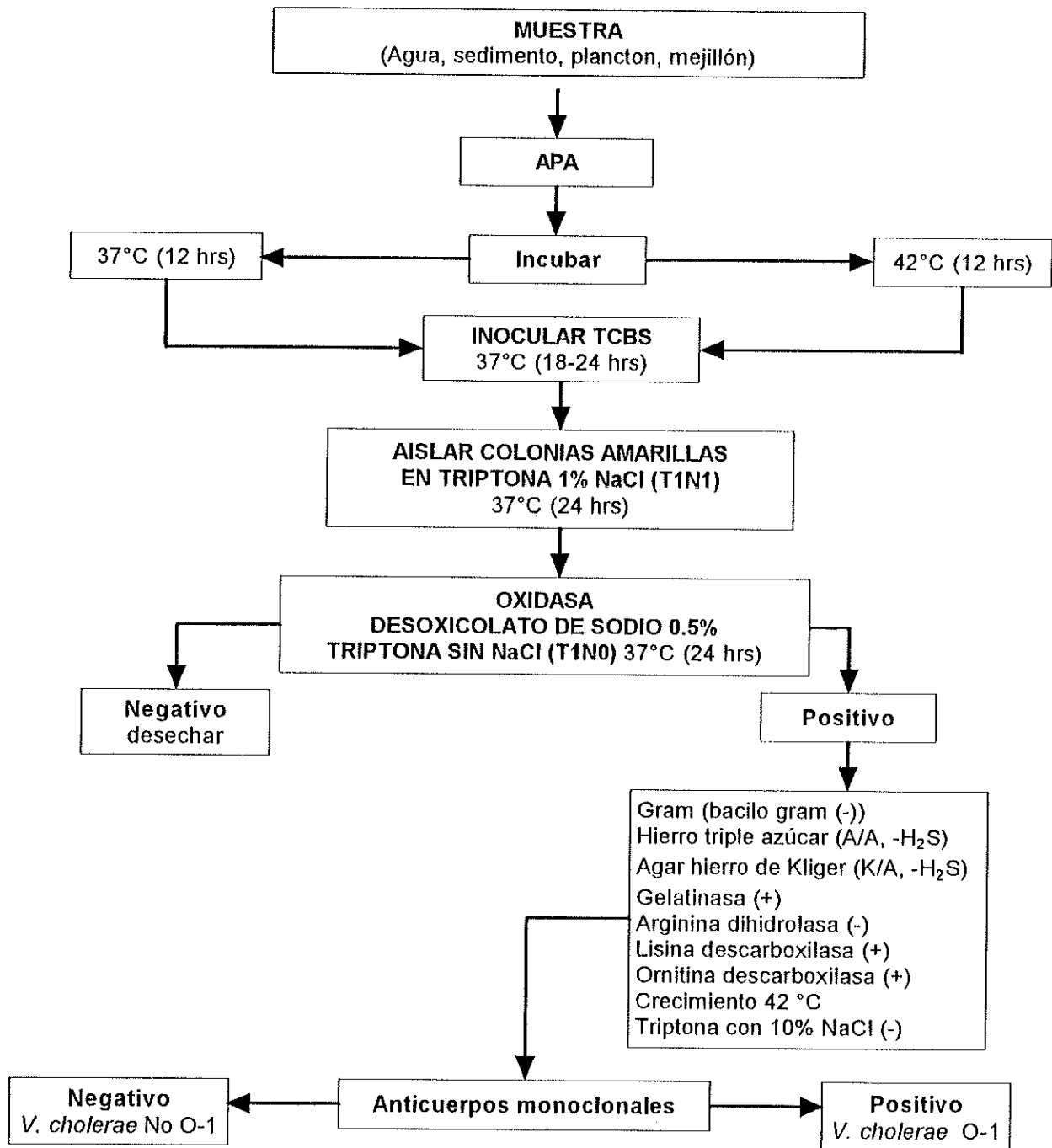


Fig. 2. Técnica FDA/BAM modificada para el aislamiento de *Vibrio cholerae* O-1

El procedimiento para las muestras de agua consistió en filtrar tres litros de agua por un filtro estéril de 0.45 µm de tamaño de poro, posteriormente este filtro fue colocado en 225 ml de agua de peptona alcalina estéril, para continuar con el procedimiento.

El sedimento fue analizado incubando 25 gr en 225 ml de agua de peptona alcalina estéril para continuar la técnica anterior.

El plancton fue homogenizado un minuto en una licuadora a máxima velocidad, posteriormente se tomaron 5 ml y se colocaron en 45 ml de agua de peptona alcalina, para continuar la técnica ya antes mencionada.

III.2.2 PRUEBAS DE IDENTIFICACION

A las cepas que resultaron positivas al desoxicolato de sodio 0.5 %, oxidasa positivas, con crecimiento en T1N0, se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

- a) Tinción gram (bacilo gram negativo)
- b) Hierro triple azúcar (TSI, Difco, 1984)
- c) Agar hierro de Kligler (KIA, Difco, 1984).
- d) Gelatinasa.
- e) Arginina dihidrolasa (BAM, 1992).
- f) Lisina descarboxilasa, (BAM, 1992).
- g) Ornitina descarboxilasa (BAM, 1992)
- h) Crecimiento a 42°C

I) No crecimiento en triptona 10% NaCl

Con las cepas que fueron positivas a las pruebas de lisina, ornitina y gelatinasa, no productoras de ácido sulfhídrico en agar hierro de Kliger y Hierro triple azúcar y negativas a la arginina dihidrolasa se llevó a cabo la serología con anticuerpos fluorescentes específica para *V. cholerae* O-1.

III.2.3 NO CULTIVABLE

Para la determinación de *V. cholerae* O-1 no cultivable se llevó a cabo la técnica directa de anticuerpos fluorescentes específica para el antígeno "A" del lipopolisácarido de *V. cholerae* O-1 (DFA) descrita por Xu *et al.* (1982)

En el plancton y mejillón se tomó muestra del homogenado. En el sedimento se tomó muestra del agua sobrenadante. Esta técnica no se llevó a cabo en las muestras de agua.

III.3 CUANTIFICACION DE OTROS GRUPOS DE BACTERIAS

III.3.1 COLIFORMES TOTALES Y FECALES

Para el estudio de contaminación orgánica se determinó el número de coliformes totales y fecales por la técnica del número más probable (NMP). Se usó el método estándar de dilución geométrica en cinco tubos con campana de fermentación tipo Durham, de acuerdo con los métodos estándares para análisis de agua y agua residual (APHA, 1989), en muestras de agua superficial, sedimento y mejillón (Apéndice 1).

III.3.2 HETEROTROFAS VIABLES

La cuantificación de heterótrofos totales viables en muestras de agua, sedimento y mejillón, se llevó a cabo en cultivos en placa, por duplicado, con el medio Zobell. Se incubaron a 30°C por 24 y 48 hrs (Vargas-Cárdenas y Lizárraga-Partida, 1993) (Apéndice 1).

III.3.3 VIBRIOS TOTALES

El número total de vibrios en las muestras de agua, sedimento y mejillón se cuantificó también en cultivos en placa, por duplicado, con el medio específico de Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS). Se incubaron a 30°C durante 24 y 48 hrs (Apendice 1).

III.3.4 BACTERIAS TOTALES

La cuantificación de Bacterias totales se realizó, por duplicado, mediante la técnica de tinción con DAPI descrita por Porter y Feig (1980), en 20 ml de agua previamente fijados con el 2% de formaldehído.

III.4 PARAMETROS FISICOS

En el agua superficial de cada una de las estaciones de muestreo se registró la temperatura (°C), por medio de un termómetro de precisión 0.1 grado centígrado, certificado y calibrado con respecto a un termómetro de referencia.

IV. RESULTADOS

V. VIBRIO CHOLERAE O-1

En ningún tipo de muestra durante el período estudiado, se encontró *Vibrio cholerae* O-1 cultivable y no cultivable (latente), sin embargo, *V. cholerae* No O-1 fue aislado en 44% de muestras de plancton, 37% en las de agua y 19% en las de sedimento. *V. cholerae* No O-1 nunca fue detectado en muestras de mejillón.

Durante el periodo de estudio, enero-agosto de 1995, se analizaron un total de 52 muestras, de las cuales el 28.8% fueron positivas con respecto a la presencia de *V. cholerae* No O-1.

El número de cepas características de *V. cholerae* No O-1 se fue incrementando conforme al tiempo, 4 en el mes de enero, 6 en marzo, 7 en mayo y 26 en agosto (Tabla 1, Fig. 3a). Agosto fue el único mes en el cual se tuvieron aislamientos al incubar a una temperatura de 42°C, con un 92% a esta temperatura, 71% en plancton y 29% en sedimento.

La estación 1 registró el mayor número de *V. cholerae* No O-1 (18), aislado del agua y del plancton, además fue la estación donde se registró la presencia de *V. cholerae* No O-1 durante todo el periodo del estudio (enero, marzo, mayo y agosto). En las estaciones 2 y 3 se aisló *V. cholerae* No O-1 del agua, sedimento y plancton. La estación 4 tuvo el menor número de *V. cholerae* No O-1 (2), el cual se aisló de agua y plancton (Tabla 1 y Fig 3b).

Tabla I. Aislamiento de *Vibrio cholerae* No O-1 en los diferentes hábitats estudiados, durante enero-agosto de 1995, en la Bahía de Todos Santos, B.C.

Mes	#Est.	APA Temperatura de incubación (°C)	Tipo de muestra	No. de cepas características
Enero	1	37	Agua	3
Enero	3	37	Agua	1
Marzo	1	37	Agua	2
Marzo	2	37	Plancton	1
Marzo	3	37	Sedimento	1
Marzo	3	37	Agua	1
Marzo	4	37	Agua	1
Mayo	1	37	Agua	6
Mayo	2	37	Plancton	1
Agosto	1	42	Plancton	8
Agosto	2	37	Agua	1
Agosto	2	42	Sedimento	7
Agosto	3	37	Agua	1
Agosto	3	42	Plancton	8
Agosto	4	42	Plancton	1

V.1 DIVISION POR AREAS:

Considerando los valores de concentración bacteriana obtenidos en este estudio y a los resultados de coliformes de otros investigadores en la misma área (Orozco-Borbón y Gutiérrez-Galindo, 1983; Sañudo-Wilhelmy, 1984), se procedió a promediar entre sí (\pm desv. std.) los valores de concentración bacteriana de las estaciones 1 y 2, así como de las estaciones 3 y 4, para cada tipo de muestra. Una vez realizado esto, las dos primeras estaciones se consideraron como área uno y las dos siguientes como área dos.

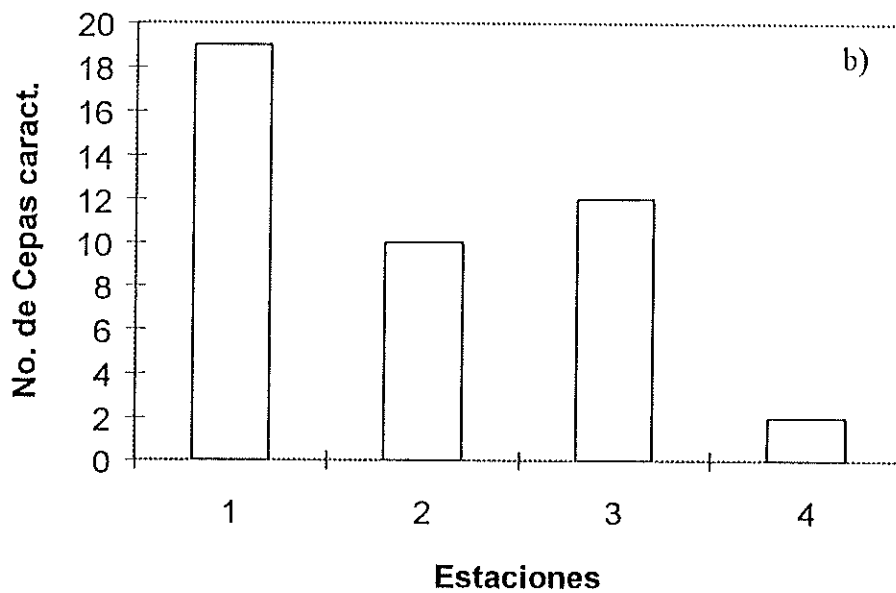
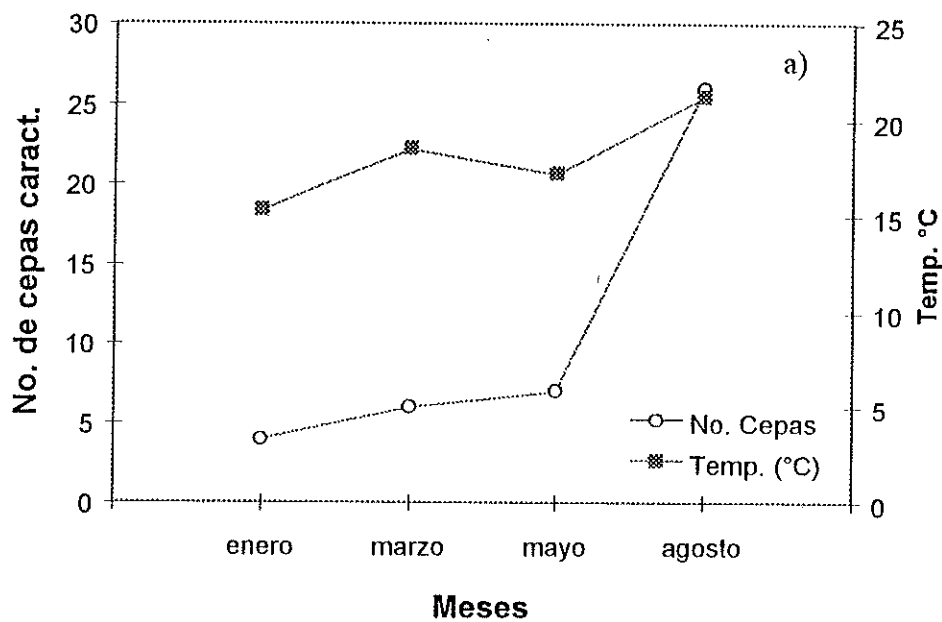


Fig. 3 Número de cepas características de *Vibrio cholerae* no O-1 durante enero-agosto de 1995 en la Bahía de Todos Santos, B.C. a) mensual y b) por estaciones

V.2 ANALISIS DE AGUA

V.2.1 BACTERIAS HETEROTROFAS VIABLES

La concentración promedio mensual de bacterias heterótrofas viables (BHV ml⁻¹) en el área uno y el área dos, presentó un aumento conforme al tiempo. El valor mínimo se presentó en enero (1.75×10^4 y 5.75×10^3 BHV ml⁻¹, respectivamente) y el máximo en agosto (5.75×10^4 y 2.50×10^4 BHV ml⁻¹, respectivamente) (Fig. 4a). Durante todo el periodo del estudio la concentración fue mayor en el área uno. Por otro lado, se observó un gradiente de concentración, de mayor a menor, de la estación 1 a la estación 4 (Fig. 4b).

V.2.2 BACTERIAS TOTALES

La concentración promedio mensual de bacterias totales (BT ml⁻¹) en las dos áreas fue similar, con un promedio de 3.03×10^6 y 3.04×10^6 BT ml⁻¹, respectivamente. Durante el mes de mayo la concentración de bacterias se incrementó, con un promedio de 6.27×10^6 y 7.79×10^6 BT ml⁻¹, respectivamente (Fig. 5a). En el mes de agosto la concentración de bacterias disminuyó en ambas áreas, con un valor promedio de 2.58×10^6 y 1.99×10^6 BT ml⁻¹, respectivamente.

La concentración promedio por estaciones de muestreo fue similar para las cuatro estaciones de muestreo, con un promedio general de 6.06×10^6 BT ml⁻¹ (Fig. 5b).

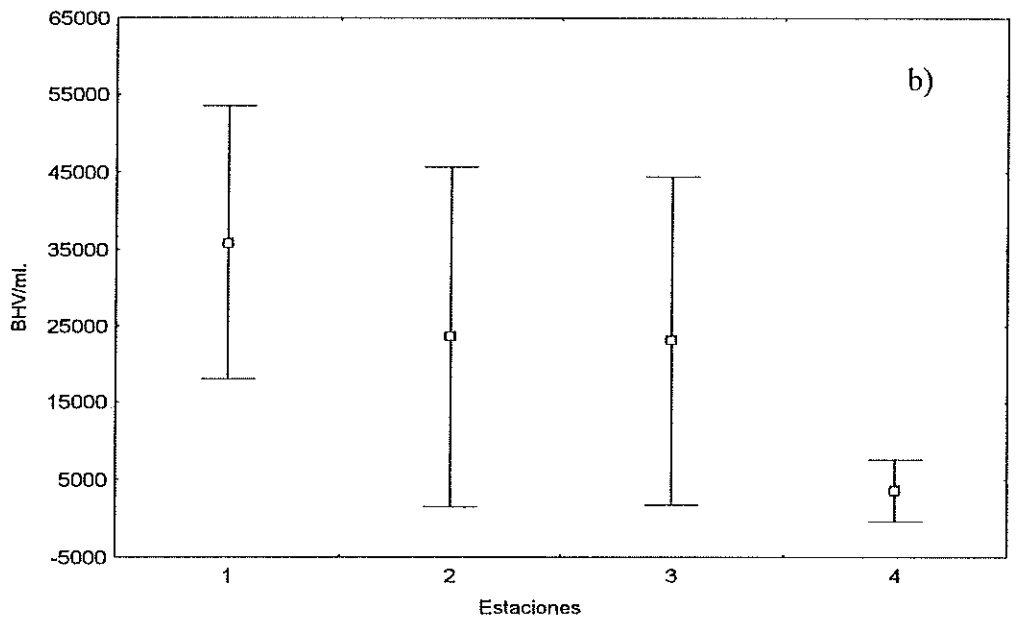
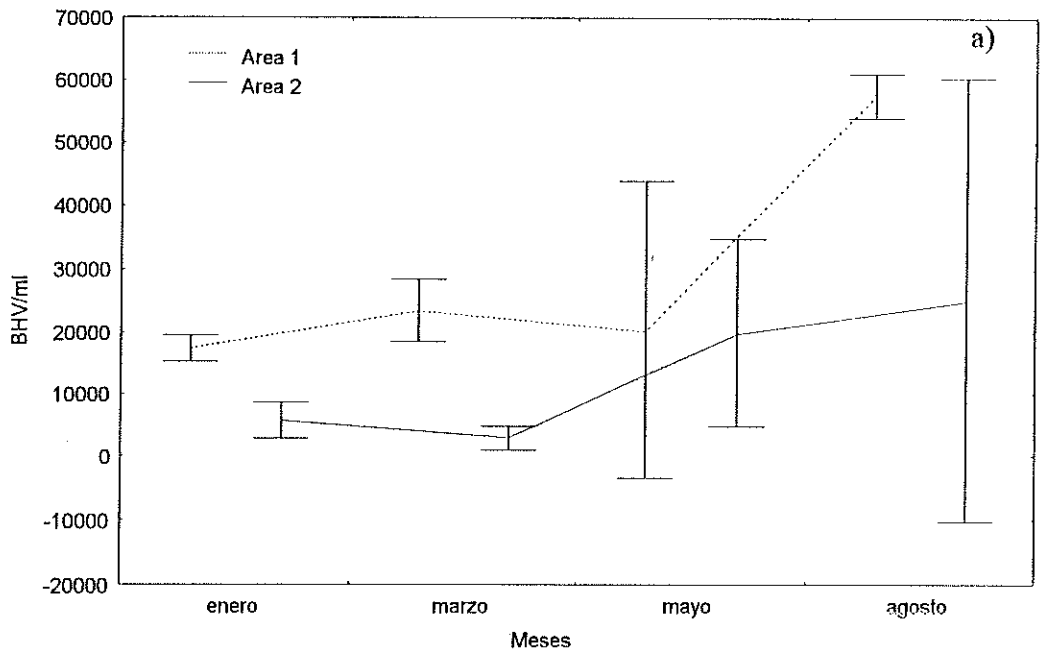


Fig. 4. Concentración promedio de Bacterias Heterótrofas Viables en agua superficial a) mensual, b) por estaciones de muestreo.

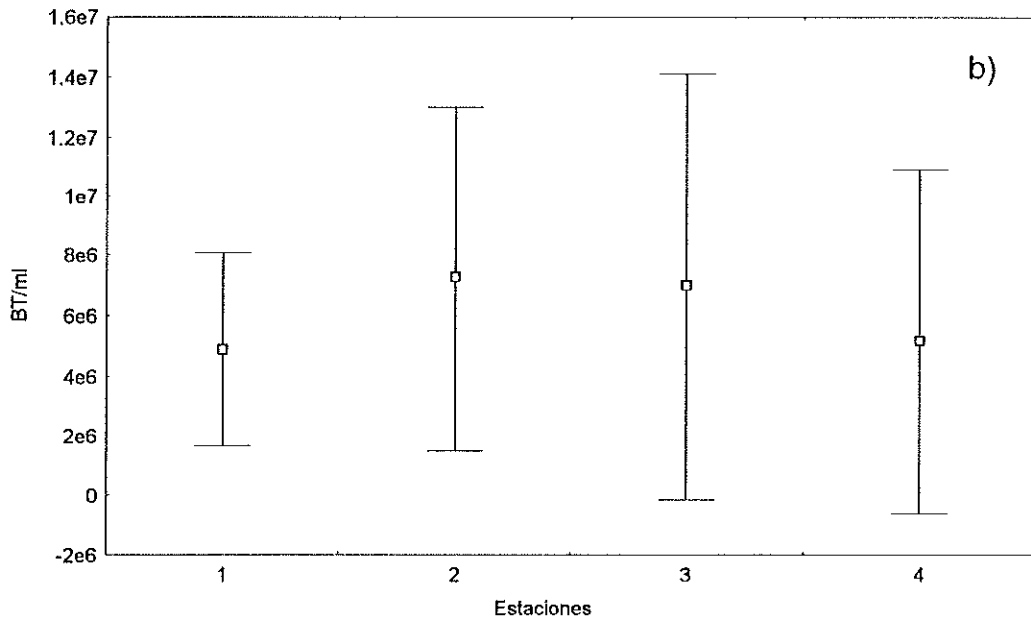
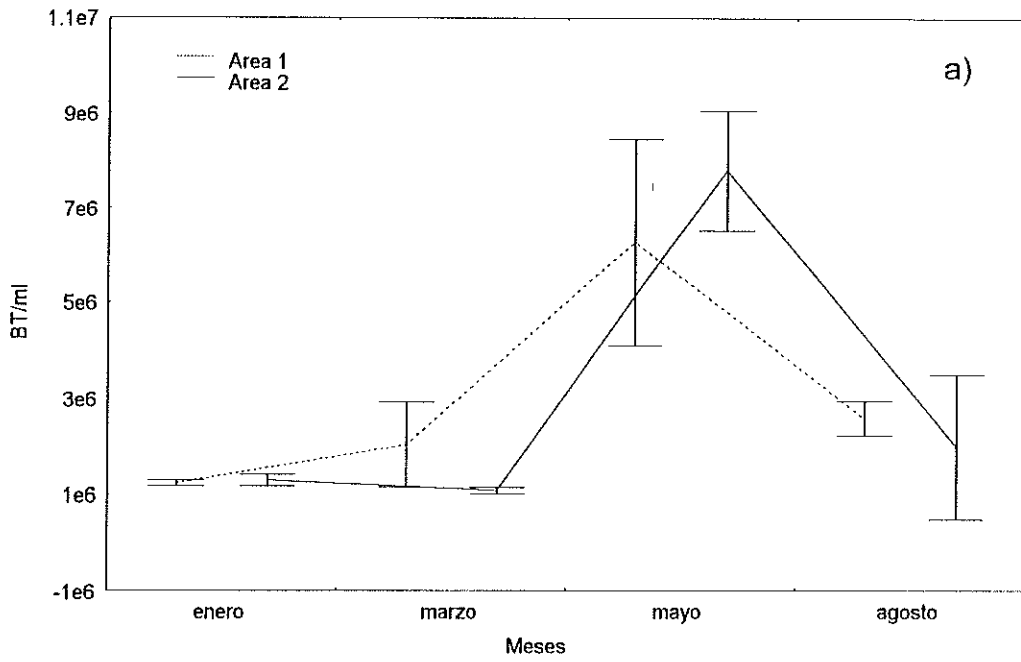


Fig. 5 Concentración promedio de Bacterias Totales en agua superficial
a) mensual , b) por estaciones de muestreo.

V.2.3 VIBRIOS TOTALES

La concentración promedio mensual de Vibrios totales (VT ml⁻¹) en el área uno, fluctuó durante todo el periodo del estudio, sin un comportamiento específico. Mientras que, en el área dos se observó un incremento hacia el mes de agosto (Fig. 6a). En la estación 4 el promedio fue bajo (17 VT ml⁻¹) y presentó poca variabilidad, en contraste con las otras estaciones, posiblemente debido al escaso aporte de materia orgánica en el área (Fig. 6b).

V.2.4 COLIFORMES TOTALES

Durante todo el periodo de estudio el número de coliformes totales (CT 100 ml⁻¹) en agua superficial fue superior en el área uno. En los meses de mayo y agosto la concentración de coliformes totales disminuyó en el área uno, mientras que el área dos se mantuvo igual, con valores muy bajos de casi 0 CT 100 ml⁻¹ (Fig. 7a).

La concentración de CT 100 ml⁻¹ por estaciones de muestreo fue mayor en la estación uno, observándose un decremento hacia las estaciones 3 y 4 (Fig. 7b).

V.2.5 COLIFORMES FECALES

Los valores de Coliformes fecales (CF 100ml⁻¹) en agua superficial presentaron una tendencia similar que las Coliformes totales. El área uno presentó las concentraciones más altas durante la mayor parte de los meses (Fig 8a). Así mismo, la concentración de CF 100ml⁻¹ fue mayor en la estación 1

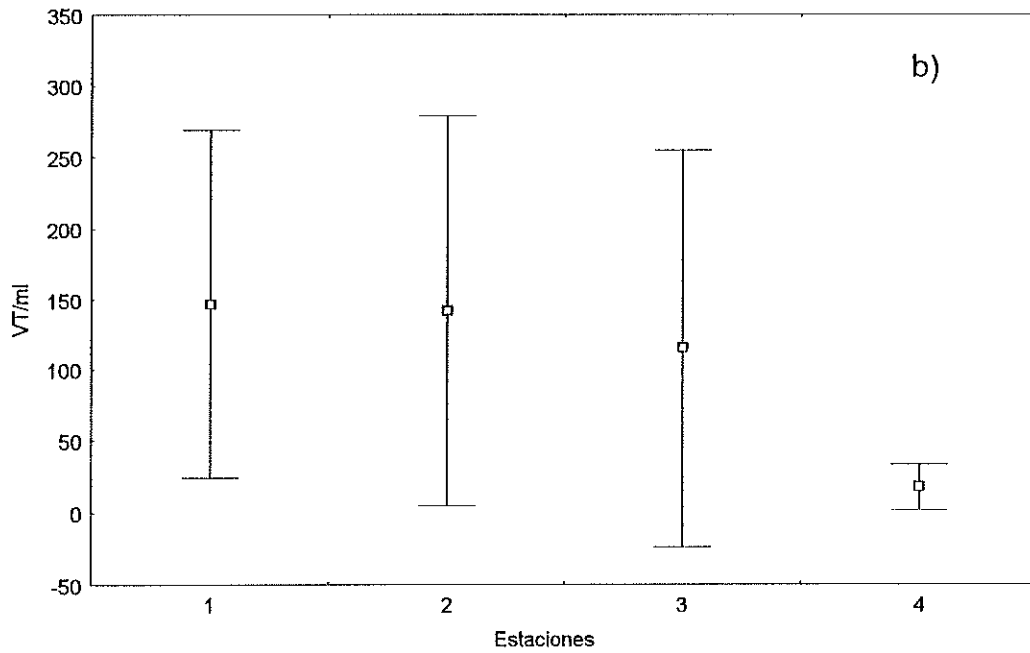
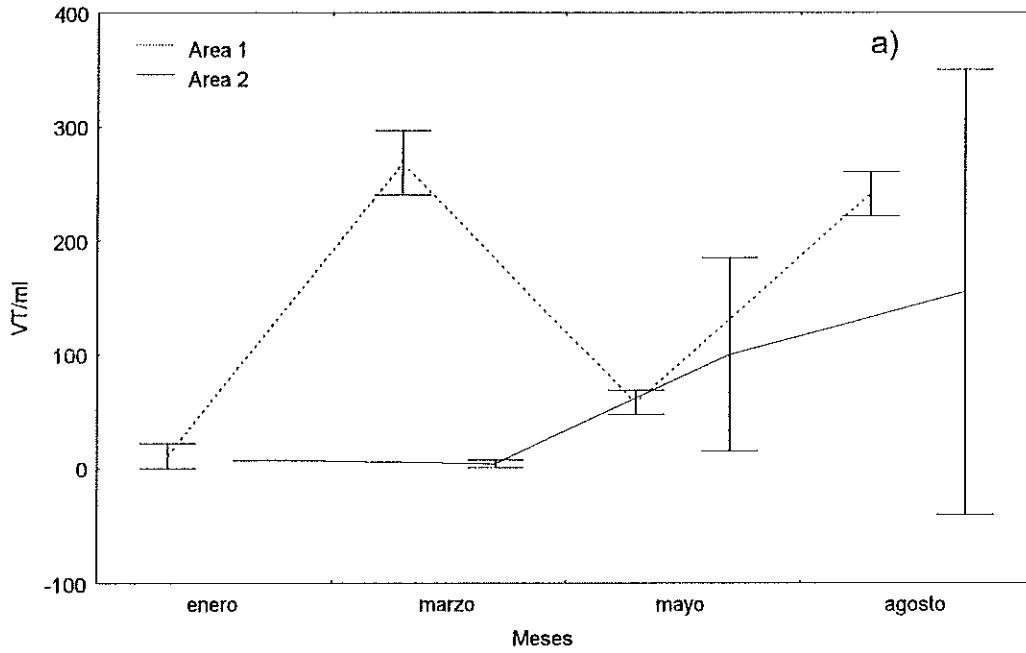


Fig. 6 Concentración promedio de Vibrios Totales en agua superficial
 a) mensual , b) por estaciones de muestreo.

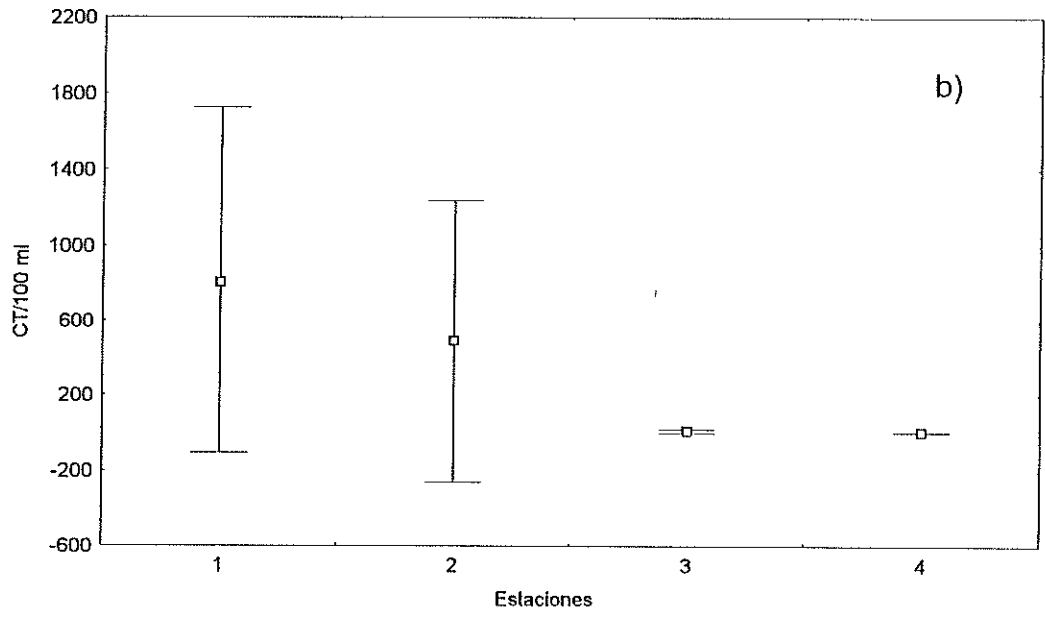
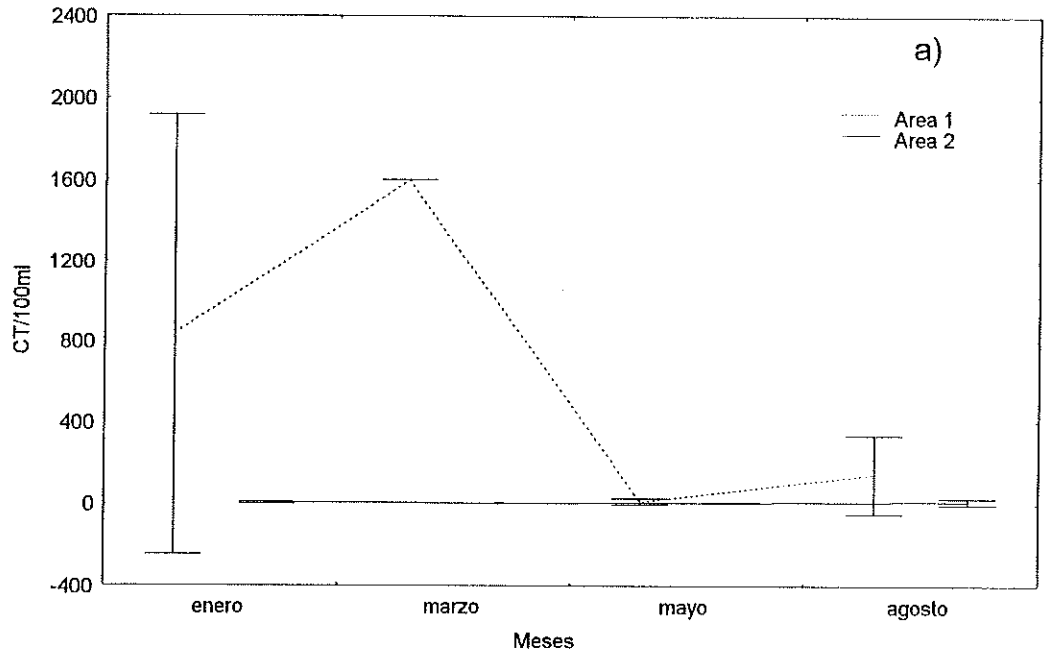


Fig. 7 Número más probable de Coliformes Totales en agua superficial
 a) mensual, b) por estaciones de muestreo.

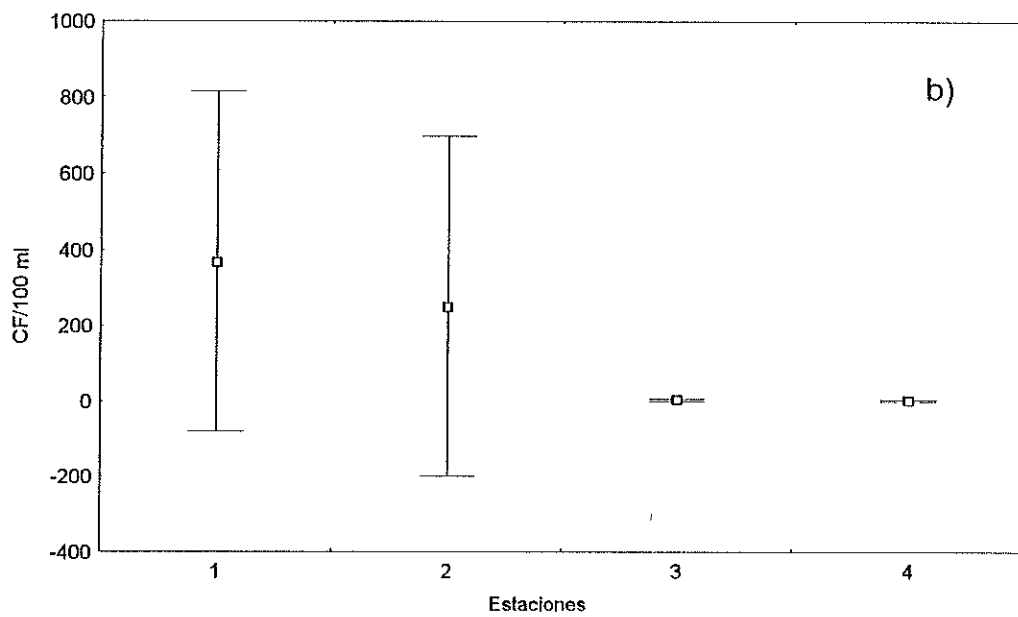
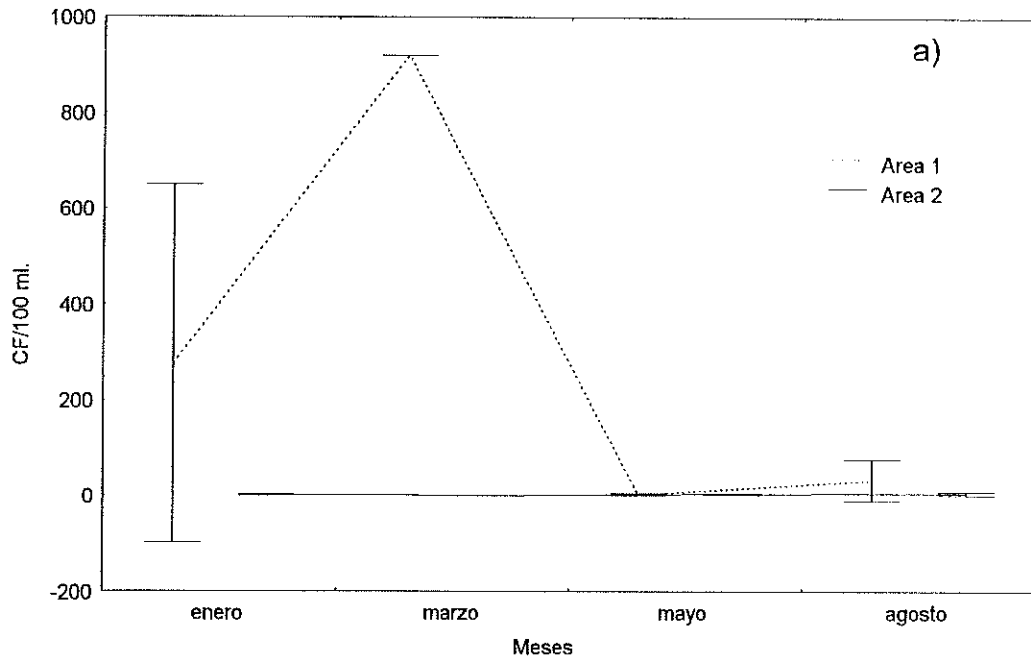


Fig. 8 Número más probable de Coliformes Fecales en agua superficial
 a) mensual, b) por estaciones de muestreo.

y se observa un decremento en la concentración hacia la estación cuatro (Fig 8b).

V.3 SEDIMENTO

V.4 BACTERIAS HETEROTROFAS VIABLES

Las bacterias presentes en el sedimento fueron cuantificadas a partir de marzo.

La concentración de bacterias heterótrofas viables (BHV gr^{-1}) en sedimento fue, de uno a dos órdenes de magnitud, mayor al de las bacterias heterótrofas viables presentes en el agua superficial.

En general, en la fig. 9a se observa que, la concentración promedio mensual de BHV gr^{-1} en el área uno fue decreciendo conforme al tiempo mientras que en el área dos fue variable. La concentración promedio fue siempre mayor en el área uno, con un promedio de 1.69×10^6 BHV gr^{-1} , mientras que en el área dos tuvo un promedio de 2.04×10^5 BHV gr^{-1} . En cuanto a las estaciones de muestreo la concentración de BHV fue mayor en la estación 1 un con valor promedio de 3.06×10^6 BHV gr^{-1} , mientras que en las estaciones 2, 3 y 4 fueron similares entre sí, con un valor promedio de 1.94×10^5 BHV gr^{-1} (Fig. 9b).

V.4.1 VIBRIOS TOTALES

La concentración promedio mensual de VT gr^{-1} en el área uno fue un orden de magnitud mayor a la del área dos ($14,846$ VT gr^{-1} , $1,995$ VT gr^{-1} , respectivamente) (Fig. 10a).

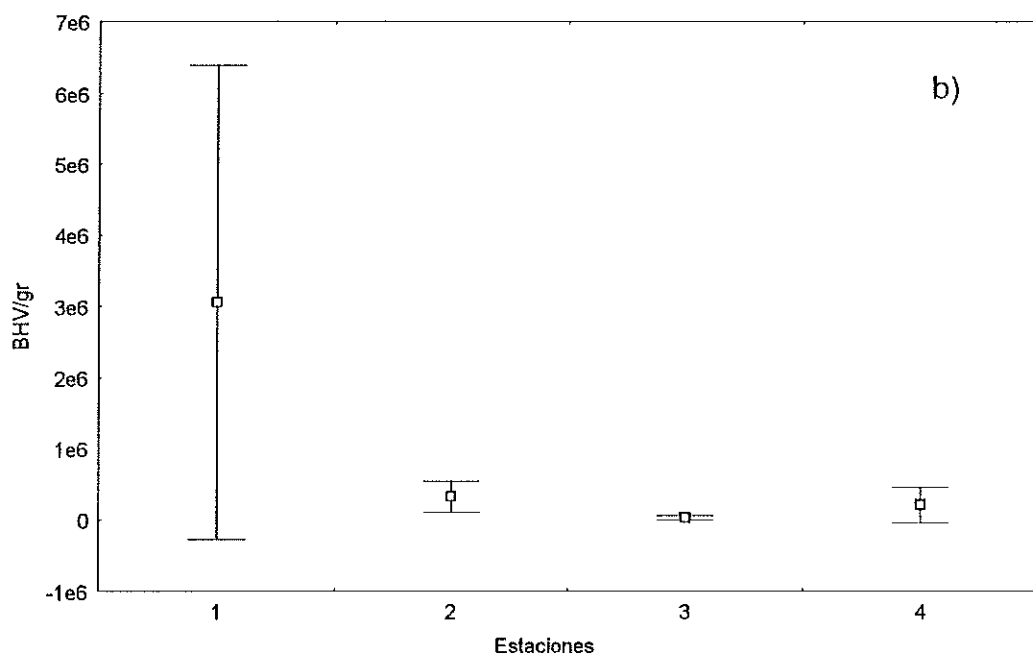
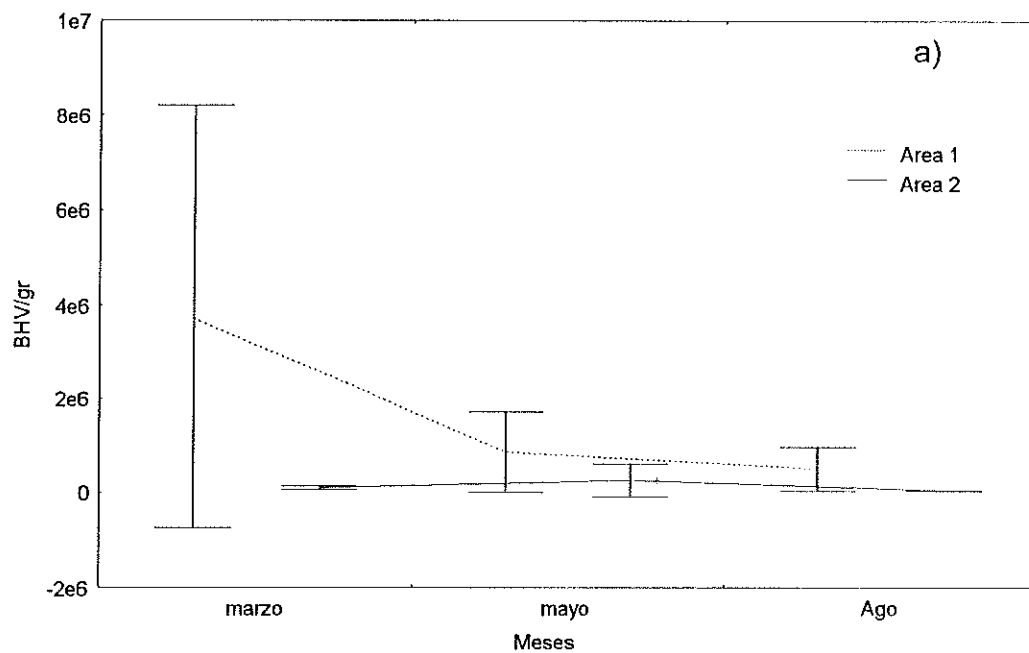


Fig. 9 Concentración promedio de Bacterias Heterótrofas Viables en sedimento. a) mensual , b) por estaciones de muestreo.

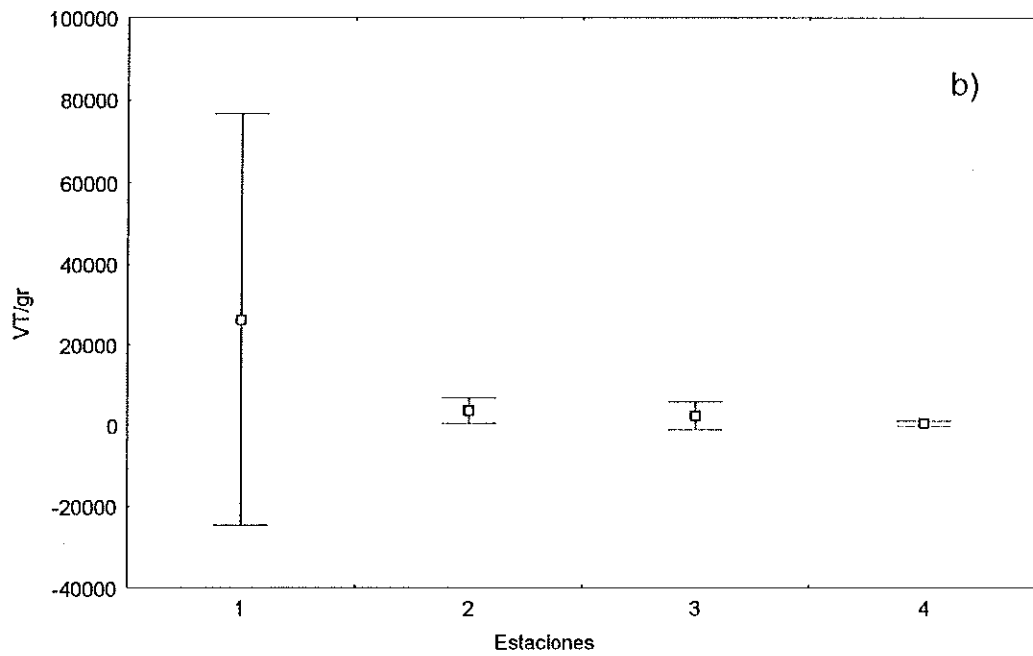
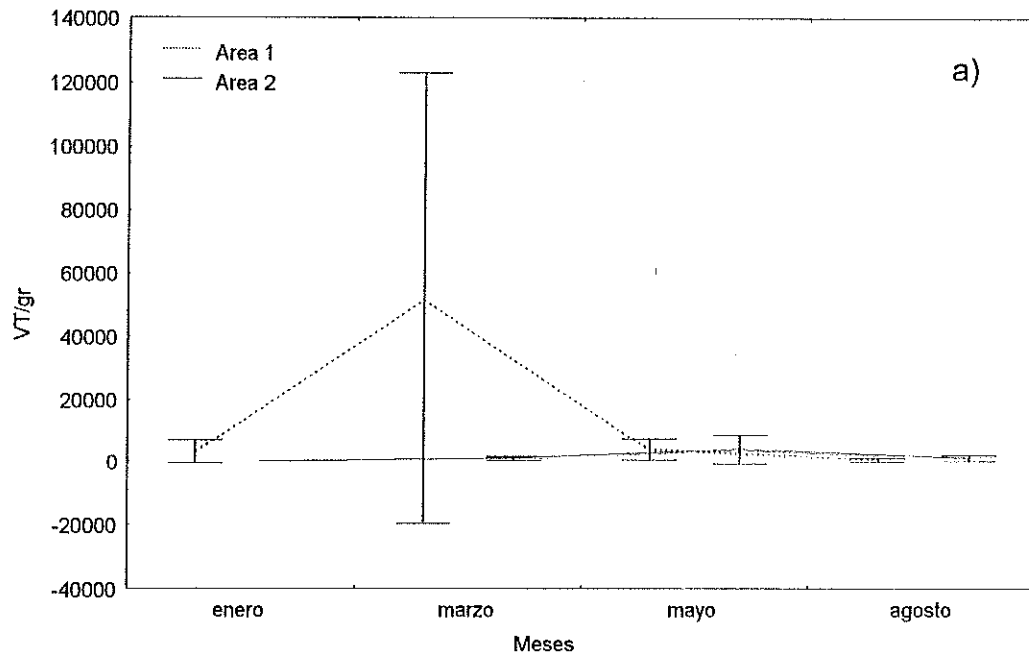


Fig. 10 Concentración promedio de Vibrios Totales en sedimento
 a) mensual , b) por estaciones de muestreo.

En relación con las estaciones de muestreo, la concentración promedio fue mayor en la estación 1 (26,025 VT gr⁻¹) y similar en las estaciones 2 y 3 (3,668 y 3,215 VT gr⁻¹, respectivamente), mientras que la estación 4 fue la de menor concentración (776 VT gr⁻¹) (Fig. 10b).

Los Vibrios presentes en el sedimento fueron, en términos generales, de 1 a 2 órdenes de magnitud mayor que los encontrados en el agua, en un rango de 50 - 102,000 VT gr⁻¹.

V.4.2 COLIFORMES TOTALES

La concentración promedio mensual de coliformes totales (CT 100 gr⁻¹) en el sedimento fue mayor en el área uno, con un promedio de 6,813 CT 100 gr⁻¹. Mientras que, en el área dos se mantuvo por debajo de 150 CT 100 gr⁻¹, con un promedio de 51 CT 100 gr⁻¹ (Fig. 11a). La concentración promedio por estaciones de muestreo presentó un gradiente a partir de la estación uno, los valores más altos se presentaron en las estaciones 1 y 2 (8,344 y 5,282 CT 100 gr⁻¹, respectivamente), mientras que los valores más bajos fueron los de las estaciones 3 y 4 (111 y 18 CT 100 gr⁻¹, respectivamente) (Fig. 11b).

V.4.3 COLIFORMES FECALES

Los valores de coliformes fecales en el sedimento presentaron una tendencia similar a la de las coliformes totales (Fig. 12a), Así mismo, la concentración promedio por estaciones de muestreo presentó un gradiente a

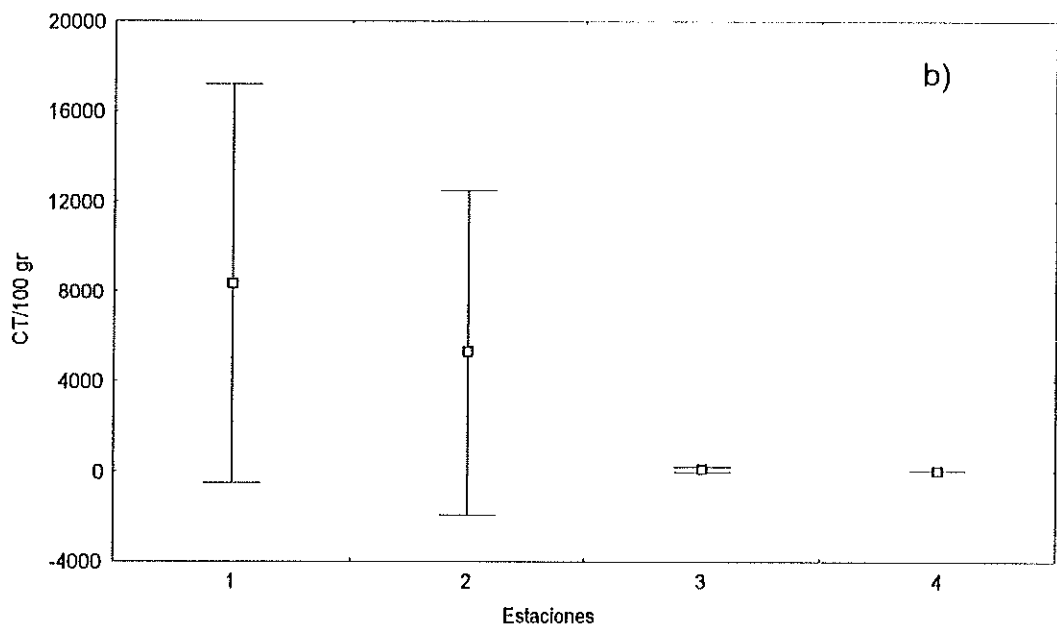
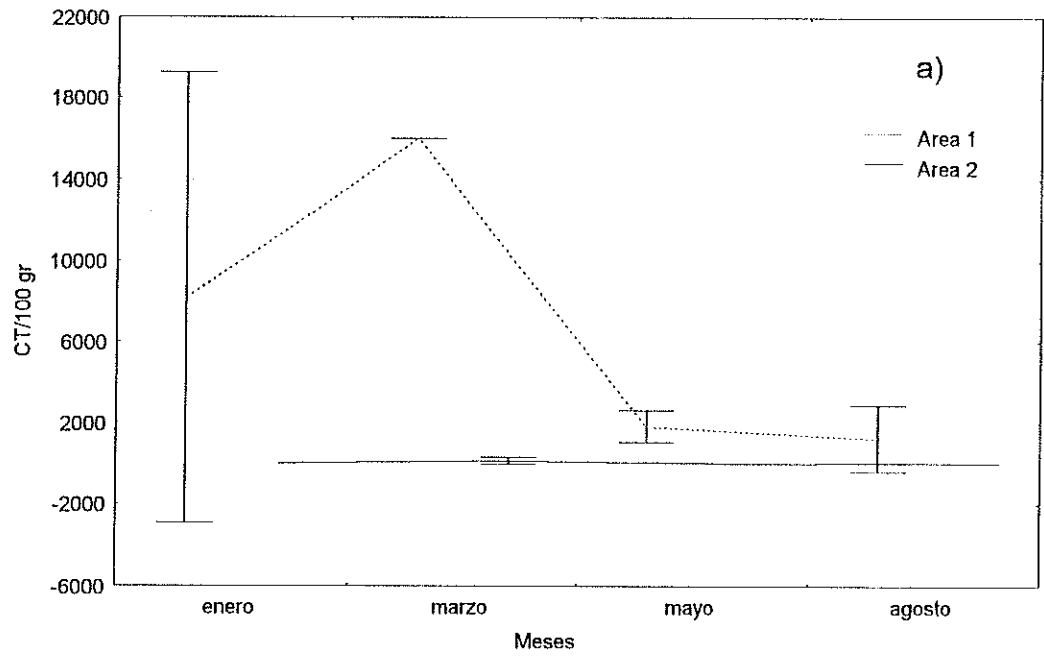


Fig. 11 Número más probable de Coliformes Totales en sedimento
 a) mensual, b) por estaciones de muestreo.

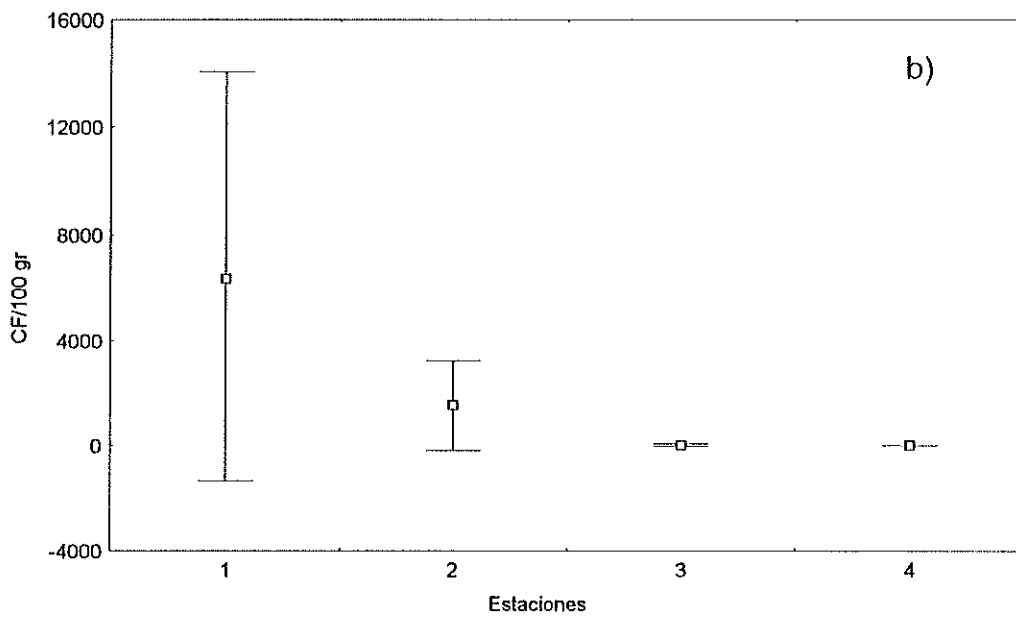
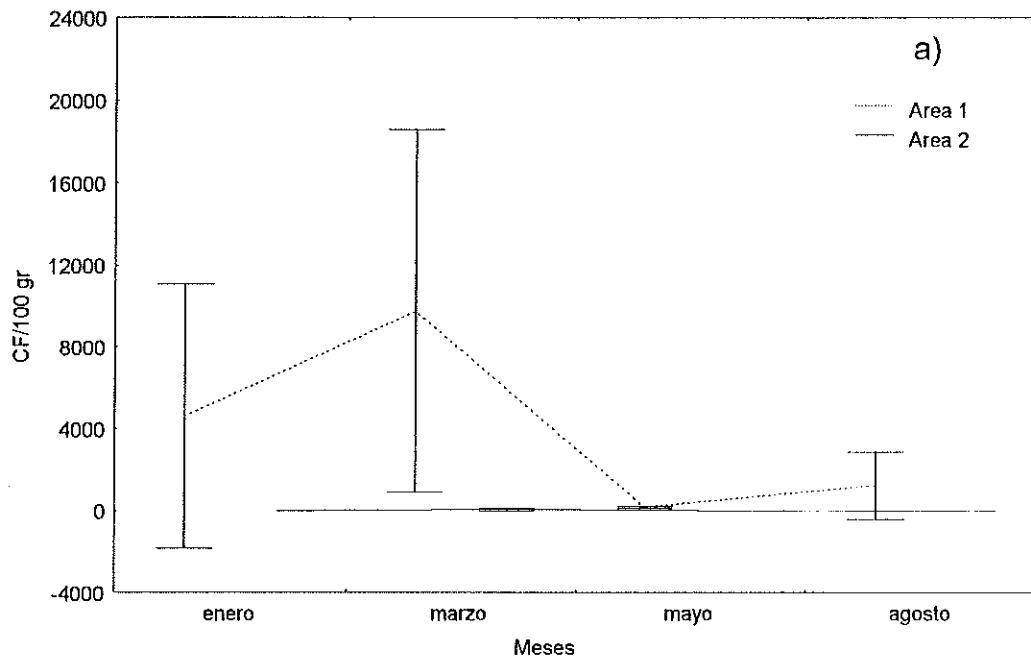


Fig. 12 Número más probable de Coliformes Fecales en sedimento
 a) mensual, b) por estaciones de muestreo.

partir de la estación uno a la estación cuatro, en esta última no se registraron CF durante todo el periodo del estudio (Fig. 12b).

V.5 MEJILLON

V.5.1 BACTERIAS HETEROTROFAS VIABLES Y VIBRIOS TOTALES

En la figura 13 se observa que el comportamiento de BHV y VT en general fue similar. Con un incremento en el mes de marzo para decrecer hacia los meses de mayo y agosto.

La concentración promedio de bacterias heterótrofas viables fue de 92,987 BHV gr⁻¹ y la de Vibrios totales fue de 2,750 VT gr⁻¹.

V.5.2 COLIFORMES TOTALES Y FECALES

La concentración de coliformes totales estuvo en un intervalo de 350 - 5,400 CT 100 gr⁻¹, durante todo el periodo del estudio, mientras que, las coliformes fecales se mantuvieron por debajo de 23 CF 100 gr⁻¹ (Fig. 14).

V.6 TEMPERATURA

La temperatura mínima promedio, de 15.2 °C, fue registrada en enero y la máxima, de 21.2 °C, fue registrada en el mes de agosto (Fig 3).

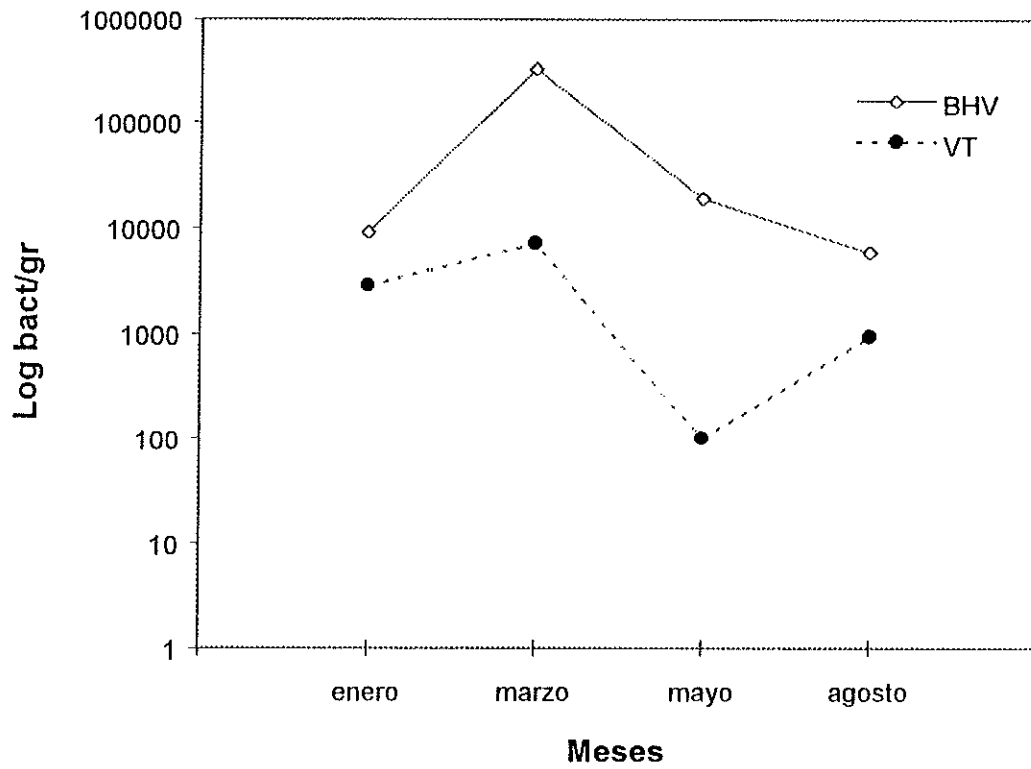


Fig. 13 Concentración promedio de Bacterias Heterótrofas Viables y Vibrios Totales en mejillón.

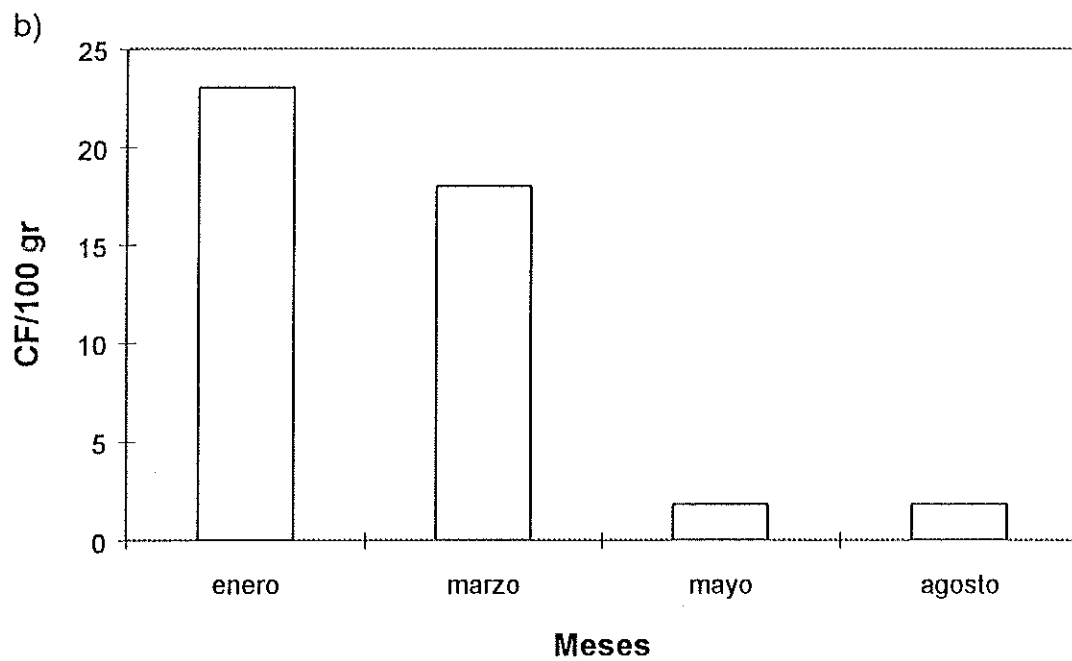
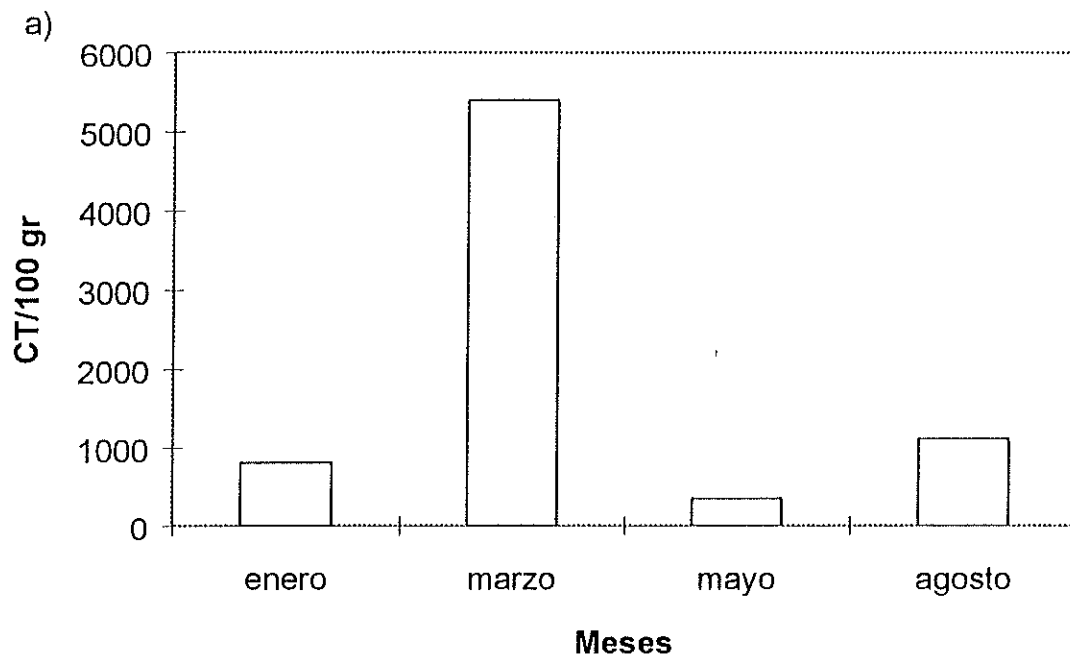


Fig. 14 Número más probable de Coliformes en mejillón a) Totales, b) Fecales

VI. DISCUSION

De las cepas del género *Vibrio* aisladas, en el presente estudio, *V. cholerae* O-1 no fue encontrado, sin embargo *V. cholerae* No O-1 siempre estuvo presente. Se ha señalado, por varios investigadores, la existencia de *V. cholerae* No O-1 en ambientes estuarinos y marinos de áreas no endémicas y sin ningún caso de cólera. Se cree que su presencia se debe a que, *V. cholerae* No O-1 es una especie autóctona de estos ambientes. Además, su presencia en zonas templadas se debe muy posiblemente a importaciones de climas cálidos (Colwell *et al.*, 1977; Singleton *et al.*, 1982a; Huq *et al.*, 1984; Tamplin *et al.*, 1990; Colwell y Spira, 1992).

Aún cuando no se ha encontrado correlación entre los indicadores microbianos de contaminación antropogénica y la presencia de *V. cholerae* No O-1 (Kaper *et al.*, 1979; Colwell *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 1984; Colwell y Spira, 1992; Morris, 1994), en el presente estudio la mayor cantidad de cepas características de *V. cholerae* No O-1 se aisló del área Norte de la Bahía. Esta zona es la de mayor contaminación en la cual se registraron las más altas concentraciones bacterianas de coliformes, heterótrofos viables (BHV) y vibrios totales (VT). Las concentraciones de BHV y VT en esta zona indica que estas poblaciones presentan mayores concentraciones en áreas de alto contenido de materia orgánica disuelta y particulada.

La parte norte de la Bahía ya ha sido señalada, por varios investigadores, como una área de alta contaminación, con concentraciones superiores a 16,000 CF 100 ml⁻¹, siendo los meses de verano los de mayor concentración

de CT y CF (Sañudo-Wilhelmy *et al.* 1984; Sañudo-Wilhelmy *et al.* 1985; Orozco-Borbón y Sañudo-Wilhelmy, 1988). Si bien las estaciones 1 y 2 son las que presentaron las más altas concentraciones de coliformes, su concentración fue menor a los valores registrados en esta área por Sañudo-Wilhelmy *et al.* (1985), esto nos indica que, por diversos factores no identificados, la contaminación bacteriológica disminuyó en esta área durante los meses de mayo y agosto. Sin embargo este comportamiento oscilatorio ya había sido reportado para esta área por Orozco-Borbón y Gutiérrez-Galindo (1983).

En la parte Norte de la Bahía de Todos Santos son descargadas las aguas residuales de la Industria Pesquera y de la planta de tratamiento de aguas negras de la Ciudad de Ensenada (CESPE) (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1985), las cuales llevan consigo un alto contenido de materia orgánica disuelta y particulada, así como también un alto contenido microbiano. Esta combinación hace posible el incremento en las poblaciones bacterianas debido a una mayor disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, la disminución en la concentración de las bacterias coliformes durante mayo y agosto en este estudio, no fue por la disminución en el aporte bacteriano de la planta de tratamiento, ya que no tuvo ninguna modificación en su tratamiento, ni en el volumen arrojado al océano (com. personal Quim. Isabel Delgadillo, CESPE). Sin embargo, la Industria Pesquera aledaña a la planta de tratamiento sí disminuyó sus aportes de aguas residuales, por el descenso en el nivel de producción (com. personal Ocean. Alejandro Ruiz). Estos aportes, al igual que los de la planta de tratamiento, convergen en el arroyo El Gallo por lo que es posible que este

decremento en materia orgánica tuviera una repercusión en la concentración de coliformes.

V. cholerae No O-1 se aisló del área de mayor concentración bacteriana (estación 1) desde enero-agosto, principalmente en agua, aunque también se aisló de plancton y sedimento. Posiblemente, su mayor presencia en esta área se debe a las descargas de las centinas de los barcos, ya que este medio de transporte es uno de los principales dispersores de la enfermedad (McCarthy y Khambaty, 1994).

En el presente trabajo no se cuantificó *V. cholerae* No O-1, por lo que no se llevó a cabo ningún tipo de correlación estadística. Sin embargo, en algunos estudios se ha señalado la no correlación de *V. cholerae* No O-1 y las bacterias heterótrofas viables (BHV) y los vibrios totales (VT). Es importante señalar que, en un contexto general, *V. cholerae* No O-1 fue aislado principalmente de la zona de mayor contenido microbiano (estaciones 1 y 2), con concentraciones promedio de 2.9×10^4 BHV ml⁻¹ y 144 VT ml⁻¹ en agua superficial y 1.69×10^6 BHV gr⁻¹ y 1.48×10^4 VT gr⁻¹ en sedimento. No obstante, Kaper *et al.* (1979) encontraron en la Bahía de Chesapeake, E.U.A., una menor concentración de *V. cholerae* No O-1 (NMP 0.3/L) en las áreas de mayor concentración de bacterias coliformes, heterótrofas viables (BHV) y vibrios totales (VT). En dos estaciones de esta área se registraron concentraciones de 24,000 y 46,000 CF 100 ml⁻¹, 15 y 110 $\times 10^5$ BHV ml⁻¹ y 3,400 y 1,200 VT ml⁻¹, respectivamente.

La no correlación entre *V. cholerae* y las bacterias coliformes así como los estudios que señalan que *V. cholerae* sobrevive más tiempo en aguas marinas que *Escherichia coli*, son importantes desde el punto de vista de Salud Pública, para el control de calidad de agua y sanidad de moluscos, cuando la calidad esta solamente basada en la abundancia de coliformes fecales (Rodrick *et al.*, 1984; Garay *et al.*, 1985).

La mayor cantidad de cepas características de *V. cholerae* No O-1 aisladas se registró en el mes de agosto, mes que, a su vez, registró la mayor temperatura promedio, de 21.2°C. Estos resultados concuerdan con los de varios investigadores (Hood *et al.*, 1984; Colwell y Spira, 1992), quienes mencionan que, cuando la temperatura es baja, principalmente durante los meses de invierno, la ocurrencia de *V. cholerae* No O-1 es restringida y por lo contrario es mayor durante los meses cálidos.

Garay *et al.* (1985) aislaron *V. cholerae* No O-1 en el lago de Albufera, Valencia, España entre una temperatura de 10-30.5°C. Así mismo, Seidler y Evans (1984) encontraron una mayor abundancia de *V. cholerae* No O-1 a una temperatura entre 21-28°C. Colwell y Spira (1992) señalan que la mayor frecuencia de aislamiento es en los meses de verano, cuando la temperatura es superior a los 17°C. Hood *et al.* (1984) reportan una alta correlación lineal entre *V. cholerae* No O-1 y la temperatura en dos Esteros de Florida.

Por otro lado, en el mes de agosto se aisló *V. cholerae* No O-1 principalmente del plancton, lo cual refleja su posible asociación con

organismos del plancton, como lo encontrado por Huq *et al.* (1984), de que *V. cholerae* sobrevive más tiempo a mayores temperaturas en presencia de copépodos vivos. Cabe señalar que la mayor abundancia de zooplancton en la Bahía de Todos Santos se registra durante los meses de verano (Castro-Longoria, 1987).

V. cholerae No O-1 fue aislado de muestras de agua, sedimento y plancton pero no de mejillón. La presencia en el sedimento es explicada por Colwell y Spira (1992) quienes señalan que esta especie se comporta de manera similar a *V. parahaemolyticus*. Con un ciclo alternativo en el cual, en los meses cálidos, durante los afloramientos de plancton, coloniza la quitina de los crustáceos planctónicos y entre afloramientos sobrevive en el sedimento, esto corresponde al invierno en climas templados. Sin embargo, en el presente estudio *V. cholerae* No O-1 no se aisló del sedimento en el mes de enero, lo cual no corresponde con el comportamiento antes señalado.

Aunque *V. cholerae* No O-1 ha sido aislado comúnmente de organismos filtroalimentadores, tales como ostión, mejillón, etc. (Morris, 1994), en el presente estudio no se detectó en mejillón, al igual que Tison *et al.* (1986) que, aislaron *V. cholerae* No O-1 en tres esteros de Oregon, E.U.A. en Yaquina, Coos y Tillamok, desde febrero a julio, en muestras de agua, sedimento y algas, pero no de cangrejos, almejas y ostiones. Sin embargo, otros investigadores si lo han aislado de organismos filtroalimentadores como es el caso de Hood *et al.* (1984) que, encontraron en dos esteros de Florida, E.U.A.

un 50% de *V. cholerae* No O-1 en muestras de agua, 45% de ostión, 30% de sedimento y 75% en cangrejos.

Aún cuando sólo se aisló *Vibrio cholerae* No O-1 su hallazgo es importante debido a que, es potencialmente patógeno, ya que puede causar gastroenteritis cuando se ingieren mariscos crudos, principalmente moluscos. Se ha reportado gastroenteritis en diferentes países, siendo México uno de ellos (Finch *et al.*, 1987). Los casos que se han presentado tienden a ocurrir en los meses cálidos, que es cuando en el medio acuático tiende a incrementarse la abundancia de *V. cholerae* No O-1. Sin embargo, es importante señalar que esta enfermedad, causada por *V. cholerae* No O-1, está catalogada como esporádica, ya que ocurre en un porcentaje muy bajo. En Bangladesh, región endémica del cólera, el porcentaje de aislamiento de *V. cholerae* No O-1 de personas con gastroenteritis es de 3-7% (Morris, 1994). Este porcentaje se considera bajo para esa área donde hay gran abundancia de esta especie. La posibilidad de que en la región de la Bahía de Todos Santos se den este tipo de casos es muy baja.

En la estación cuatro, zona donde se realizan cultivos de mejillón y ostión, se cumplieron los límites establecidos por la Administración Federal de Drogas, E.U.A. (FDA) para la calidad de agua en zonas de cultivo y carne de moluscos. La calidad del agua es aprobada si el NMP no excede de 14 CF 100 ml⁻¹ en el agua de mar y de 230 CF 100 gr⁻¹ en carne de moluscos fresca o congelada. (Rodrick *et al.*, 1984).

La parte sur de la Bahía, representada por la estación cuatro, tuvo un promedio en agua superficial de 3,600 BHV ml⁻¹ y de 17 Vibrios totales ml⁻¹, valores muy similares a los encontrados por Lizárraga-Partida y Vargas-Cárdenas (en prensa), durante su estudio comprendido desde 1992-1994 en esta misma área. Las BHV, en general, mostraron un incremento de enero-agosto, este comportamiento es natural en esta población bacteriana de la Bahía (Lizárraga-Partida y Vargas-Cárdenas, en prensa). El incremento en la concentración de BHV puede deberse a varios factores, entre los cuales está la temperatura del agua, la cual se incrementa en la Bahía de enero a septiembre (Grijalva-Chon *et al.*, 1985). También se ha reportado que los meses de junio y julio se presentan los afloramientos más grandes de diatomeas en la corriente de California. Estos afloramientos pueden ser los responsables del aumento de la materia orgánica disuelta disponible para el crecimiento bacteriano (Lizárraga-Partida y Vargas-Cárdenas, en prensa). Así mismo, Millán-Nuñez y Loya-Salinas (1993) encontraron la mayor concentración de diatomeas en el mes de junio en la Bahía de Todos Santos.

La concentración de bacterias totales, determinada por la técnica de epifluorescencia con DAPI, en el agua superficial fue similar en ambas áreas. Esto posiblemente no tiene una relación ecológica con *V. cholerae* No O-1, ya que no hay reportes de estudios paralelos de bacterias totales y *V. cholerae* No O-1. Aunque es posible que no exista una correlación entre ellas, como lo señalan varios investigadores con respecto a las BHV y VT (Kaper *et al.*, 1979; Colwell y Spira, 1992). Sin embargo, las bacterias totales estuvieron en un promedio de 3.03×10^6 . Este valor se encuentra en el intervalo de Sanders *et*

al. (1992) de $0.1-15.2 \times 10^6$ cel ml⁻¹ para zonas estuarinas y marinas. Morales *et al.* (1991) determinaron una abundancia de $3.4 - 5.6 \times 10^6$ cel ml⁻¹ en el estero de Punta Banda, Baja California, Así mismo, Sosa-Avalos (1994) encontró una abundancia de $1.36 - 8.59 \times 10^6$ cel ml⁻¹ en el mismo estero. Este estero se encuentra dentro de la Bahía en estudio.

Zweifel y Hagstrom (1995) señalan que el conteo de bacterias totales, con técnicas inespecíficas de fluorescencia, en aguas marinas es generalmente del orden de 5×10^5 a 3.0×10^6 cel ml⁻¹.

VII. CONCLUSIONES:

- 1.- La no detección de *V. cholerae* O-1, en ningún tipo de muestra, señala la no introducción de esta especie en la región.
- 2.- El mayor aislamiento de cepas características de *V. cholerae* No O-1 en el área de mayor contaminación de la Bahía, se debe posiblemente a la introducción por parte de las embarcaciones que provienen de regiones cálidas.
- 3.- La presencia de *V. cholerae* No O-1 en el área de baja contaminación, concuerda con la hipótesis de Colwell y otros investigadores, de ser una bacteria autóctona del ambiente estuarino y marino.
- 4.- El mayor aislamiento de *V. cholerae* No O-1 se realizó en el mes de agosto, que es donde se registró la mayor temperatura (21.2 °C).
- 5.- La no detección de *V. cholerae* No O-1 en mejillones refleja su escasa abundancia en esta área y buena calidad bacteriológica del mejillón, por lo que no representa peligro alguno para el consumidor.
- 6.- En el mes de agosto se registró el mayor número de aislamientos de cepas características de *V. cholerae* No O-1, aspecto que coincide con la mayor abundancia de fitoplancton y zooplancton en la Bahía de Todos Santos.
- 7.- La Bahía de Todos Santos presentó un gradiente de mayor a menor concentración bacteriana en sentido Norte a Sur.

8.- La concentración de Bacterias heterótrofas viables, bacterias totales y Vibrios totales no tuvieron un comportamiento similar, lo cual indica que estas poblaciones fluctúan de acuerdo a diferentes factores físicos, químicos o biológicos, comportamiento ya observado en esta Bahía.

9.- La parte sur de la Bahía, representada por la estación cuatro, fue la de menor concentración de bacterias heterótrofas viables y Vibrios totales. Las coliformes totales y fecales siempre estuvieron dentro de los límites permisibles para zonas de cultivo de moluscos bivalvos, por lo que esta zona es adecuada para este tipo de actividad.

VIII. LITERATURA CITADA:

APHA. 1989. Standard methods for examination of water and wastewater. 17th edition. American Public Health Association. Washington, D.C.

Argote-Espinoza, M.L., F.L. Gavidia-Medina and A. Amador-Buenrostro. 1991. Wind-induced circulation in Todos Santos Bay, B.C., México. *Atmósfera*, 4: 101-115.

Balakrish, N.G., Y. Oku, Y. Takeda, A. Ghosh, R.J. Ghosh, S. Chattopadhyay, S.C. Pal, J.B. Kaper and T. Takeda. 1988. Toxin profiles of *Vibrio cholerae* non O-1 from environmental sources in Calcutta, India. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 3180-3182.

Blake, P.A. 1994. Historical perspectives on pandemic cholerae. En: Wachsmuth, K., P.A. Blake and O. Olsvik (Eds.), *Vibrio cholerae and cholera*, Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C. 20005. pp. 465 pp.

Brayton, P.R., M.L. Tamplin, A. Huq and R.R. Colwell. 1987. Enumeration of *Vibrio cholerae* O-1 in Bangladesh waters by fluorescent-antibody direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (12): 2862-2865.

Castro Longoria, E. 1987. Variación espacial y temporal en la Biomasa del zooplancton de la Bahía de Todos Santos, B.C., México, octubre de

1982 a septiembre de 1983. Tesis de Licenciatura, Esc. Sup. de Ciencias Marinas, U.A.B.C., Ensenada, B.C. 58 pp.

Colwell, R.R. and W. Spira. 1992. Cholera. Barua, D. and W.B.Greenough III (Eds), Plenum Medical Book Company, New York. pp 107-127.

Colwell, R.R., J. Kaper and S.W. Joseph. 1977 *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science 198: 394-396.

Colwell, R.R., M.L. Tamplin, P.R. Brayton, A.L. Gauzens, B.D.Tall, D. Herrington, M.M. Levine, S. Hall and D.A. Sack. 1990. Environmental aspects of *Vibrio cholerae* in transmission of cholera. En: Advances in research on cholera and related diarrheas. Sack, R.B. and Zinnaka. K.T.K. (Eds)., Sci. Publ., Tokyo. 327-343.

Colwell, R.R., P.A. West, D. Maneval. E.F. Remmers, E.L. Elliot and N.E. Carlson. 1984. Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake Bay. In: Robert L. Metcalf and Werner Stumm (Eds.), Vibrios in the enviroment. John Wiley & Sons Inc., New York. 634.

Colwell, R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Huq and L.M. Palmer. 1985. Viable but non culturable *Vibrio cholerae* and related

pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technol.* 3: 817-820.

Colwell, R.R., R.J. Seider, J. Kaper, S.W. Joseph, S. Garges, H. Lockman, D. Maneval, H. Bradford, N. Roberts, E. Remmers, I. Huq and A. Huq. 1981. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O-1 in Maryland and Louisiana estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 555-558.

Craig, J.P., K. Yamamoto, Y. Takeda and T. Miwatani. 1981. Production of Cholera-like enterotoxin by a *Vibrio cholerae* non-O1 strain isolated from the environment. *Infect. Immun.* 34: 90-97.

De Paola, A., C.A. Kaysner and R.M. McPhearson. 1987. Elevated temperature method for recovery of *Vibrio cholerae* from oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1181-1182.

Difco Manual. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10th ed. Difco Laboratories, Detroit Michigan 48232, USA. 1155 pp

Epstein, P.R., T.E. Ford and R.R. Colwell. 1993. Marine ecosystems. *The Lancet.* 342: 1216-1219.

Fernández de Castro, J. 1991. El cólera un problema no resuelto. *Ciencias,* 24: 33-41.

- Finch, M.J., J.L. Valdespino, J.G. Wells, G. Perez-Perez, F. Arjona, A. Sepulveda, B. Bessudo, and P.A. Blake. 1987. Non-O1 *Vibrio cholerae* infections in Cancún, México. *Am. J. Med. Hyg.* 36: 393-397.
- Food and Drug Administration. 1992 Bacteriological Analytical Manual, 7th. Ed. AOAC International, Arlington, VA. 529 pp.
- Garay, E., A. Arnau and C. Amaro. 1985. Incidence of *Vibrio cholerae* and related vibrios in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 426-430.
- Grijalva-Chon, J.M., R. Castro-Longoria and M.G. Hamman. 1985. Temperature and visibility in Todos Santos Bay. B.C. México. october 1982 to september 1983. *Ciencias Marinas.* 11: 39-48.
- Hood, M.A., G.E. Ness and G.E. Rodrick. 1981. Isolation of *Vibrio cholerae* serotype O-1 from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:559-560.
- Hood, M.A., G.E. Ness, G.E. Rodrick and N.J. Blake. 1984. The ecology of *Vibrio cholerae* in two Florida estuaries. En: Robert L. Metcalf and Werner Stumm (ed.), *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons Inc., New York. 634.

Huq, A., E.B. Small, P.A. West, M.I. Huq, R. Rahman and R.R. Colwell. 1983.

Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 275 - 283.

Huq, A., P.A. West, E.B. Small, M.I. Huq and R.R. Colwell. 1984. Influence of water temperature, salinity and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O-1 associated with live copepods in laboratory microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 420-424.

Huq, A., R.R. Colwell, R. Rahman, A. Ali, M.A.R. Chowdhury, S. Parveen, D.A. Sack and E. Russek-Cohen. 1990. Detection of *Vibrio cholerae* O-1 in the aquatic environment by fluorescent-monoclonal antibody and culture methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2370 - 2373.

Jiménez González, R. 1989. Contaminación fecal en las principales playas de uso recreativo de la Bahía de Todos Santos, B.C. durante la estación de verano 1987. Tesis Profesional. Esc. Sup. de Ciencias U.A.B.C. 48 pp.

Kaper, J., H. Lockman, R.R. Colwell and S.W. Joseph. 1979. Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 91-103.

Kaysner, C.A. and W.E. Hill. 1994. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in food and water. En: Wachsmuth, K., P.A. Blake and O. Olsvik (Eds.), *Vibrio cholerae and cholera*. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C. 20005. pp. 465 pp.

Kaysner, C.A., C. Abeyta, M.M. Wekell, A. DePaola, R.F. Stott and J.M. Leitch. 1987. Incidence of *Vibrio cholerae* from Estuaries of the United States west coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1344-1348.

Lee, J. V., D.J. Bashford, T.T. Donovan, A.L. Furniss and P.A. West. 1982. The incidence of *Vibrio cholerae* in waters, animals and birds in Kent, England. *Jour. Appl. Bacteriol.* 52: 281-291.

Lee, J.V., D.V.J. Bashford, T.J. Donovan, A.L. Furniss and P.A. West 1984. The incidence and distribution of *Vibrio cholerae* in England. En: Robert L. Metcalf and Werner Stumm (Eds.). *Vibrios in the enviroment*. John Wiley & Sons Inc., New York. 634 pp.

Lizárraga-Partida, M.L. and Vargas-Cárdenas G. Influence of water circulation on marine and faecal bacteria in a mussel growing area. *Mar. Poll. Bull.* en prensa.

Malvido, E. y M.A. Cuenya. 1991. El cólera en Puebla en el siglo XIX. *Ciencias*, 24: 51-56.

- Manning, P.A., V.H. Stroher and R. Morona. 1994. Molecular basis for O-antigen Biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: Ogawa-Inaba switching. En: Wachsmuth, I.K., P.A. Blake and O. Olsvik (Eds.). *Vibrio cholerae* and cholera. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C. 20005. pp. 465 pp.
- McCarthy, S.A. and F. M. Khambaty. 1994. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2597-2601.
- Millan--Nuñez, E. y D.H. Loya-Salinas, 1993. Variabilidad temporal del fitoplancton en una zona costera del noreste de Baja California. *Ciencias Marinas.* 19: 61-74.
- Morales-Zamorano, L.A., R. Cajal-Medrano, E. Orellana-Cepeda y L.C. Jiménez-Pérez. 1991. Effect of tidal dynamics on a planktonic community in a coastal lagoon of Baja California, México. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 78: 229-239.
- Morris, J.G. Jr. 1994. Non -O group 1 *Vibrio cholerae* strains no associated with epidemic disease. En: Wachsmuth, I.K., P.A. Blake and O. Olsvik (Eds.). *Vibrio cholerae* and cholera. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C. 20005. 465 pp.

Nair, G.B. and Y. Takeda. 1994. Detection of toxins of *Vibrio cholerae* O1 and non O1. En: Wachsmuth, I.K., P.A. Blake and O. Olsvik (Eds.). *Vibrio cholerae* and cholera. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C. 20005. 465 pp.

Nair, G.B., Y. Oku, Y. Takeda, A. Ghosh, R.K. Ghosh, S.Chattopadhyay, S.c. Pal, J.B. Kaper and T.Takeda. 1988 Toxin profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 from environmental sources in Calcutta, India. Appl. Environ. Microbiol. 54: 3180-3182.

Nell, C.R., H.B. Bradford Jr. and J.R. Barbay. 1984. Ecology of *Vibrio cholerae* in Louisiana coastal areas. En: Robert L. Metcalf and Werner Stumm (Eds.), *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons Inc., New York. 634 pp.

Ohashi, M., T. Shimada and H. Fukumi. 1972. In vitro production of enterotoxin and hemorrhagic principle by *Vibrio cholerae*, NAG. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 25: 179-194.

Olarte, J. 1991. El germen del cólera. Ciencias, 24: 43-50.

Orozco-Borbón, Ma. V. y E. A. Gutiérrez-Galindo, 1983. Contaminación fecal costera en la zona del puerto de Ensenada, Baja California. Ciencias Marinas. 9: 27-34.

- Orozco-Borbón, Ma. V. y S.A. Sañudo-Wilhelmy. 1988. Estudio de coliformes, estreptococos y bacterias patógenas a lo largo de la costa de Baja California. *Ciencias Marinas*. 14: 1-8.
- Porter, K.G. and I.S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948
- Puente, M.E., F. Vega-Villasante, G. Holguin and Y. Bashan. 1992. Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated sea water. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 465-471.
- Rodrick, G.E., N.J. Blake, M. Tamplin, J.E. Cornette, T. Cuba and M.A. Hood. 1984. The relationship between fecal-coliform levels and the occurrence of vibrios in Apalachicola Bay, Florida. En: Robert L. Metcalf and Werner Stumm (Eds.), *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons Inc., New York. 634 pp.
- Roszak, D.B. and R.R. Colwell. 1987. Survival strategies of Bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51: 365-379.
- Sanders, R.W., D.A. Caron and U.G. Berninger. 1992. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 86: 1-14.

- Sañudo-Wilhelmy, S.A., A. Morales-Yañez y J.A. Vargas-Flores. 1984. Contaminación fecal en la Bahía de Ensenada Baja California, México. *Ciencias Marinas*. 10: 7-17.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A., I. Rivera-Duarte, J.A. Zegovia-Zavala, Ma. V. Orozco-Borbón, F. Delgadillo-Hinojosa y J. Del Valle-Villorin. 1985. Estado actual de la contaminación marina en la Bahía de Todos Santos, B.C. diagnóstico y alternativas para su reducción y control. I.I.O./U.A.B.C., Ensenada, B.C. 32 pp.
- Seidler, R.J. and T.M. Evans. 1984. Computer-assisted analysis of *Vibrio* field data: four coastal areas. p. 411-425. En: Robert L. Metcalf and Werner Stumm (Eds.), *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons Inc., New York. 634 pp.
- Singleton, F.L., R.W. Attwell, M.S. Jangi and R.R. Colwell. 1982 a. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1047-1058.
- Singleton, F.L., R.W. Attwell, M.S. Jangi and R.R. Colwell. 1982 b. Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1080-1085.

- Sosa-Avalos, R. 1994. Estimación de la productividad primaria por el método del carbono catorce y oxígeno en el Estero de Punta Banda. Tesis de Maestría en Ocean. Costera, U.A.B.C. Ensenada, B.C. 73 pp.
- Swerdlow, D.L. and A.A. Ries. 1992. Cholera in the Americas. JAMA, 267: 1495-1499.
- Tamplin, M.L. and R.R. Colwell. 1986. Effects of microcosm salinity and organic substrate concentration on production of *Vibrio cholerae* enterotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 52: 297-301.
- Tamplin, M.L., A.L. Gauzens, A. Huq, D.A. Sack and R.R. Colwell. 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogrup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1977-1980.
- Tison, D.L., M. Nishibuchi, R.J. Seidler and R.J. Siebeling. 1986. Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* serovars from Oregon coastal environments. Appl. Environ. Microbiol. 51: 444-445.
- Vargas-Cárdenas, M.G. y M.L. Lizárraga-Partida. 1993. Manual de prácticas de laboratorio del curso bacteriología marina. Comunicaciones Académicas. Serie Ecología, C.I.C.E.S.E. 31 pp.

- West, P.A. and J.V. Lee. 1982. Ecology of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae*, in natural waters of Kent, England. Jour. Appl. Bacteriol. 52: 435-448.
- Xu, H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes and R.R. Colwell. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbiol. Ecol. 8: 313-323.
- Zinnaka, Y. and C.C. J. Carpenter, Jr. 1972. An enterotoxin produced by non-cholera vibrios. Johns Hopkins Med. J. 131: 403-411.
- Zweifel, U.L. and A. Hagstrom. 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (Ghosts). Appl. Environ. Microbiol. 61: 2180-2185.

IX. APENDICE

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO:

1.- Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS)

medio TCBS	89 gr
Agua destilada	1000 ml

Disolver el medio y hervir, no esterilizar

2.- Agar Triptona (T1N0)

Triptona o tripticasa	10 gr
Agar bacteriológico	20 gr
Agua destilada	1000 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión.

3.- Agar Triptona y sal (T1N1)

Triptona o tripticasa	10 gr
Cloruro de sodio	10 gr
Agar bacteriológico	20 gr
Agua destilada	1000 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión.

4.- Agar Triptona y Sal (T1N10)

Triptona o tripticasa	10 gr
Cloruro de sodio	100 gr
Agar bacteriológico	20 gr
Agua destilada	1000 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión.

5.- Agua de Peptona Alcalina (APA)

Peptona	10 gr
Cloruro de Sodio	10 gr
Agua destilada	1000 ml

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH de tal forma que después de esterilizar éste sea de 8.5 ± 0.2 . Esterilizar en autoclave 10 min a 121°C y 15 lb de presión.

6.- Medio Zobell

Bactopeptona	5 gr
Extracto de levadura	1 gr
Sol. Cloruro Férrico (1%)	1 ml
Agar Bacteriológico	13 gr
Agua de mar envejecida	750 ml
Agua destilada	250 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión.

7.- Agar Gelatina

Agar nutriente	23 gr
Gelatina	4 gr
Cloruro de Sodio	10 gr
Agua destilada	1000 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión. Incubar 24 hrs a 30°C

8.- Sol. reveladora de la acción de la gelatinasa

Cloruro mercúrico	15 gr
Ac. Clorhídrico concentrado	20 ml
Agua destilada	100 ml

gelatina no hidrolizada = precipitado blanco opaco
gelatina hidrolizada = halo claro alrededor de las colonias

* Se puede observar el halo al colocar las cajas de petri en el refrigerador entre unos 5 - 10 minutos, después poner a contra luz para observar el halo.

9.- Lisina descarboxilasa

Peptona	5 gr
Extracto de levadura	3 gr
Glucosa	1 gr
L-Lisina	5 gr
Purpura de Bromocresol	0.02 gr
Cloruro de Sodio	10 gr
Agua destilada	1000 ml

Suspenda los ingredientes hasta disolver el agar, distribuya 5 ml en tubos con tapa de rosca. Esterilize en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión. Para arginina y ornitina cambiar el aminoácido. Incubar a 35 °C por 48 hrs

Positivo = purpura turbio a purpura amarillento (alcalino)

Negativo = amarillo (ácido)

10.- Reactivo de Oxidasa

N,N,N',N'-Tetrametil-p-Fenilendiamina.2 HCl	1 gr
Agua destilada	100 ml

Disolver y colocar en frasco ambar, guardar bajo refrigeración, uselo preferentemente recién hecho.

11.- Desoxicolato de Sodio al 0.5 %

Desoxicolato de sodio	0.5 gr
Agua destilada	100 ml

12.- Lauril Triptosa (Coliformes totales)

Concentración normal:

Lauril triptosa	35.6 gr
Agua destilada	1000 ml

Concentración doble:

Lauril triptosa	71.2 gr
Agua destilada	1000 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar, colocar 10 ml en tubos con tapa de rosca con campana Durham, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión.

Inocular cada uno de cinco tubos que contengan L.T. doble concentrado, con 10 ml de la muestra.

Añadir 1 ml de muestra a cada uno de cinco tubos de L.T. concentración normal.

Añadir 0.1 ml de muestra a cada uno de cinco tubos de L.T. concentración normal.

Incubar los tubos a 35 ± 0.5 °C en baño maria con circulación de agua. La temperatura debe ser estrictamente controlada con termómetros certificados y con divisiones cada 0.1 °C.

Examinar cada tubo al final de 24 hrs, si no se aprecia formación de gas, incubar 24 hrs más.

Anotar la presencia ausencia de gas en cada exámen de los tubos.
Determinar el número más probable consultando la tabla.

13.- Medio E.C. (Coliformes fecales).

E.C.	37 gr
Agua destilada	1000 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar, colocar 10 ml en tubos con tapa de rosca con campana Durham, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb de presión.

Esterilizar el asa a la flama

Los tubos positivos de Lauril triptosa se resiembran en E.C.

Enfriar el asa en la pared del tubo

Transferir una asada del tubo positivo de L.T. a un tubo de E.C.

Repetir el procedimiento para todos los tubos positivos, marcandolos con la dilución correspondiente.

Incubar los tubos en baño maria con circulación de agua a 44.5 °C ± 0.2 °C.

Anotar los resultados positivos y determinar el NMP consultando la tabla.

DATOS BACTERIOLOGICOS COLECTADOS EN MUESTRAS DE AGUA SEDIMENTO Y MEJILLON EN LA BAHIA DE TODOS SANTOS, DURANTE ENERO-AGOSTO DE 1995.

Concentración promedio mensual de bacterias en agua superficial
Area 1= estación 1 + estación 2

	Enero	Marzo	Mayo	Agosto
BT/ml	1.23x10 ₆	2.03 x10 ₆	6.27 x10 ₆	2.58 x10 ₆
BHV/ml	1.75 x10 ₄	2.35 x10 ₄	2.03 x10 ₄	5.75 x10 ₄
VT/ml	11	268	57	241
CT/ml	835	>1600	11.9	144
CF/ml	275	920	2	33

Area 2= estación 3 + estación 4

	Enero	Marzo	Mayo	Agosto
BT/ml	1.29x10 ₆	1.07 x10 ₆	7.79 x10 ₆	1.99 x10 ₆
BHV/ml	5.75 x10 ₃	2.90 x10 ₃	1.98 x10 ₄	2.51 x10 ₄
VT/ml	7	4	100	155
CT/ml	4.8	1.8	4.4	12.5
CF/ml	1	0	3.2	4.8

Concentración promedio mensual de bacterias en agua superficial
por estaciones de muestreo.

	1	2	3	4
BT/ml	2.43x10 ₆	3.62 x10 ₆	3.49 x10 ₆	2.58 x10 ₆
BHV/ml	3.58 x10 ₄	2.36 x10 ₄	2.31 x10 ₄	3.64 x10 ₃
VT/ml	146	142	115	17.5
CT/ml	807	488	8	3
CF/ml	366	249	3	1.6

Concentración promedio mensual de bacterias en sedimento.
Area 1= estación 1 + estación 2

	Enero	Marzo	Mayo	Agosto
BHV/ml		3.79 x10 ₆	8.52 x10 ₅	4.93 x10 ₅
VT/ml	3.37 x10 ₃	5.15 x10 ₄	4.02 x10 ₃	450
CT/ml	835	>1600	11.9	144
CF/ml	275	920	2	33

Concentración promedio mensual de bacterias en sedimento.
 Area 2= estación 3 + estación 4

	Enero	Marzo	Mayo	Agosto
BHV/ml		$8.68 \times 10_4$	$4.94 \times 10_5$	$3.30 \times 10_4$
VT/ml		962	$3.97 \times 10_3$	$1.05 \times 10_3$
CT/ml	4.8	1.8	4.4	12.5
CF/ml	1	0	3.2	4.8

Concentración promedio de bacterias en sedimento por estaciones de muestreo

	1	2	3	4
BHV/ml	$3.06 \times 10_6$	$3.22 \times 10_5$	$4.85 \times 10_4$	$2.12 \times 10_5$
VT/ml	$2.60 \times 10_4$	$3.66 \times 10_3$	$3.21 \times 10_3$	776
CT/ml	8344	5282	111	18
CF/ml	6372	1524.5	27.5	0

Concentración de bacterias en mejillón

	Enero	Marzo	Mayo	Agosto
BHV/ml	$9.10 \times 10_3$	$3.30 \times 10_5$	$1.90 \times 10_4$	$5.90 \times 10_3$
VT/ml	2830	7140	100	930
CT/ml	800	5400	350	1100
CF/ml	23	18	1.8	1.8