

176  
2ej.

# Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Ciencias

“TECNICAS PARA LA DETECCION, IDENTIFICACION Y  
CUANTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS  
EN AGUAS COSTERAS”

## T E S I S

para obtener el Título de  
B I O L O G O

p r e s e n t a

JUAN SAINZ ROJAS



1 9 8 7



## **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 está 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.

I N D I C E

Temas	Páginas:
OBJETIVO	1
I INTRODUCCION	2
1) Las aguas costeras	2
2) Contaminación de las aguas costeras por enterobacterias	4
II Obtención de la muestra	7
III Pruebas de laboratorio para la detección de bacterias coliformes en muestras de agua marina	13
1) Recuento en placa	14
2) Método de fermentación en tubos múltiples	17
a. Prueba presuntiva	23
b. Prueba confirmativa	23
c. Prueba completa	25
d. Coloración de Gram	25
e. Reactivos utilizados en la coloración de Gram	27
f. Formulación de medios de cultivo	28
IV Detección e identificación de estreptococos en muestras de agua marina	31
a. Metodología y medios de cultivo	31
b. Prueba presuntiva	33
c. Prueba confirmativa	34
d. Prueba completa	34
V Preparación de muestras de moluscos para su análisis bacteriológico	34
VI Bacterias enteropatógenas ( <u>Salmonella</u> y <u>Shigella</u> ) contaminantes de aguas costeras	36
VII Referencias bibliográficas.	41

## O B J E T I V O

El objetivo principal de este trabajo fue reunir las técnicas necesarias para hacer análisis de las muestras de las aguas costeras, que pudieran estar contaminadas por enterobacterias patógenas procedentes de las heces fecales de individuos infectados e introducidas a los mares por medio de las aguas residuales originadas de poblaciones cercanas a las costas.

Las enterobacterias son las principales causantes de enfermedades gastrointestinales en el Mundo, por esta razón, su detección e identificación en las aguas costeras servirán como una medida preventiva contra la contaminación y se evitará la adquisición de este tipo de enfermedades que en algunos casos llegan a causar hasta ocasionar la muerte.

Este trabajo también se elaboró con el propósito de ser usado por el personal de la Sección de Bacteriología de Investigaciones Oceanográficas y el de la Dirección de Prevención de la Contaminación Marina dependientes de la Dirección General de Oceanografía Naval de la Secretaría de Marina, que realizan investigaciones en este campo y que no cuentan con un manual que reúna estas técnicas.

## I INTRODUCCION.

### 1) Las aguas costeras

Las aguas costeras son las de la orilla del mar contiguas a la Tierra firme y que se encuentran sobre la plataforma continental.

El grupo GESAMP (Group of Expert on the Scientific Aspect of Marine Pollution, FAO. 1976-1980) definió por aguas costeras a aquéllas que presentan una salinidad mayor de 0.5%, y que se extienden hasta la orilla de la plataforma continental (55).

Las aguas de la costa, que constituyen la llamada zona costera, representan un porcentaje infimo de las extensiones continentales, la superficie de los estuarios, de las lagunas saladas, de las tierras bajas y pantanosas.

La plataforma continental se extiende de 30 a 40 Km desde la costa y su profundidad es de 200 m; en ella se distinguen dos zonas, la zona litoral y la zona nerítica. La zona litoral es la más afectada por las mareas y la que recibe luz solar en cantidades suficientes para que puedan desarrollarse perfectamente los vegetales y los animales fijos en el fondo; la zona nerítica ó también llamada sublitoral es la más profunda y por lo mismo la penetración de la luz es escasa (9,11,12,34), vease la figura No. 1

La zona costera es el lugar en el que el agua de mar y la Tierra se unen; su línea de demarcación puede ser rocosa, arenosa o puede ser cortada bruscamente o bien puede poseer un declive que va acentuandose hasta alcanzar una profundidad de 200 m. Generalmente la luz solar penetra hasta los cien metros de profundidad; no obstante en las aguas transparentes de los trópicos su penetración es mucho mayor (11, 30,34).

Las zonas costeras son de importancia para el ser humano debido a sus características biológicas, a su potencialidad económica y su utilidad recreativa.

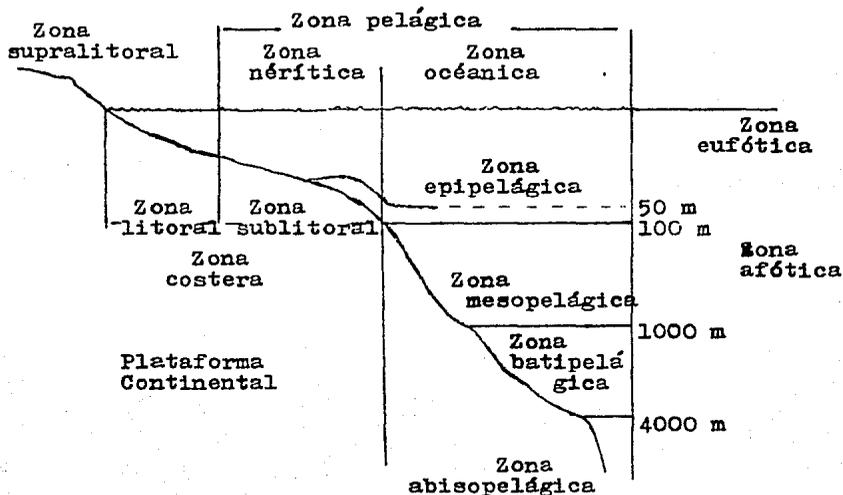


Figura Num. 1 . Principales Zonas Marítimas

La Zona costera es la de mayor importancia para el hombre, por la gran diversidad de especies animales y vegetales que ahí se reproducen, por los organismos de consumo alimenticio y por su utilidad recreativa. Pero también es la zona más perturbada a causa de los desechos contaminantes de origen doméstico e industrial.

Estudios hechos en los últimos años han indicado que las aguas costeras cercanas a las playas, han mostrado un aumento en su contaminación química y microbiológica poniendo en peligro la salud de los usuarios de estas zonas (15,21,24, 25,26,27,37,48,53,55).

2) Contaminación de las aguas costeras por Enterobacterias  
Las Enterobacterias constituyen una familia de bacilos Gram negativos, no esporulados, que carecen de oxidasa, reducen los nitratos a nitritos, fermentan la glucosa con ó sin producción de gas, son móviles ó inmóviles, crecen muy bien en medios simples y son anaerobios facultativos. La familia de las enterobacteriáceas incluye 12 géneros: Escherichia, Edwardsiella, Citrobacter, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Enterobacter, Afnia, Serratia, Proteus, Erwinia y Yersinia. Algunos microorganismos de estos géneros se encuentran formando parte d la flora del intestino de los vertebrados. Otros se comportan como saprófitos o bien pueden infectar a ciertas plantas (1,2,4,5,13,14,16,18,42). A todos los representantes de la familia de las enterobacterias se les conoce con el término de bacilos entéricos. Los géneros se consideran como los principales causantes de la patología intestinal (4,5,13,14,35).

Los géneros que contaminan principalmente las aguas costeras son Escherichia, Salmonella, Shigella y los del género de estreptococos; bajo ciertas condiciones pueden sobrevivir en el agua de mar hasta 15 días (2,5,7,17,21,24,25,32,37,42, 52,55).

Los estudios realizados con respecto a la viabilidad de las bacterias entéricas en el agua de mar han evidenciado que, las bacterias de la fiebre tifoidea pueden permanecer viables durante cinco semanas en agua de albañal y en contacto con el agua de mar entre dos y doce semanas. Escherichia coli muestra una mortalidad del 90% a las 30 horas en agua de mar colectada durante los meses de verano

y en general el 80% de todas las bacterias indígenas del agua de albañal, mueren en una hora al ponerse en contacto con el agua de mar (5,8,20,35,47,55).

Existen evidencias de que la mayoría de las bacterias coliformes no sobreviven mucho tiempo fuera de su hospedero y mueren cuando son incorporadas a las aguas salinas. Sin embargo, permanecen viables por mucho tiempo cuando se encuentran en presencia de materia orgánica o en abundante agua dulce. Rara vez se les ha detectado en el mar abierto debido a que la dilución a que están sujetas disminuye la población bacteriana (20,21,23,26,27,32,47).

En términos generales la presencia de bacterias coliformes en aguas marinas constituye una indicación de contaminación, pero este grupo de bacterias no es el único indicador, existe otro grupo que es el de los estreptococos fecales que junto con las bacterias coliformes, está siendo usado por algunas legislaciones sanitarias. No obstante, los estreptococos fecales no deben ser utilizados como criterio primario debido a que es escasa su especificidad por que no se pueden distinguir entre los estreptococos procedentes del hombre, los de los animales de sangre caliente y los de plantas e insectos, lo que puede conducir a pruebas falsas, pero es útil el registro de estreptococos como un suplemento a las pruebas de coliformes (55).

La cantidad permitida de bacterias para las aguas marinas cercanas a la playa es de 240 a 2400 bacterias por 100 ml., esta cantidad es de  $2.4 \times 10^2$  veces mayor que la permitida para el agua potable (1,18,23,24,33,48,50,53,55).

Las aguas costeras reciben descargas de aguas negras que no solamente contienen grandes cantidades de heces fecales, sino además desperdicios de toda índole procedentes de las industrias y materia orgánica proveniente fundamentalmente de las fábricas procesadoras de alimentos, lo cual ha conducido un aumento en el número y en la variedad de organismos

patógenos como los virus, hongos, protozoarios (amibas), helmintos y bacterias (1,17,17,21,37,26).

Zobell determinó que el flujo diario de aguas negras en el Océano Pacífico a lo largo de la costa occidental de los Estados Unidos, contiene una población de  $2 \times 10^{18}$  bacterias coliformes; estos microorganismos se distribuyen a lo largo de la plataforma continental a una profundidad aproximada de 100 m y alcanzan una concentración de 50 bacterias por ml (26,27).

En el siglo pasado, toda una serie de epidemias en cadena de fiebre tifoidea, cólera y desinteria fueron consecutivas a la introducción de aguas contaminadas a las reservas de agua potable en ciudades y pueblos. Una de las epidemias más conocidas y famosas fue la de la fiebre tifoidea que se presentó en las ciudades de Nueva York, Chicago y Washington durante todo el otoño de 1924 y principios de 1925 y que fue ocasionada por el consumo de ostras crudas recogidas de aguas contaminadas por aguas residuales (1,4,7,19,21,23,25, 32,33,37,51,55).

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud han permitido calcular que la población mundial afectada por enfermedades infecciosas ocasionadas por la contaminación bacteriana del agua asciende a 500 millones de personas. De esos quinientos millones, 5 millones mueren a causa de esta enfermedad antes de cumplir 5 años (1,19,32,47,53).

## II Obtención de la muestra

La recabación de la muestra representa el primer paso analítico en la realización de un estudio específico o determinado. El muestreo consiste en la separación de una fracción de muestra que sea representativa del volumen ó de la masa del cuerpo que se desea analizar. En el caso específico del análisis de agua marina, la muestra debe colectarse en frascos limpios estériles de 100 ml de capacidad, de boca ancha, de vidrio, o de plástico y resistentes al calor, ver figura 2. Dependiendo del contenido de cloro en la muestra deben añadirse previamente a cada frasco 1ml de solución de tiosulfato de sodio 0.01 N con el fin de evitar la acción bactericida del cloro (49,50).

Los sitios de muestreo incluyen a las bahías, los estuarios, las playas con frente oceánico, las lagunas costeras y los ríos con desembocadura al mar.

En la selección del sitio exacto para el muestreo deben considerarse las fuentes de contaminación, el caudal, la velocidad de la corriente, la dilución por corrientes ramificadas, los cambios en la topografía y el declive del cuerpo de agua con el fin de que las muestras sean representativas de las condiciones que existan en el punto y la hora en que se toman (1,49,50,55).

En el caso de que existan descargas de aguas residuales al mar, las muestras deberan tomarse antes, durante y después del máximo de estas descargas con el fin de tener una idea de la contaminación bacteriana y de las variaciones que ésta experimenta con las descargas. El número de muestras a tomar, dependerá principalmente de:

- a) la cantidad de descargas en el área de estudio
- b) la distancia entre los tubos de descarga
- c) el contenido de bacterias en los vertimientos
- d) la situación geográfica del área de estudio.

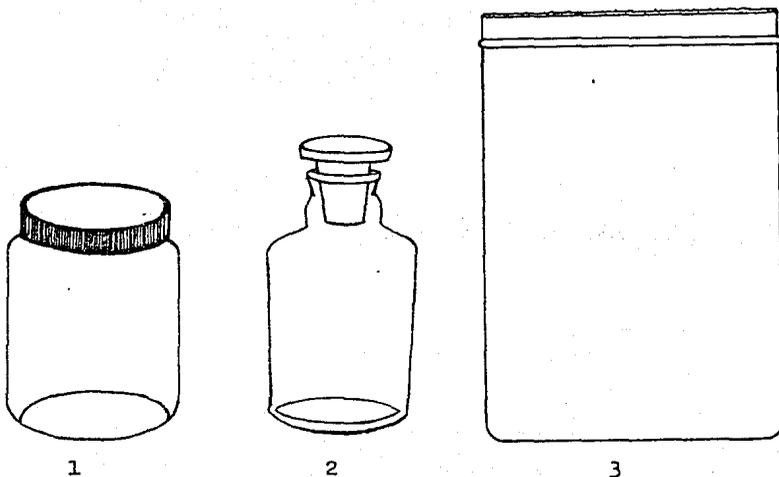


Figura 2. Recipientes que se utilizan en la toma de muestra.  
1. Frasco de vidrio o de plástico con tapón de rosca  
2. Frasco de vidrio con tapón esmerilado  
3. Bolsa de plástico con cierre hermético.

En casos especiales como por ejemplo cuando se trata de investigar las variaciones que experimenta la contaminación bacteriana de una zona costera durante una determinada estación del año, entonces se hará un programa previamente establecido en el que se especifique cuántas veces al día, que días y durante cuánto tiempo se tomaran las muestras. La transportación del personal y del equipo de muestreo, debe realizarse en una lancha ballenera o bien en un bote salvavidas.

Las muestras deberán tomarse con la mano por medio de un frasco de vidrio ó de plástico. Se introduce el frasco en contra corriente y se deja que se llene de agua (ver figura 3), una vez lleno se tapa y se saca del agua, se elimina una porción del agua con el fin de que quede un espacio para poder homogenizar la muestra de agua al momento del análisis. Tapar perfectamente el frasco y etiquetarlo anotando la siguiente información:

- 1) fecha y hora de muestreo
- 2) temperatura del agua
- 3) profundidad a la cual fue tomada la muestra
- 4) localización geográfica del sitio de muestreo
- 5) si se juzga pertinente, debe agregarse la información que sea necesaria.

Cuando se requiera tomar muestras a una profundidad mayor de 30 cm de la superficie, se recomienda utilizar el muestreador bacteriológico de JZ ZOBELL, o también el muestreador de agua con liberador de tapón de forma de canastilla (ver figuras 4 y 5).

El muestreador de Zobell tiene un marco de metal, mensajero de metal pesado, tubo de vidrio sellado y unido a un tubo de hule y dos frascos de vidrio de 350 ml esterilizados. El muestreador se introduce a la profundidad deseada, se suelta el mensajero que rompe el tubo de vidrio y al romperse permite la entrada del agua al frasco.

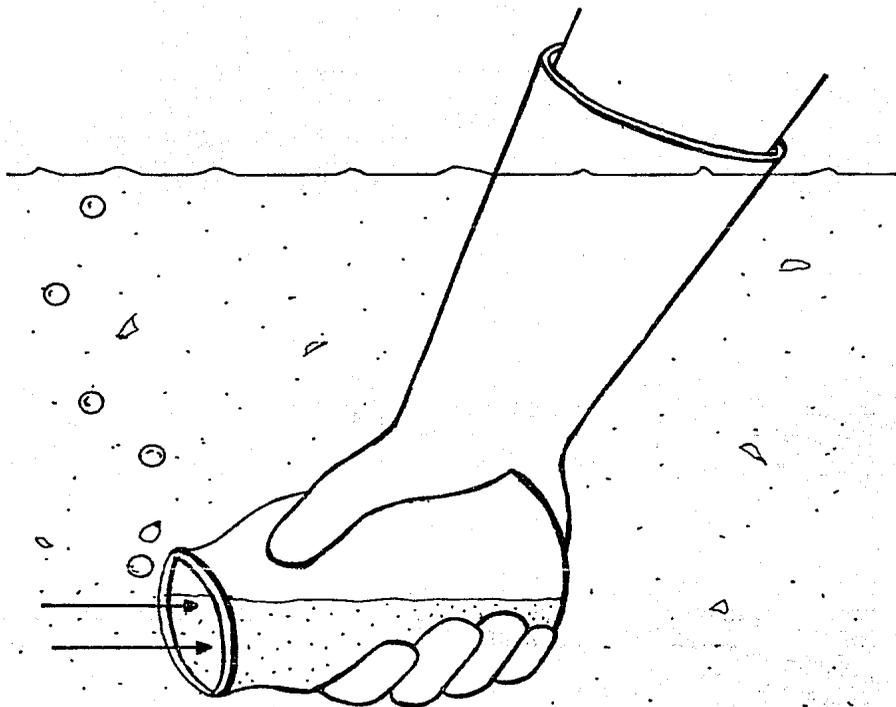


Figura 3. Toma de muestra de agua

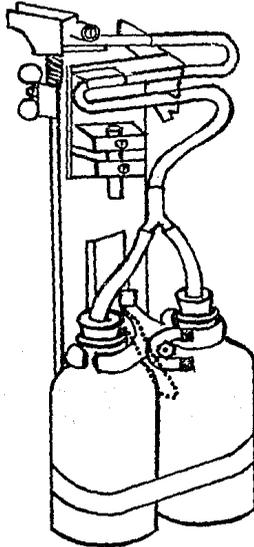
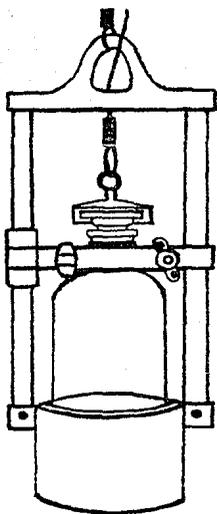


Figura 4. Muestreador bacteriológico JZ ZOBELL para utilizarse a más de 300 m de profundidad.



**Figura 5. Muestreador bacteriológico de forma de canastilla para utilizarse en la toma de muestra de agua a más de 300 m de profundidad.**

El muestreador de agua con liberador de tapón es más sencillo; consta de una canastilla metálica de cobre y acero inoxidable resistente a la corrosión, tiene un solo frasco de 500 ml con tapón esmerilado, dicho frasco se sujeta por el cuello y el tapón tiene una cubierta o sujetador también metálica unida a un cable de acero el que sirve para jalar el tapón y permitir la entrada del agua a la profundidad deseada, ver figura 5.

Además de la obtención de la muestra de agua marina, existen algunos organismos que podrían ser utilizados como indicadores de contaminación bacteriana; éstos son los moluscos tales como las ostras, los mejillones, las almejas, etc., que poseen un sistema eficiente de filtración de agua. En esta agua filtrada están suspendidos innumerables microorganismos. Entre esos microorganismos podrían estar las bacterias entéricas patógenas. Esta es la razón por la que se debe muestrear a los moluscos, para incluirlos en los análisis bacteriológicos.

Para la colecta de moluscos, es recomendable llevar guantes de cuero, cajas de cartón parafinado y bolsas de plástico limpias. En algunos casos en que los moluscos se encuentren adheridos a las rocas o dentro de los sedimentos, se pueden utilizar tenazas manuales, rejillas, pala azadora, pico de geólogo, cubetas y tamices.

Las muestras deben ser colocadas inmediatamente en hielo y trasladarse al laboratorio para su análisis; las muestras deberán permanecer en refrigeración hasta el momento del análisis.

### III Pruebas de laboratorio para la detección de bacterias coliformes en muestras de agua marina

Los coliformes son un grupo de la familia de las enterobacterias que incluye a los géneros Escherichia, Enterobacter, y Klebsiella. Estas bacterias poseen varias características en común con los géneros Salmonella y Shigella; no obstante

existe una diferencia bioquímica que los distingue: los coliformes fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24 horas, mientras que Salmonella y Shigella no fermentan la lactosa. Existen sin embargo otras bacterias que también hidrolizan la lactosa con producción de gas y podrían enmascarar la presencia de coliformes. Por esta razón se deben realizar otros estudios que permitan identificarlos y diferenciarlos de otras bacterias que podrían estar presentes en la muestra de agua. En términos generales el análisis bacteriológico del agua de mar que se realiza con el fin de detectar la presencia de coliformes, consiste de los siguientes pasos:

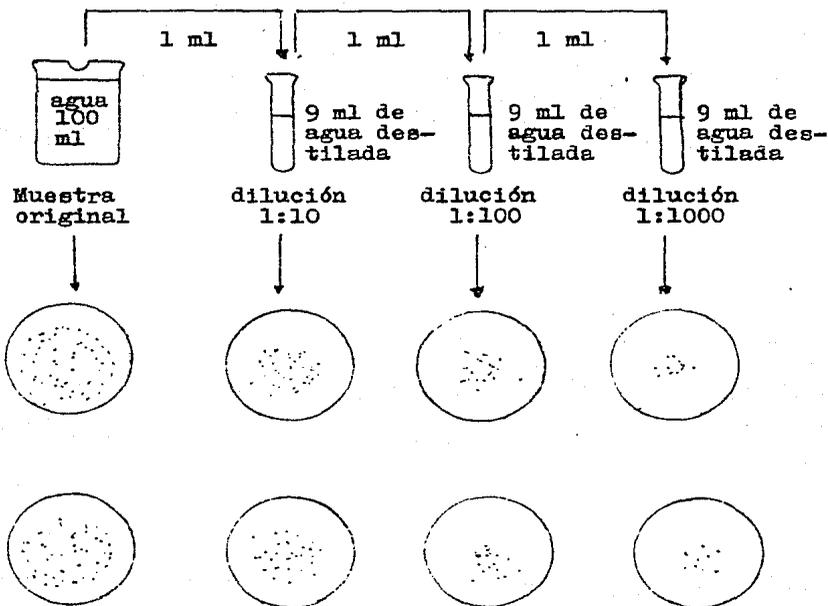
1. Recuento en placa
2. Método de fermentación de los tubos múltiples
  - a) prueba presuntiva
  - b) prueba confirmativa
  - c) prueba completa
  - d) coloración de Gram

#### 1. Recuento en placa

Para llevar a cabo el recuento de bacterias, la muestra debe diluirse y sembrarse en placa, incubar y después de la incubación se cuenta el número de colonias que se han desarrollado. Posteriormente se determina el número original de bacterias multiplicando la cantidad de colonias desarrolladas por la dilución de la muestra (1,4,5,8,24,36,48).

#### Técnica:

- 1) La muestra de agua original se agita para obtener una solución homogénea. Preparar diluciones seriadas de 1:10, 1:100 y 1:1000. Un ml de la muestra de agua homogeneizada es adicionado a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua estéril, mezclar y pasar de esta solución 1 ml a otro tubo con 9 ml de agua estéril, mezclar, tomar finalmente otro ml y pasarlo a un tubo conteniendo también 9 ml de agua estéril, ver la figura 6.
- 2) Se vierte 1 ml de la muestra original y de cada dilución



Siembra de la muestra original y las diluciones en cajas de agar nutritivo invertidas e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. La siembra se hace por duplicado.

Figura 6. Recuento en placa; en este método se determina el número de bacterias desarrolladas en placas de agar por diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 a partir de la muestra original.

en sendas cajas de petri estériles debidamente rotuladas. Sin dilución se agrega, en cada caja, agar nutritivo fundido y enfriado a unos 40°C y se mezcla con suaves movimientos de inclinación y rotación de la caja. Las cajas deberán ser preparadas por duplicado.

3) Se deja solidificar el agar, enseguida se invierten las cajas y se incuban a 37°C durante 24 horas.

4) Se procede a contar el número de colonias con la ayuda de un lente de aumento. Únicamente se tomarán en cuenta las placas en las que el número de colonias esté entre 30 y 300; si se cuentan 340 colonias en la placa con la muestra diluida 1:10; 45 colonias con la dilución 1:100 y 6 colonias en la dilución 1:1000, el número de colonias por ml de agua sin diluir será de 4600, para este ejemplo:

$$\begin{array}{r} 6 \times 1000 = 6000 \\ 45 \times 100 = 4500 \\ 340 \times 10 = \underline{3400} \\ \hline 13900 \end{array} \qquad \frac{13900}{3} = 4600$$

## 2) Método de fermentación en tubos múltiples

La cantidad de microorganismos que se desarrollan en un medio determinado puede conocerse por diversos métodos convencionales. Es un hecho bien conocido que el recuento directo de microorganismos al microscopio tiene la ventaja de incluir en la cuenta a los microorganismos vivos y a los muertos. En cambio la evaluación en placa y la del número más probable sólo toman en cuenta a los microorganismos vivos.

La determinación de la cantidad de microorganismos por el método del número más probable (NMP) proporciona una estimación de los microorganismos vivos existentes en una muestra. Es un concepto estadístico derivado de la teoría de probabilidades aplicable a la cuantificación de microorganismos bajo ciertas condiciones imprescindibles para el uso de ésta teoría, cuyas bases son: 1) Los microorganismos se distribuyen homogéneamente y al azar en el medio que los contiene. 2) Alícuotas iguales de la muestra contendrán igual número de células. 3) Las células se comportan como entidades independientes. El método perderá exactitud si se presentan agrupaciones celulares. 4) En caso de que se encuentre una sola célula, el medio de cultivo empleado permitirá detectarla en función de su crecimiento.

La metodología ideal para la determinación del NMP está basada en la elección de una serie de diluciones de la muestra problema que manifiesten crecimiento (tubos positivos) y en los tubos de cultivo que contengan las diluciones más altas ausencia de crecimiento (tubos negativos). Si no se posee un valor presuntivo de la población de microorganismos que se encuentran en la muestra por analizar es recomendable entonces aumentar el número de diluciones seriadas a efectos de permitir una correcta determinación del número más probable.

Habitualmente se inoculan de tres a cinco tubos con la misma dilución de un banco de diluciones decimales de la muestra. Obviamente, los límites de confianza son más precisos a medida que aumenta el número de tubos sembrados por cada dilución. No obstante, es conveniente insistir que el NMP no proporciona un valor preciso sino una estimación aproximada de la población de microorganismos contenidos en una muestra. Por ejemplo, cuando la población de organismos es muy elevada el recuento en placa supera en precisión a este método; en cambio, en muestras con poblaciones bajas (menos de 10 células por gramo o ml) el método del NMP es más eficaz. El concepto desarrollado en los párrafos anteriores tiene una traducción práctica en el análisis bacteriológico del agua. De una muestra por analizar cuyo NMP de células/ml se desconosca pueden prepararse diluciones sucesivas de cualquier orden. Si de cada dilución se siembra una serie de tubos de cultivo por duplicado llegamos finalmente a una dilución en la que algunos tubos habrán recibido una o pocas células y otros que no habrán recibido ninguna. Esto podrá ser fácilmente detectable si las diluciones se han practicado sobre un medio de cultivo adecuado ó bien si se lleva a este medio una alícuota de las mismas. De hecho ambas cosas son conceptualmente equivalentes. Entoncec, si se incuban todas las series de tubos de las distintas diluciones, después de un tiempo suficiente podrá observarse enturbiamiento en todos los casos a excepción de aquéllos que no hayan recibido ninguna célula. De hecho, en estas diluciones la probabilidad de que no haya ninguna célula en la alícuota considerada será:

$$P(0) = \frac{\text{Número de tubos sin crecimiento}}{\text{Número total de tubos de la serie}}$$

Esta probabilidad viene a su vez establecida por la llamada distribución de Poisson para la cual  $P(0) = e^{-m}$ ; "e" es la base de los logaritmos neperianos y "m" es el NMP de células en la alcuata contenida en la dilución considerada con tubos positivos y negativos. Por lo tanto como  $P(0)$  puede ser determinado experimentalmente, el valor promedio será:

$$m = \ln P(0).$$

Para valores de "m" muy pequeños, próximos a la unidad, de acuerdo con la distribución de Poisson, la probabilidad de que cada tubo reci a cero células es de  $e^{-m}$ , la de que reciba 1 sola célula será:  $\frac{m \cdot e^{-m}}{1!}$

1 !

la de que reciba 2:  $\frac{m^2 \cdot e^{-m}}{2!}$

2 !

y la de que reciba n células será:  $\frac{m^n \cdot e^{-m}}{n!}$

n !

la media de la proporción de tubos que reciben una o más células es  $1 - e^{-m}$  y de ellos la fracción:

$$\frac{m \cdot e^{-m}}{1 - e^{-m}}$$

es la que recibirá probablemente una sola célula. Esta probabilidad disminuye rápidamente a medida que aumente "m". El NMP de bacterias vivas se obtiene calculando el número que con más probabilidad hubiese dado la combinación de tubos claros y turbios observados. Este cálculo puede evitarse si se planea el experimento de tal forma que se adapte a un esquema en el que previamente se han calculado los resultados más probables.

Existen tablas elaboradas para este fin que contienen solamente combinaciones de resultados que aparecen con más frecuencia y tienen significado estadístico. Las combinaciones imposibles se eliminan. También se han construido tablas del NMP que llevan calculado el error estándar y un límite de confianza del 95%. Por este método la máxima precisión se obtiene cuando  $m = 1.6$  en la dilución que se utiliza para el cálculo, que corresponda aproximadamente a la dilución en la que la mitad de los tubos resulten turbios y la mitad claros. Si la combinación de tubos positivos y negativos no se expresa en la tabla, se recomienda repetir el ensayo a partir de la muestra original; si no hay muestra original, el NMP se obtiene por aproximación a la combinación más parecida. En las tablas 1 y 2 se señalan algunos de los modelos de tablas que existen para el cálculo del NMP (1,18, 48).

Tabla 1. Este modelo muestra la tabla para el cálculo del NMP por ml de muestra para ensayos de colimetría recomendada por la legislación española. En este método se utiliza un tubo inoculado con 50 ml, 5 tubos con 10 ml, y 5 tubos con 1 ml.

1 tubo con 50 ml	5 tubos con 10 ml	5 tubos con 1 ml	NMP	Límite inferior	Límite superior
0	0	1	1	0.5	4
0	0	2	2	0.5	6
0	1	0	1	0.5	4
0	1	1	2	0.5	6
0	2	0	2	0.5	6
0	2	1	3	0.5	8
0	3	2	4	0.5	11
0	3	0	3	0.5	8
0	4	0	5	0.5	13
1	0	0	1	0.5	4
1	0	3	6	0.5	15
1	1	0	3	0.5	8
1	1	1	5	0.5	13
1	2	0	5	0.5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	69
1	4	3	28	9	85
1	4	4	23	12	101
1	4	5	43	15	117
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	101
1	5	2	54	10	100
1	5	3	92	27	217
1	5	4	161	39	150

Tabla 2. Esta modelo muestra la tabla para el cálculo del NMP por ml de muestra para el ensayo de colimetría recomendado por la legislación norteamericana. En este método se utilizan 5 tubos con 10 ml, 5 tubos con 1 ml y cinco tubos con 0.1 ml de muestra de agua.

Núm. de tubos positivos			NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%		Núm de tubos positivos			NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%	
5/10	5/1 ml	5/0.1 ml		Inf	Sup	5/10	5/1 ml	5/0.1 ml		Inf.	Sup.
0	0	0	2								
0	0	1	2	0.5	7	4	2	1	26	9	78
0	1	0	2	0.5	7	4	3	0	27	9	80
0	2	0	4	0.5	11	4	3	1	33	11	93
1	0	0	2	0.5	7						
1	0	1	4	0.5	11	5	0	0	23		70
1	1	0	4	0.5	11	5	0	1	31	11	89
1	1	1	6	0.5	15	5	0	2	43	15	110
1	2	0	6	0.5	15	5	1	0	33	11	93
2	0	0	5	0.5	13	5	1	2	63	21	150
2	0	1	7	1	17						
2	1	0	7	1	17	5	2	0	49	17	130
2	1	1	9	2	21	5	2	1	70	23	170
2	2	0	9	2	21	5	2	2	94	28	220
2	3	0	12	3	28	5	3	0	79	25	190
3	0	0	8	1	19	5	3	2	140	37	340
3	0	1	11	2	25						
3	1	0	11	2	25	5	3	3	180	44	500
4	1	0	17	5	46	5	5	2	540	180	1400
4	1	1	21	7	63	5	5	3	920	300	3200
4	1	2	26	9	78	5	5	4	1600	640	5800
4	2	0	22	7	67	5	5	5	2400		

a. Prueba presuntiva

1) Agitar la muestra original e inocular porciones de 10 ml de la muestra en tres tubos conteniendo 10 ml de caldo lactosado, preparados al doble de su concentración normal. También se deben inocular 1.0 ml y 0.1 ml de la misma muestra de agua en dos series de tres tubos cada una con caldo lactosado preparados a una concentración normal.

2) Incubar a 37°C durante 24 y 48 horas.

3) Observar a las 24 y 48 horas. La presencia de gas en cualquier tubo a las 24, se considera como una prueba presuntiva positiva. La formación de gas después de las 48 horas se considera como una prueba presuntiva negativa, ver la figura 7.

b. Prueba confirmativa

Esta prueba utiliza como fuente de inóculo a todos los tubos de fermentación con caldo lactosado que manifestaron la presencia de gas a las 24 horas.

La reinoculación de los tubos positivos de la prueba presuntiva se lleva a cabo en agar eosina azul de metileno (EMB) y en caldo lactosado bilis verde brillante (CLBVB). Cada tubo es sembrado en dos placas de EMB y en dos de CLBVB.

Las placas son sembradas por estria y los tubos por la simple transferencia de una o varias asadas del inóculo al medio de CLBVB.

En esta prueba el medio de EMB puede ser sustituido por el medio de Endo (M-Endo).

Las placas y los tubos inoculados son incubados a 37°C durante 24 horas. Si al final de la incubación se observa la producción de gas en los tubos; entonces el ensayo se considera como una prueba confirmativa positiva.

De la misma manera, si en las placas de EMB aparecen colonias rojas, pequeñas y oscuras, con centro negro y con brillo metálico, estas colonias son características de

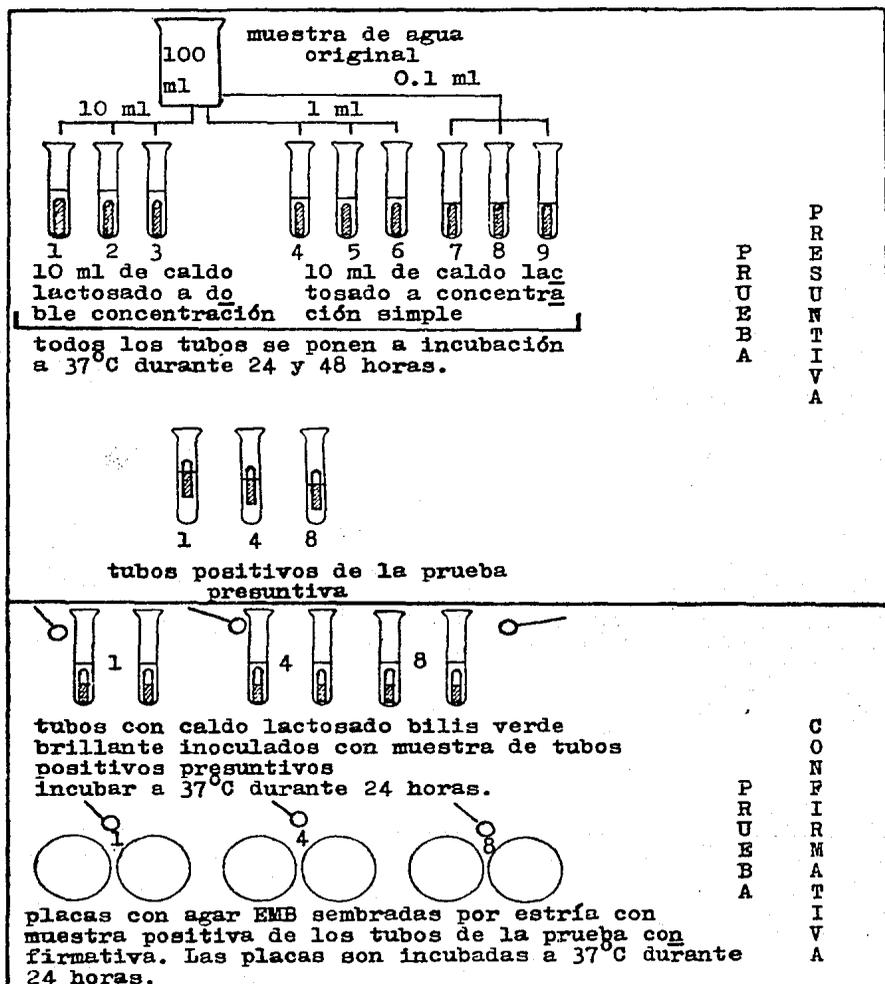


Figura 7. Procedimiento general del análisis bacteriológico de coliformes en una muestra de agua.

Escherichia; si además de éstas o en su lugar aparecen otras de color rosáceo, con centros oscuros, grandes y mucoides características de las bacterias del género Enterobacter, entonces el ensayo se considera como una prueba confirmativa positiva por la presencia de microorganismos coli-aerógenos, ver figura 7.

c. Prueba completa

Esta prueba consiste en:

1) La reinoculación de las colonias típicas de coliformes aerógenos, desarrolladas en EMB, a dos tubos de caldo lactosado y

2) La resiembra de los tubos CLVB que produjeron gas a dos placas de EMB. La resiembra de estas placas es por estía.

La formación de gas en los tubos de caldo lactosado después de la incubación permite considerar a la prueba completa como positiva.

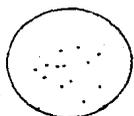
De la misma manera se aparecen en las placas de EMB colonias pequeñas y oscuras, on centro negro y con brillo metálico características del género Escherichia o si además de éstas aparecen otras de color rosáceo, con centros oscuros, grandes y mucoides características del género Enterobacter entonces la prueba se considera como positiva y confirmativa de la presencia de organismos coli-aerógenos.

El desarrollo de colonias típicas de Escherichia ó de Enterobacter en las placas de EMB corroboran la positividad de la prueba completa .

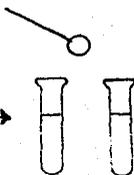
La identificación de los microorganismos coliformes se lleva a cabo mediante la coloración de Gram, ver figura 8.

d. Coloració de Gram

1) Las placas de agar EMB de la prueba completa que presenten colonias típicas de coliformes son seleccionadas para llevar a cabo la identificación. De las placas positivas se selecciona una colonia que este aislada, y con una aguja de



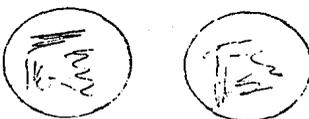
agar EMB  
con colonias  
típicas de bacte  
rias coli-aerogé  
nes



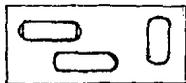
tubos con caldo lactosado  
bilis verde brillante (CLBVB).  
incubados a 37°C durante 24 horas



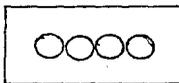
tubo de CLBVB  
positivo de la  
prueba confirmativa



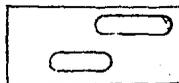
placas conteniendo agar EMB  
inoculadas del tubo positivo  
con CLBVB e incubadas a 37°C  
durante 24 horas.



A



B



C

A= prueba positiva mostrando bacilos, de color rojo Gramnegativas.

B= prueba negativa si presenta bacterias redondas en cadena.

C= prueba negativa si presenta bacilos con color azul.

Figura 8. Prueba completa que corrobora con la prueba confirmativa reconfirmando e identificando la presencia de coliformes.

inoculación estéril se transfiere una porción de la colonia a un portaobjetos limpio que contenga una gota de agua destilada.

2) La suspensión es mezclada con la punta de la aguja, se extiende sobre el portaobjetos y posteriormente se deja secar al aire.

3) Fijar el frotis por calentamiento suave y teñir.

Técnica de tinción.

1) Cubrir el frotis con una solución de cristal violeta al 2% durante un minuto (ver reactivos).

2) Después de este tiempo eliminar el exceso de colorante con agua corriente.

3) La preparación es cubierta con una solución de yodo (ver reactivos) y se deja actuar el mordiente durante un minuto.

4) Lavar con agua de la llave hasta que el disolvente fluya incoloro del portaobjetos.

5) Lavar rápidamente con acetona o con una mezcla de partes iguales de acetona y alcohol.

6) Teñir el frotis con el colorante de contraste, safranina al 25% (ver reactivos) durante 10 segundos.

7) Eliminar el exceso de safranina con agua.

8) Secar y observar al microscopio. La observación de bacilos teñidos de color rojo es considerada como una prueba positiva de la presencia de enterobacterias Gram-negativas.

e. Reactivos utilizados en la coloración de Gram

Colorante de cristal violeta. Esta solución contiene cristal violeta y oxalato de amonio. Se prepara a partir de dos soluciones independientes.

Solución A:

cristal violeta	2 g
alcohol etílico al 95%	20 ml

**Solución B:**

oxalato de amonio	0.8 g
agua destilada	80 ml

Mezclar volúmenes iguales de la solución A y B. El colorante es almacenado durante 24 horas y después es pasado a través de un papel filtro.

**Solución de yodo**

yodo	1 g
yoduro de potasio	2 g
agua destilada	300 ml

Triturar en un mortero el yodo y el yoduro de potasio y añadir agua poco a poco hasta conseguir su disolución, almacenar en una botella oscura.

**Colorante de contraste:**

Solución de safranina al 25% en alcohol etílico al 95%	10 ml
agua destilada	10 ml.

**f. Formulación de medios de cultivo**

1) Agar de Endo. Es un medio para aislamiento selectivo de coliformes y enterobacterias en general. El sulfito de sodio y la fucsina básica que contiene inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas.

**Fórmula en gramos por litro:**

peptona de carne	10.0
fosfato dipotásico	3.5
agar	15.0
lactosa	10.0
sulfito de sodio	2.5
fucsina básica	0.5
agua destilada cbp	1000 ml

pH final 7.4

**Preparación:**

Suspender 41.5 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante

un minuto. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Una vez esterilizado enfriar a unos 40°- 45°C y vaciar en cajas de petri.

Los gérmenes fermentadores de lactosa producen colonias rojas características, con o sin brillo metálico, pudiéndose presentar un enrojecimiento bien marcado del medio. En cambio las bacterias no fermentadoras de la lactosa como Salmonella y Shigella no cambian el color del medio y son casi incoloras o de un color rosa pálido. Shigella sonnei, que fermenta lentamente la lactosa, puede producir colonias que al principio son claras, tornándose después en rosadas.

2) Agar eosina azul de metileno (EMB), es un medio selectivo para la investigación y diferenciación de bacilos entéricos y microorganismos coliformes.

Fórmula en gramos por litro:

peptona de gelatina	10.000
lactosa	10.000
fosfato dipotásico	2.000
agar	15.000
eosina	0.400
azul de metileno	0.065
agua destilada cbp	1000 ml

pH 7.1

Preparación:

Suspender 37.5 g del medio deshidratado en un litro de agua, mezclar bien hasta obtener una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. El agar líquido estéril a 45°C se agita suavemente antes de vaciar en cajas de petri.

3) Agar nutritivo. Es un medio de uso general en el laboratorio, no selectivo y adecuado para el cultivo de microorganismos poco exigentes.

Fórmula en gramos por litro:

peptona de gelatina	5.0
extracto de carne de res	3.0
agar	15.0
agua destilada cbp	1000 ml

pH 6.8

Preparación:

Suspender 23 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Remojar unos 15 min, mezclar y calentar a ebullición de 1 a 2 min hasta disolver el producto. Distribuir y esterilizar a 121°C, durante 15 min.

4) Caldo lactosado. Este medio es recomendado por la APHA y otras autoridades sanitarias para investigar la presencia de coliformes en agua.

Fórmula en gramos por litro:

peptona de gelatina	5.0
extracto de carne de res	3.0
lactosa	5.0
agua destilada cbp	1000 ml

pH 6.9

Preparación:

Suspender 13 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada o si es necesario preparar más concentrado en el medio. Disolver y distribuir en tubos de ensayo grandes. Esterilizar a 121°C durante 15 min y enfriar lo más rápido posible.

5) Caldo verde brillante bilis al 2%, es un medio de cultivo selectivo recomendado por el APHA para descubrir coliformes en el agua.

Fórmula en gramos por litro:

bilis de buey deshidratada	20.0
lactosa	10.0
peptona de galatina	10.0
verde brillante	0.0133
agua destilada cbp	1000 ml

pH 7.2

#### Preparación:

Suspender 40 g del medio deshidratado en un litro de agua agitando frecuentemente para disolver el producto. Distribuir volúmenes de 10 ml en tubos de ensayo grandes, inocularlos por porciones de 1 ml del producto de estudio. Para analizar porciones de 10 ml del producto disolver 60 g del medio deshidratado en agua destilada y envasar en volúmenes de 20 ml. Esterilizar a 121°C durante 15 min. (1, 4, 5, 8, 14, 16, 19, 39, 40, 42, 48).

#### IV Detección e identificación de Estreptococos en muestras de agua marina

Los estreptococos son microorganismos que se encuentran habitualmente en el tracto intestinal del hombre y de los animales. Estos microorganismos son arrojados por las heces fecales y por esta razón pueden llegar a contaminar el mar cuando las aguas negras son vertidas sin tratamiento alguno, a las zonas costeras. La presencia de estos microorganismos en el agua de mar es considerada como una prueba de la contaminación del agua por heces fecales.

Los estreptococos pueden sobrevivir más tiempo que los coliformes en soluciones con altas concentraciones de sales. Por esta razón su presencia ha sido fácilmente detectada en el agua de mar de las zonas costeras e incluso a grandes distancias de la costa (1, 13, 16, 18, 19, 44, 47, 48, 52, 53). La detección e identificación de estreptococos en aguas marinas complementa el análisis bacteriológico de la presencia de coliformes y corrobora la contaminación por heces fecales.

##### a. Metodología y medios de cultivo

El análisis bacteriológico para determinar la presencia de estreptococos en muestras de agua marina es semejante al de los coliformes, consta de tres pruebas: presuntiva, confirmativa y completa. Sin embargo, los medios de cultivo

utilizados en este ensayo son diferentes. Estos medios son:  
 1) caldo glucosa y azida (AD), 2) caldo de azida y  
 etilvioleta (EVA) y 3) placa de gelosa-esculina-azida (PSE).  
 1) Caldo de glucosa y azida (AD)

Fórmula:

extracto de carne	4.5 g
triptona o polipeptona	15.0 g
glucosa (dextrosa)	7.5 g
cloruro de sodio	7.5 g
azida de sodio, $\text{NaN}_3$	0.2 g
agua cbp	1 litro

Disolver los ingredientes y distribuir volúmenes de 10 ml en  
 tubos de ensayo, tapar y esterilizar en autoclave a  $121^\circ\text{C}$   
 durante 15 min. El pH debe ser de 7.2 después de la  
 esterilización. Cuando se inoculen 10 ml de muestra de agua  
 preparar el medio con doble concentración.

2) Caldo de azida y etilvioleta (EVA)

Fórmula:

triptona	20.0	g
glucosa	5.0	g
cloruro de sodio	5.0	g
fosfato dibásico de potasio, $\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.7	g
fosfato monobásico de potasio $\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.7	g
azida de sodio, $\text{NaN}_3$	0.40093	g
violeta de etilo	0.00083	g
agua cbp	1 litro	

Disolver los ingredientes y distribuir volúmenes de 10 ml en  
 tubos de ensayo, tapar y esterilizar en autoclave a  $121^\circ\text{C}$   
 durante 15 min. El pH debe ser 7.0 después de la esteriliza-  
 ción.

### 3) Gelosa-esculina-azida (PSE)

Fórmula:

Gelosa selectiva Pfiser para estreptococos (PSE) ó Gelosa-esculina-azida

peptona	17.0 g
peptona B	3.0 g
extracto de levadura	5.0 g
bilis verde brillante	10.0 g
cloruro de sodio	5.0 g
citrate de sodio	1.0 g
esculina	1.0 g
citrate férrico amónico	0.5 g
azida de sodio $\text{NaN}_3$	0.25 g
agar	15.0 g
agua cbp	1 litro

Mezclar los ingredientes y esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Distribuir volúmenes de 15 ml en cajas de petri estériles, dejar solidificar a temperatura ambiente y guardar las placas en forma invertida en refrigeración.

El pH del medio debe ser de 7.1

#### b. Prueba presuntiva

Inicialmente se homogeneiza la muestra de agua por agitación manual. Posteriormente se mezclan 10 ml de la muestra original con 10 ml de caldo de glucosa azida (AD). Ver la figura 9. Todos los tubos son incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas; no obstante, es aconsejable realizar una observación a las 24 horas de incubación. Los tubos que presenten turbidez después del periodo de incubación se consideran como positivos e indican la posible presencia de estreptococos en la muestra de agua analizada. Con el fin de corroborar la presencia de estreptococos estos tubos son analizados para llevar a cabo la prueba confirmativa, ver la figura 9.

c. Prueba confirmativa

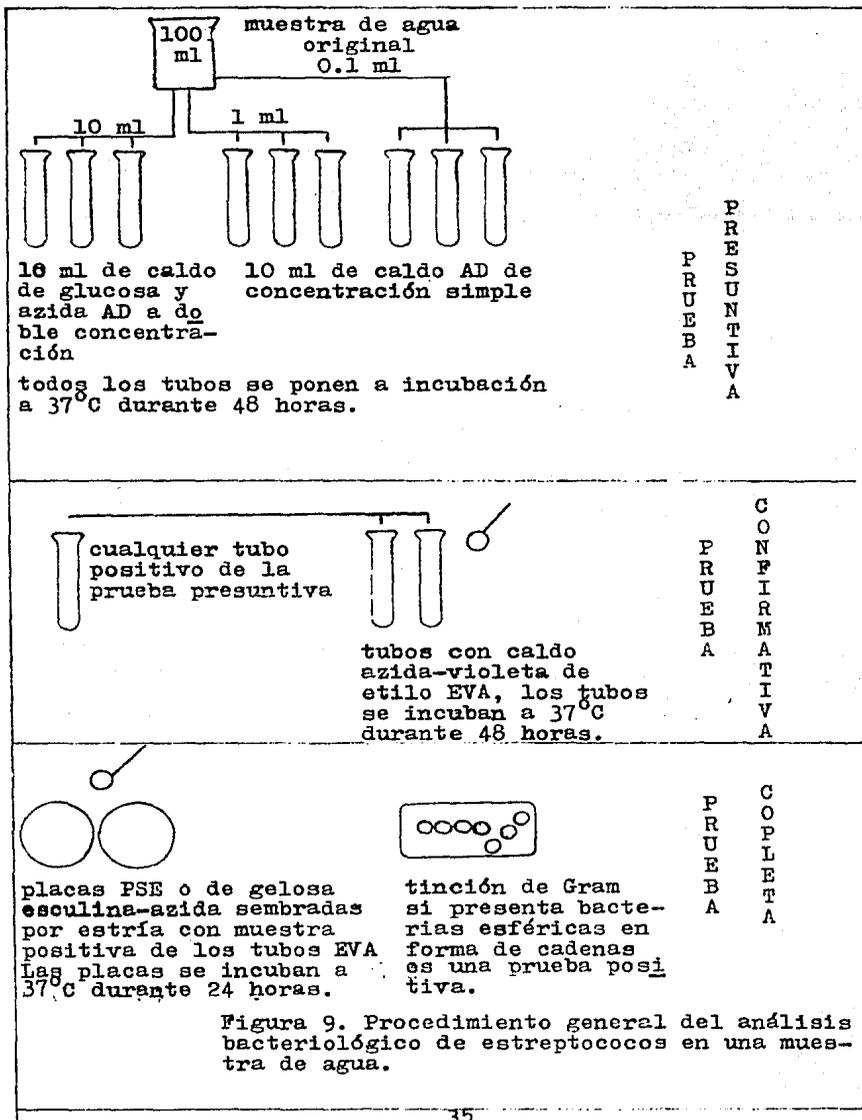
Cada uno de los tubos positivos de la prueba presuntiva son inoculados en dos tubos que contengan 10 ml de caldo azida-violeta de etilo (EVA) y se incuban a 37°C. Aquellos que presenten turbidez y sedimento de color rojo ladrillo son considerados como positivos.

d. Prueba completa

Decada uno de los tubos positivos de la prueba presuntiva, sembrar por estría en una placa de PSE o de gelosa esculina-azida. Incubar en posición invertida a 37°C durante 24 horas. Las colonias que presenten color castaño-negras con halos de color café confirman la presencia de estreptococos fecales. Para la observación de estreptococos, tomar con una aguja de inóculo estéril una colonia aislada y colocarla en un portaobjeto limpio para la coloración. Seguir las indicaciones de la coloración de Gram. Si se encuentran bacterias esfericas en forma de cadenas, entonces se muestra la presencia de estreptococos Grampositivos.

V. Preparación de muestras de moluscos para su análisis bacteriológico

Inicialmente se hace una descripción del aspecto general que presenta el tipo de moluscos que se va a analizar, se anotan también las condiciones en que fueron recibidos, el olor que despiden y la temperatura del agua donde se encontraban. Por ejemplo, si son ostras, estas se limpian y se enjuagan abundantemente; abrir las conchas con un cuchillo estéril y se colecta el líquido que contienen. Este líquido es diluido con una cantidad conocida de agua estéril que contenga cloruro de sodio al 2%. El líquido es utilizado directamente en el análisis bacteriológico para coliformes y estreptococos. El análisis bacteriológico de este líquido es idéntico al descrito previamente para coliformes y para estreptococos, ver figuras 7 y 9. (1,4).



## VI Bacteria enteropatógenas (Salmonella y Shigella) contaminadoras de aguas costeras.

Las enfermedades gastrointestinales agudas representan una de las principales causas de muerte en el Mundo. En el período comprendido entre 1978 y 1970, se observaron tasas de mortalidad de 1400 a 2000 defunciones por millón de habitantes en Honduras, El Salvador y México (47). En los continentes de Asia, Africa y América Latina la cantidad de niños menores de cinco años fallecidos en 1970 por ingerir alimentos o agua contaminada con Salmonella, Shigella y Escherichia enterocolitica fue de 5 a 18 millones. En todos estos casos la principal fuente de contaminación del agua o de los alimentos fue el excremento intestinal humano o animal. Las heces fecales de un individuo portador de Salmonella puede llegar a contener hasta  $10^{11}$  bacterias por gramo de materia fecal. La cantidad de bacterias que se requieren para provocar la salmonelosis en el humano es de  $10^5$  a  $10^7$  (13,20). Si por cualquier circunstancia el excremento fecal de individuos infectados es vertido a las aguas costeras se incrementa la posibilidad de que la infección se propague rápidamente y se difunda, incluso a núcleos poblacionales más alejadas de la costa (28).

Por esta razón es conveniente incluir en todo análisis bacteriológico del agua de mar, las pruebas que sean necesarias para detectar a la brevedad posible, la presencia de estos microorganismos patógenos.

Los géneros Salmonella y Shigella pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceas. Las bacterias de estos géneros son las principales causantes de las enfermedades gastrointestinales: la fiebre tifoidea y la disentería bacilar. Los miembros del género Salmonella son resistentes a las bajas temperaturas y pueden sobrevivir aun en alimentos congelados. También son resistentes a las temperaturas altas ( $60-75^{\circ}\text{C}$ ) y crecen aún en medios que contengan grandes concentraciones

de cloruro de sodio. Son capaces de sobrevivir en soluciones ácidas tales como de ácido acético al 10% hasta 18 horas y permanecen viables durante varias semanas en el agua de los pozos.

En las membranas de los moluscos como ostras y mejillones sobreviven hasta 15 días.

Las bacterias del género Shigella pueden sobrevivir hasta 15 días, encontrándose en objetos tales como vasijas, verduras y frutas. También sobreviven en agua dulce hasta una semana, en agua de mar sobreviven poco tiempo; sin embargo pueden contaminar a los moluscos penetrando en sus membranas de filtración y sobrevivir hasta 15 días (5,19,20,21,35, 42 y 55).

Los géneros bacterianos antes mencionados (Salmonella y Shigella) pueden ser detectados y aislados en muestras de agua de zonas costeras por medio de cultivos utilizados en los laboratorios de diagnóstico. Estos medios de cultivo son: Medios sólidos: Agar entérico Haktoen, Agar eosina y azul de metileno (EMB), Agar Endo, Agar XLD, Agar Salmonella y Shigella (SS) y Agar verde brillante.

Medios de enriquecimiento (líquido): Base de caldo tetratio-nato y caldo selenito y cistina.

Medios para identificación: Agar hierro y triple azúcar (TSI), medio para registrar sulfuro de hidrógeno, indol y motilidad (SIM), Agar hierro y lisina (LIA), medio de MIO y Agar Citrato de Simmons (1,3,13,14,16,44), ver tabla 3 y 4 el desarrollo de las bacterias Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Klebsiella sp., Salmonella typhi y Shigella sp., y sus características típicas de colonias en medios de cultivo selectivos planos. Se muestra también un diagrama general para el aislamiento de Salmonella y Shigella en una muestra de agua, ver la figura 10.

Figura 10. Procedimiento general para el aislamiento de bacterias enteropatógenas en una muestra de agua.

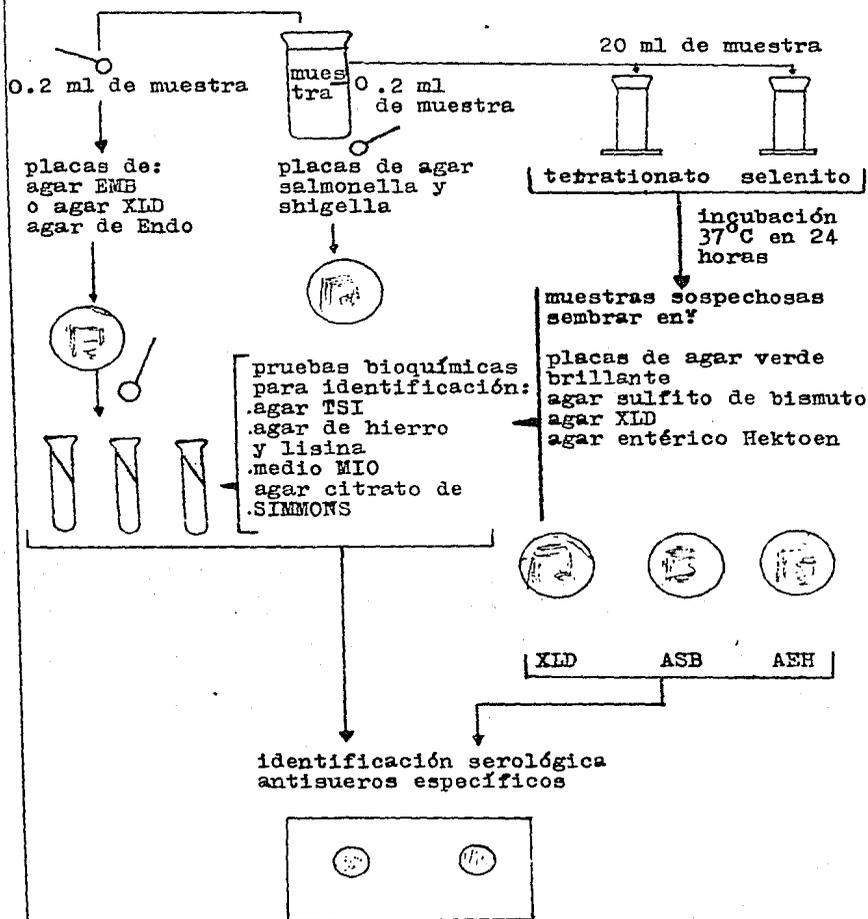


Tabla 3. Aspecto de las colonias de microorganismos entéricos: géneros Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella y Shigella, en medios selectivos planos

Medios de cultivo	Escherichia coli	Enterobacter Klebsiella	Salmonella typhi	Shigella
Agar EMB	Planas, de color púrpura con brillo metálico	Azul claro, ocasionalmente con brillo metálico en el centro deprimido	Incoloras, transparentes	Pequeñas, redondas, transparentes, incoloras
Agar SS	Inhibidas; pueden desarrrollarse como grandes colonias opacas de color rosa ó rojo	Inhibidas; colonias blanco ó crema, opacas, grandes	Incoloras; pueden tener un aspecto tostado, rosado, amarillo	Incoloras transparentes de 2 a 7 mm
Agar sulfato de bismuto	Inhibidas; grandes, resplucientes, de color marrón mucoides	Inhibidas; colonias elevadas, mucoides lenticulares	Negras con superficie metálica rodeada por zona marrón las colonias sub-superficiales no tienen brillo	Colonias inhibidas lisas, brillantes, de color verde suave u oscuro. Algunas tienen forma ameboides

Tabla 4. Aspecto de las colonias de microorganismos entéricos: géneros Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella y Shigella, en medios selectivos planos.

Medios de cultivo	Escherichia coli	Enterobacter Klebsiella	Salmonella typhi	Shigella
Agar  X I D	Inhibidas; colonias planas, secas, de color amarillo limón. Zona amarilla opaca en el agar circundante	Elevadas colonias mucoides de color limón zona opaca amarilla en el agar circundante	Colonias planas rojas con grandes centros negros; brillantes; zona roja clara en el agar circundante	Colonias transparentes, rodeadas de una zona roja transparente en el agar
Agar para entéricos de Hektoen	Inhibidas; pueden resultar de color naranja brillante a salmón rosado	Igual que E. coli	Azul a azul verde y varía en tamaño. Los productores de SH <sub>2</sub> poseen centros negros	Verdes; la periferia de las colonias con frecuencia mayor que la porción central.

VII. Referencias Bibliográficas.

- 1.-American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater. 15 th edition; APHA/AWWA/WPCP, Wshigton, 1980.
- 2.-Brock, T.D. Principles of Microbial Ecology. Prentice, Hall, Inc/englewood Cliffs New Jersey, 1966. 306 p
- 3.-Bioxon, Medios de cultivo y Reactivos de Diagnostico. Bioxon de México, S.A., 1986.
- 4.- Bryan, A.H. y Byan, Ch. G. Bacteriología, Edit. C.E.C.S.A. México, 1986.
- 5.- Burdon, K.L. y Williams, P.R. Microbiología. Publicacio new Cultural, México, 1971. pp 357-367
- 6.- Butrico, F.D. Problemas de la Contaminación del Agua. En: I Reunión Nacional sobre Problemas de Contaminación Ambiental. Tomo I, Unidad de Congreso del Centro Médico Nacional, México, del 14 al 19 de Enero de 1973.
- 7.- Carlucci, A.F. y Pramer, D. Factors Influencing the Plate Method for Determinig Abundance of Bacteria in Sea Water. Proc. Soc. Exp. Med. E.U., 1957.
- 8.- Carpenter, P.L. Microbiología. Edit Interamericana. México, 1976.
- 9.- Castellvi, J. Ecología Marina. Fundación la Salle. Ciencias Naturales. Edit. DOSSAT, S.A. Caracas Venezuela, 1973.
- 10.- Chávez, C.J. Administración de las Zonas Costeras Mexicanas. En: Ciencia y Desarrollo. Num. 71, Año XII, México, 1986.
- 11.- Chávez, S.G. Elementos de Oceanografía. Edit. Continental, S.A. México, 1978. 256 p

- 12.- Clarke, L.G. Elementos de Ecología. Ed. OMEGA. Barcelona, 1963. pp. 115-150
- 13.- Davis, B.D., Dulbeco, R., Eisen, H.N y Ginsberg, H.S. Tratado de Microbiología. Ed. OMEGA. España, 1980. pp. 778 804
- 14.- Davidsohn, I y Henry, J.B. Diagnostico Clínico por el Laboratorio. Ed. Salvat. España, 1983. 1484 p
- 15.- De Lara, A.R. Evaluación de los recursos ostrícolas de las lagunas de Mecucacán, Machona y Carmen Tabasco. Tesis Profesional. Fac. Ciencias, UNAM., 1972.
- 16.- Edwards, P.R. and Ewing, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. 3th. ed., Burges, Minneapolis, 1972.
- 17.- Geldreich, E.E. Handbook for evaluating water bacteriological laboratories. 2a. Ed. U.S. Environmental Protection Agency, 1975. 195 p
- 18.- Guinea, J., Sancho, J. y Pares, R. Análisis Microbiológico de Aguas Aspectos Aplicados. Ed. Omega. Barcelona, 1979. 122 p
- 19.- Gernez, Ch., Ricux y Gervois. Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Ed. LIMUSA, 1983. 534 p
- 20.- Kumate, J. y Gutiérrez, G. Manual de Infectología. Ed. M.C., 1986. pp 34-58
- 21.- Kampelmacher, E., and Moorle, V.L. Salmonella its presence in end renewal from a wastewater system. J. Water Poll. Contr. Fed. U.S., 1970. 42:2060-2073
- 22.- Kemmer, F.N. y Mc Callion, J. Manual del Agua su Naturaleza Tratamiento y Aplicaciones. Ed. Mc Graw-HILL. México, 1983.
- 23.- Ketchum, B.H., Ayers, J.C. y Vaccaro, R.F. Processes Contributing to the decrease of coliform bacteria in a tidal estuarine Ecology, 1952. 33:247-258
- 24.- Korringa, P. Marine Pollution and its. biological consequences, IV Congreso Nacional de Oceanografía. Ed. Galache, México, 1972. pp 301-309

- 25.- Kaneko, T. and Colwell, R.R. Ecology of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay. J. Bacterial, 1973. 113:24-32
- 26.- Romero, J.J. y Rodríguez, S.H. Niveles Actuales de Contaminación Coliforme en el Sistema Lagunar del Carmen-Machona, Tabasco. An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nac. Auton. México, 9(1): 121- 126, 1982.
- 27.- Rodríguez, S.H. y Romero, J.J. Niveles de contaminación en dos Sistemas Fluvio- Lagunares Asociados a Laguna de Términos, Campeche. An. Ins. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autóm. México, 8(1):63-68, 1981.
- 28.- Rhinheimer, G. Microbial Ecology of a Brackish Water Environment Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1977.
- 29.- Llera, D.E. Temas para un futuro Biólogo. Editado por la Dirección de Publicaciones, UNAM, México, 1984. pp 519-548
- 30.- Margalef, R. Ecología. Ed. Omega España, 1977. 736 p
- 31.- Mason, J.O. Mc Lean, W.E. Infectious Hepatitis traced to Consumption of raw Oysters. Am. Jour. Hgg. 75:90-110, 1962.
- 32.- Mood, W.E. Aspectos Sanitarios de la Contaminación de las Aguas Costeras. Comisión Oceanográfica Intergubernamental, UNESCO, 1977.
- 33.- Nusbaum, I. y Garner, R.M. Survival of Coliform organisms in Pacific Coastal Waters. This Journal, 27:1383-1385, 1955.
- 34.- Odum, E.F. Ecología, Ed. Interamericana, México, 1972.
- 35.- Piatkin K. y Krivoshein, Yu. Microbiología. Ed. MIR Moscú, 1981.
- 36.- Pramer, D., Carlucci, A.F. y Scarpino, P.V. The Bactericidal Action of Sea Water. Marine Microbiology Waltham, Mass. Chronica Botanica Co. 1960. 567- 571

- 37.- Roos, B. Hepatitis Epidemic Conveyed by Osters. Svenska Lakartidningen. Institute of Health Bethesda, Maryland. 53:989-1003, 1956.
- 38.- Morita, Z.Y. and Zobell, C.E. Occurrence of Bacteria in pelagic Sediments Collected During the Mid Pacific Expedition. Deep-Sea, 1955. 3:66-73
- 39.- Pelczar, M.J. y Chan, E.C. Elementos de Microbiología. Ed. Mc Graw-Hill, México, 1984. pp 531-664
- 40.- Rodina, A.G. Methods in Aquatic Microbiology. Ed. by R.R Colwell and Zambruski, M.S. University Park Press, Baltimore, 1972.
- 41.- Russel-Hunter, W.D. Productividad Primaria. Ed. Acribia España, 1973. 275 p
- 42.- Salle, A.J. Bacteriología. Ed. Interamericana, México, 1965
- 43.- Seeley, H.V. Microbes in Action, a Laboratory Manual of Microbiology. W.H. Freeman and Company. San Francisco, 1962.
- 44.- Shaffer, J.G. y Milton, G. Microbiología Médica. En: Diagnostico Clinico por el Laboratorio. Ed. Salvat. Barcelona, 1983. pp 947-1048
- 45.- Schlegel, H.G. Microbiología General. Ed. OMEGA. Barcelona, 1975.
- 46.- Schwoerbel, J. Métodos de Hidrobiología, Ed. Blume. Madrid, 1975. pp 199-215
- 47.- Manual de Bacteriología Médica. Academia de Profesores de Bacteriología Médica, Esc, Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México, 1983. 364 p
- 48.- Secretaría de Agricultura y de Recursos Hidráulicos. Dirección General de Usos del Agua y Prevención de la Contaminación. Subdirección de Investigación y Entrenamiento. Manual de Microbiología del Agua. Vol. 1o., 3a. Edición, México, 1984.
- 49.- Secretaría de Agricultura y de Recursos Hidráulicos.

Dirección General de Usos del Agua y Prevención de la Contaminación. Subdirección de Investigación y Entrenamiento. Técnicas de Muestreo de Aguas y Determinación en el Campo. México, 1982.

50.- Secretaría de Agricultura y de Recursos Hidráulicos. Subsecretaría de Planeación. Dirección General y Protección y Ordenación Ecológica, Subdirección de Ingeniería.

Estudio de la Calidad del Agua y su Evaluación para la Certificación Sanitaria en Zonas de Explotación de los Recursos Marinos, Lacustres. Lagunas de Tamiahua, Pueblo Viejo y Alvarado. Tomo II, México, 1981.

51.- Van Donsel, D. y Geldreich. Relationships of Salmonellae to fecal Coliform in Bottom Sediments. Water Res.

5:1079-1087, 1971.

52.- Volterra et al. Comparison of Methods to Detect fecal Streptococci in Marine Wated Wates Air Soll Pollut, 1985. 26(2):201-210

53.- Volterra et al. Microbiological Pollution of Marine Sediments in the Swthern Strecht et the Gulf of Naples. Water Air Soll Pollut. 1985. 26(2): 175-184

54.- Walter, Mc Bee, Temple. Introducción a la Microbiología. Ed. CEGSA., México, 1984.

55.- Domínguez, P.S. Estudio Comparativo de la Calidad Reglamentaria y Ecológica de las Aguas Costeras en la Bahía de Acapulco, Gro. y Proximidades (Noviembre de 1978 a Marzo de 1979). Tesis de Posgrado Inst. Cienc. Del Mar y Limnol. UNAM. 153 p