

**Reducción de las poblaciones de *Enterococci*
spp. por la presencia del Caracol Reina
(*Strombus gigas*) en la interfase bentónica de
los esteros marinos de Utila, Islas de la Bahía,
Honduras**

Lucía Consuelo Orantes Cabrera

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2007

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Reducción de las poblaciones de *Enterococci* spp. por la presencia del Caracol Reina (*Strombus gigas*) en la interfase bentónica de los esteros marinos de Utila, Islas de la Bahía, Honduras

Tesis presentada como requisito parcial
para optar al título de Ingeniera Agrónoma
en el grado académico de Licenciatura.

Presentado por:

Lucía Consuelo Orantes Cabrera

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

La autora concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Lucía Consuelo Orantes Cabrera

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

Reducción de las poblaciones de *Enterococci* spp. por la presencia del Caracol Reina (*Strombus gigas*) en la interfase bentónica de los esteros marinos de Utila, Islas de la Bahía, Honduras

Presentado por:

Lucía Consuelo Orantes Cabrera

Aprobada

María Mercedes Roca, Ph.D.
Asesora Principal

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Fitotecnia

Steve Box, Ph.D.
Asesor

Miguel Vélez, Ph.D.
Director de la Carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria

Estela Aguilar, M.Sc.
Asesora

Raúl Espinal, Ph. D.
Decano Académico

Daniel Meyer Ph.D.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Leonel Mejía y Ana Victoria Rivera, por enseñarme que la distancia no es una excusa para perder una amistad.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser incondicional.

A mis padres, Juan Carlos y Olga, por enseñarme las cosas que no se aprenden en el salón de clases.

A mi hermana por apoyarme en mis decisiones y estar siempre conmigo.

A la Asociación de Graduados de la Escuela Agrícola Panamericana capítulo Internacional (AGEAP Internacional) y el Sr. Cristian Rodríguez por creer en mí y apoyarme económicamente durante mi último año académico en Zamorano.

Gracias a mis amigos por vivir conmigo las cosas más trascendentales. Un especial agradecimiento a Andrés y Amanda por ser las personas con las que más compartí y aprendí durante mi tiempo en Zamorano.

A mis asesores: Steve, little Steve, Estelita y la Dra. Roca, por la paciencia, el cariño y el ejemplo.

A toda clase 07, por haberse ganado un lugar en el corazón.

RESUMEN

Orantes Cabrera, L. 2007. Reducción de las poblaciones de *Enterococci* spp. por la presencia del Caracol Reina (*Strombus Gigas*) en las interfase bentónica de los esteros marinos. Proyecto especial de graduación para el programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 13 p.

El Caracol Reina (*Strombus gigas*) es un producto de importancia comercial en Honduras. En 1998 el conteo promedio de *S. gigas* en el caribe hondureño era de siete individuos ha^{-1} , contrastando con los años 70 cuando las poblaciones promediaban más de 1,000 individuos ha^{-1} . Actualmente, el *S. gigas* es considerado especie en peligro de extinción. El objetivo del proyecto fue estudiar la capacidad del caracol para filtrar la interfase agua-arena de los esteros marinos utilizando las bacterias *Enterococci* spp. como indicadores de eficiencia. Un segundo objetivo fue determinar si existe riesgo de contaminación cruzada de *Enterococci* spp. al momento del sacrificio del caracol que implique un riesgo para la inocuidad alimentaria del producto. Para el experimento se utilizaron 16 *S. gigas* colocados en cuatro parcelas de 10 m^2 con cuatro caracoles en cada una. Se tomaron muestras por 9 días consecutivos en la interfase agua-arena y en la columna de agua, realizando el sacrificio artesanal de los caracoles al décimo día del experimento. Se utilizó el método de Quimioluminiscencia (QL) con la Tecnología de Sustrato Definido (DST) Enterole[®] para la cuantificación de *Enterococci* spp. de las muestras. La diferencia entre el primero y el octavo día de muestreo en la parcelas con caracoles fue de una reducción significativa de 78.5% UFC de *Enterococci* spp., contrastando con el incremento de 1.2% en las repeticiones sin caracol. También se comprobó que en las vísceras de estos hay presencia de *Enterococci* sobrepasando las 700 UFC en las muestras más contaminadas. El *S. gigas* es capaz de reducir las poblaciones de *Enterococci* spp. en espacios limitados de la interfase agua-arena (bentónica) de los esteros marinos. Los caracoles pueden ser agentes infecciosos de enfermedades humanas debido a la contaminación cruzada durante el sacrificio.

Palabras clave: Biorremediación, cuantificación bacteriana, filtro ambiental, indicadores de calidad de agua, quimioluminiscencia, Tecnología de Sustrato Definido, toxicidad alimentaria.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Hoja de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Contenido.....	vii
Índice de cuadros.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Índice de anexos.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
CONCLUSIONES.....	12
RECOMENDACIONES.....	13
LITERATURA CITADA.....	14
ANEXOS.....	16

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Descripción de los tratamientos utilizados en los esteros de la isla de Utila para el experimento con <i>Strombus gigas</i> , Honduras.....	4
2. Resultados e indicadores de los tratamientos contaminado y no contaminado según la presencia del <i>Strombus gigas</i> , isla de Utila, Honduras.....	6

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Localización de la isla de Utila, Honduras, con respecto al resto del continente Americano.....	2
2. Localización de los tratamientos y sitios muestreados, isla de Utila, Honduras.....	3
3. Población de <i>Enterococi</i> spp. en la interfase agua- arena del sitio contaminado (Bay House), isla de Utila, Honduras.....	8
4. Tendencia de la población de <i>Enterococci</i> spp. en el agua del sitio contaminado (Bay House), isla de Utila, Honduras.....	8
5. Poblaciones de <i>Enterococci</i> spp. en la interfase agua-arena del sitio no contaminado (Trade Winds), isla de Utila, Honduras.....	9
6. Niveles de <i>Enterococci</i> spp. en las vísceras de los caracoles sometidos al tratamiento contaminado (“Bay House”), no contaminado (“Trade Winds”) y al momento de colección (“Fondo del mar”).	10
7. Nivel de <i>Enterococci</i> spp. determinado por muestreos aleatorios en tres ecosistemas de de la microcuenca en la isla de Utila, Honduras.....	11
8. Destrucción de manglares para crear áreas de vivienda, Utila, Honduras....	11

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Diagrama ecológico mostrando los puntos de muestreo: interfase bentónica y la columna de agua.....	16
2. Imagen de las bandejas cuantificables de IDEXX [®] positiva para <i>Enterococci</i> spp.....	16
3. Protocolo de Enteroleit [®] de IDEXX [®] para detección de <i>Enterococci</i> spp.....	17
4. Lista de especies para el género <i>Enterococcus</i>	21
5. Glosario.....	22

INTRODUCCIÓN

El Caracol Reina (*Strobus gigas*) es el gastrópodo de mayores dimensiones del Caribe (Hensen 1994), distribuyéndose desde el sur de la Florida hasta las costas venezolanas (CITES 2004). Se encuentra en pastos marinos superficiales y en arrecifes a profundidades de 12 a 23 m (Hensen 1994). Puede vivir entre 40 a 48 años, siendo útil para la pesca comercial después de los diez años de edad (Randall 1964).

En Honduras, el *S. gigas* es un producto de alta demanda en mercados de exportación y locales (FAO 2006). Durante el auge de exportación en los años 1991 al 2003, el país tuvo incrementos anuales del 27% en el comercio de *S. gigas* (CITES 2004), y una merma consecuente de población adulta de 21.3% anual (Morales 2003). En 1998 el conteo promedio en Honduras era de siete individuos ha⁻¹ (Tewfik *et al.* 1998), contrario a los años 70 cuando las poblaciones en el Caribe promediaban por encima de los 1,000 individuos ha⁻¹. En el año 2003 la Convención Internacional para la Trata de Especies en Peligro (CITES) catalogó al *S. gigas* especie en peligro de extinción, vedando la exportación del caracol desde Honduras (CITES 2004). En el 2006 la Secretaria de Agricultura y Ganadería (SAG) emitió un decreto que prohíbe la captura permanente del caracol (FAO 2006) justificando que no existe suficiente investigación para determinar una cuota comercial que proteja al *S. gigas* de la extinción.

El *S. gigas* tiene un valor alto en la ecología marina ya que actúa como organismo de biorremediación, crucial para regular poblaciones de microorganismos causantes de cascadas tróficas en arrecifes coralinos y bentos (Stoner *et al.* 1995). Se alimenta de detritos, epifitas del pasto marino, microalgas y microorganismos encontrados en la arena (Randall 1964; Hensen 1994). No obstante, no existe suficiente investigación sobre la efectividad del *S. gigas* como biodigestor de patógenos humanos acumulados en los bentos de los esteros marinos.

El género *Enterococcus* se compone de bacterias anaeróbicas facultativas, resistente a variaciones de salinidad (Fischetti *et al.* 2000), altamente resistentes a antibióticos (Ryan y Ray 2004) y asociadas a enfermedades por contaminación fecal humana (Fischetti *et al.* 2000). Por su estabilidad, se utilizan como indicadores estándar de la calidad de aguas en las playas públicas alrededor del mundo (Jin *et al.* 2004).

El objetivo del proyecto fue estudiar la capacidad del caracol como organismo biorremediador para filtrar la interfase agua-arena (superficie bentónica) de los esteros marinos utilizando las bacterias *Enterococci* spp. como indicadores de eficiencia. Como segundo objetivo se determinó si existe riesgo de contaminación cruzada de *Enterococci* al momento del sacrificio del caracol que implique un riesgo para la inocuidad alimentaria del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El proyecto se realizó en Utila, Islas de la Bahía, Honduras durante enero de 2007. Se escogió la isla de Utila por su variedad de ecosistemas marinos (arrecifes, bentos, pastos) y terrestres (manglares, costas, bosque y lagunas) que han sido perturbados por el hombre. Para los experimentos se seleccionaron dos sitios de muestreo: 1) “Bay House”¹, sitio céntrico de alta contaminación por descarga fecal humana y bajo flujo de agua; y 2) “Trade Winds”², sitio aislado, de baja contaminación y baja descarga (Figura 2; Cuadro 1).



GoogleEarth™. 2007. Mapa de Norte América. DigitalGlobe©.

Figura 1. Localización de la isla de Utila, Honduras, con respecto al resto del continente Americano.

¹ Profundidad de 1.60 m, dirección del viento entrando por el Noreste (NE) de la isla, con velocidad de corriente de ± 63 m h⁻¹ y penetración de luz completa. El experimento se estableció en la época de tormentas con continuo efluente de aguas residuales. Es un sitio de alta descarga y actividad humana.

² Profundidad de 1.70 m, dirección del viento NE, velocidad de corriente ± 884 m h⁻¹ y penetración de luz de 1.70 m. El experimento se estableció en la época de tormentas, con pocos efluentes. Es un sitio de baja descarga y actividad humana.

Establecimiento del experimento y muestreo de campo. Se capturaron 16 caracoles *S. gigas* adultos entre 15 y 25 m bajo agua de forma aleatoria alrededor de la isla. En cada sitio de muestreo se establecieron cuatro parcelas a seis metros de distancia entre sí; dos correspondientes a repeticiones con caracol y dos a repeticiones sin caracol denominados como controles. En las dos repeticiones se coloraron cuatro caracoles restringidos con hilo de pescar a un bloque de concreto central. Cada caracol tuvo un área circular de desplazamiento equivalente a 10 m² con un radio de 1.78 m. Los controles se establecieron en parcelas adjuntas, afectadas solamente por las condiciones ambientales del sitio.

Los tratamientos se definieron según los sitios escogidos, el tratamiento uno (T1) se estableció en las condiciones de alta contaminación de “Bay House” y el tratamiento dos (T2) se definió por las condiciones limpias de “Trade Winds” (Figura 2). Las dos variables a medir en los sitios de muestreo fueron: contaminación en el agua y contaminación en el estrato agua-arena.

Adicionalmente se tomaron muestras aleatorias del agua e interfase agua-arena en tres ecosistemas interconectados por una microcuenca con eventuales efluentes al mar (ocho muestras por sitio). Con este muestreo se buscó tener un panorama de la calidad del agua y detectar las fuentes que están contaminando el mar con patógenos fecales. Estos fueron: 1) Los manglares centrales, característicos por ser filtros naturales de aguas contaminadas; 2) la laguna central alrededor de la cual hay actividad humana, y 3) los asentamientos marginales confinados que han desplazado a los manglares y que ahora representan focos de infección por deficiencias sanitarias (Figura 8).



GoogleEarth™. 2007. Mapa de Utila. DigitalGlobe©.

Figura 2. Localización de los tratamientos y sitios muestreados, isla de Utila, Honduras.

Para realizar los muestreos de agua se tomaron 100 mL de ésta a ± 1 m de profundidad con un frasco estéril. Las muestras de interfase agua-arena se recolectaron enterrando un frasco estéril de 50 mL hasta 4 cm de profundidad en la arena permitiendo el ingreso de 10 ml de agua. Cada recolección representó una submuestra, y cuatro submuestras aleatorias por día formaron una muestra de diagnóstico para el laboratorio. La toma de muestras se repitió cada 24 horas por nueve días consecutivos en ambos tratamientos.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en los esteros de la isla de Utila para el experimento con *Strombus gigas*, Honduras.

Tratamientos	Parcelas	Descripción
“Bay House” [†] (Sitio contaminado)	T1	contaminado con caracol (1)
	T1 _A	contaminado con caracol (2)
	C _{T1}	contaminado sin caracol (1)
	C _{T1A}	contaminado sin caracol (2)
“Trade Winds” ^{††} (Sitio no contaminado)	T2	no contaminado con caracol (1)
	T2 _A	no contaminado con caracol (2)
	C _{T2}	no contaminado sin caracol (1)
	C _{T2A}	no contaminado sin caracol (2)

[†] N16°05'27.44", W86°53'30.28"

^{††} N16°05'39.05", W86°52'56.59"

Preparación de muestras en laboratorio y cuantificación de *Enterococci* spp. Para las muestras de agua se tomaron 2.5 mL de cada una de las cuatro submuestras para un total de 10 mL. Éstas se vertieron en un frasco IDEXX[®] de volumen definido aforando hasta 100 mL con agua destilada estéril para una concentración final de 1:10. Para las muestras de la interfase agua-arena, el medio se agitó por un minuto a modo de que las posibles bacterias presentes quedaran en suspensión. Se dejó precipitar el segmento grueso de la arena por unos segundos y se realizó el procedimiento descrito para las muestras de agua.

Para elaborar las muestras de las vísceras se sacrificaron seis caracoles (dos por tratamiento y dos en cuanto fueron recolectados entre 7 y 10 m bajo agua). Se realizó un sacrificio artesanal haciendo una abertura en la tercera línea de crecimiento con un martillo y un cincel. Se introdujo un cuchillo de mesa a través de la apertura para desprender al animal de la concha. Utilizando bisturís estériles se tomaron tres submuestras de 2 × 2 × 1 cm en cada caracol y juntas se licuaron en revoluciones bajas con 100 mL de agua por 30 segundos. Se dejó precipitar el segmento grueso por 10 minutos y a continuación se realizó el procedimiento descrito para las muestras de agua.

Una vez preparadas las diluciones de agua, interfase o vísceras, se adicionó la unidad estándar del reactivo de Tecnología de Sustrato Definido® (DST) de Enteroleet® establecido por la empresa de tecnología biológica, IDEXX®. Posteriormente, cada muestra se vertió en una bandeja de 48 × 48 celdas cuantificables (± 0.05 de exactitud) igualmente definido por IDEXX® (IDEXX 2001) y se dejó incubar por 24 horas a 41°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$).

Para la cuantificación de las bacterias se utilizó el método de Quimioluminiscencia (QL) específico para *Enterococci* spp. bajo luz ultra violeta de 350 nm (UV₃₅₀), (IDEXX 2001). Este método está basado en la detección de emisión de fotones en respuesta a la emisión de metabolitos en medios con glucosa a través de una reacción REDOX (Philippe *et al.* 2005) y en la utilización de curvas del Número Más Probable (NMP).

Diseño Experimental. Se realizó un análisis de varianza ANDEVA ($P \leq 0.05$) utilizando un arreglo en factoriales con diseño completamente al azar (DCA) para medidas repetidas en el tiempo, y ANDEVA ($P \leq 0.05$) en una dirección para comparar los tratamientos y repeticiones entre estos. Adicionalmente se utilizaron gráficas de regresión en el tiempo como herramientas de ilustración y comparación de las tendencias.

Todos los análisis se corrieron con el programa MINITAB® 15 (2006). Las medias están expresadas geoméricamente (Cuadro 2) ya que la cuantificación bacteriana no corresponde a una distribución normal, es progresiva en el tiempo, y se debe tomar como la sumatoria paulatina de la expansión poblacional de las bacterias (Spencer y Chan 1997; Philippe *et al.* 2005)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del *Strombus gigas* en los niveles de *Enterococci* spp. Al analizar la interfase de agua-arena se observó que la media de contaminación fue aproximadamente 100 veces más alta ($P \leq 0.005$) en el área poblada de “Bay House” que en “Trade Winds”(Cuadro 2), indicando que existe un foco de contaminación mayor en los sitios altamente poblados o influenciados por interacción humana.

Cuadro 2. Resultados e indicadores de los tratamientos contaminado y no contaminado según la presencia del *Strombus gigas*, isla de Utila, Honduras.

Sitio	Tratamiento	Valor inicial	Valor final	Media geométrica	Variación UFC en el tiempo
		UFC ^Ω	UFC	UFC	%
Bay House Contaminado	Interfase con caracol	471.3	100.1	>234.6	-78.5**
	Interfase sin caracol	504.0	520.0	>493.5	1.2
	Agua con caracol	104.7	37.5	>50.4	-32.0 ^Φ
	Agua sin caracol	111.3	81.2	>91.6	-27.0
Trade Winds no contaminado	Interfase con caracol	0	0	>4.4	0
	Interfase sin caracol	0	0	>3.3	0
	Agua con caracol	0	0	>1.1	0
	Agua sin caracol	0	0	>2.2	0

^Ω Unidades formadoras de colonias ^Φ No significativo (P = 0.084) ** Valor altamente significativo (P<0.005)

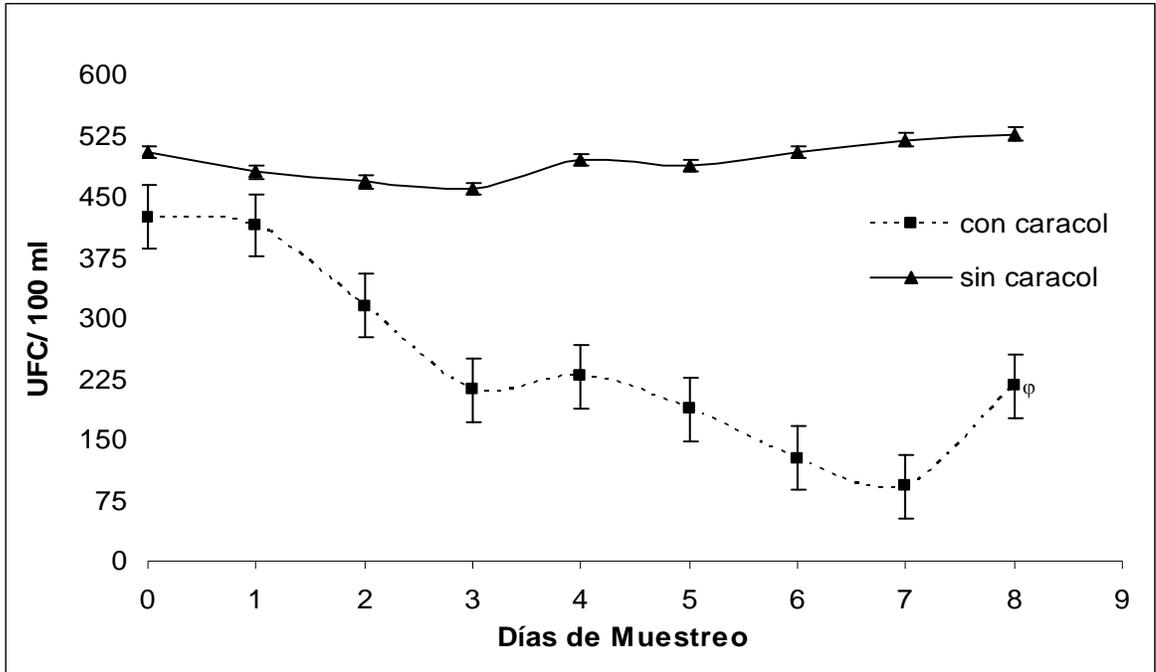
En “Bay House”, sitio que se escogió por la alta contaminación, se hizo una comparación de medidas repetidas en el tiempo de las repeticiones con caracol y sin caracol (control), obteniendo una diferencia significativa ($P < 0.005$) (Figura 3). En los primeros ocho días de muestreo, las parcelas con *S. gigas* tuvieron una reducción de la contaminación bacteriana de 78.5%, mientras que la población en los controles (sin caracol) incrementó 1.2% durante el mismo período (Cuadro 2). Por tanto, los resultados demostraron que los ocho caracoles colocados en el sitio contaminado fueron capaces de disminuir las poblaciones bacterianas de *Enterococci* spp. por efecto de movimiento y filtración (Figura 3), catalogando a los caracoles como biorremedidores de los esteros marinos.

La reducción marcada de *Enterococci* spp. En las parcelas con caracol de “Bay House” (Figura 3) fue esperada debido a que la dinámica de los ecosistemas bentónicos es vertical y confinada en términos de disponibilidad de nutrientes (Stoner *et al.*, 1995). En el octavo y noveno día de muestreo una tormenta incrementó los niveles de *Enterococci* (Figura 3) por efecto de la disrupción del ecosistema bentónico causando el desplazamiento y homogenización de los organismos anclados en el medio.

Pese al efecto significativo en la superficie bentónica de los esteros en “Bay House”, el efecto del caracol en el agua sobre las parcelas (con o sin caracol) no fue significativo ($P=0.084$). El agua es sujeta a un desplazamiento horizontal constante y no existe una superficie de anclaje para los organismos (Figura 4), lo que sugiere que el estrato de intercambio agua-arena es un ecosistema totalmente diferente a la columna de agua que está sobre éste. Además, el factor de dilución es mucho más alto en el agua por lo que la dinámica del ecosistema varía independientemente del efecto de los caracoles en el estrato bentónico inferior. No obstante, el valor estadístico del experimento ($P=0.084$) se acerca al valor significativo esperado ($P=0.05$), lo que sugiere que variaciones tales como el aumento de la población o mayor tiempo en el campo podrían resultar en un efecto significativo del caracol en la columna de agua.

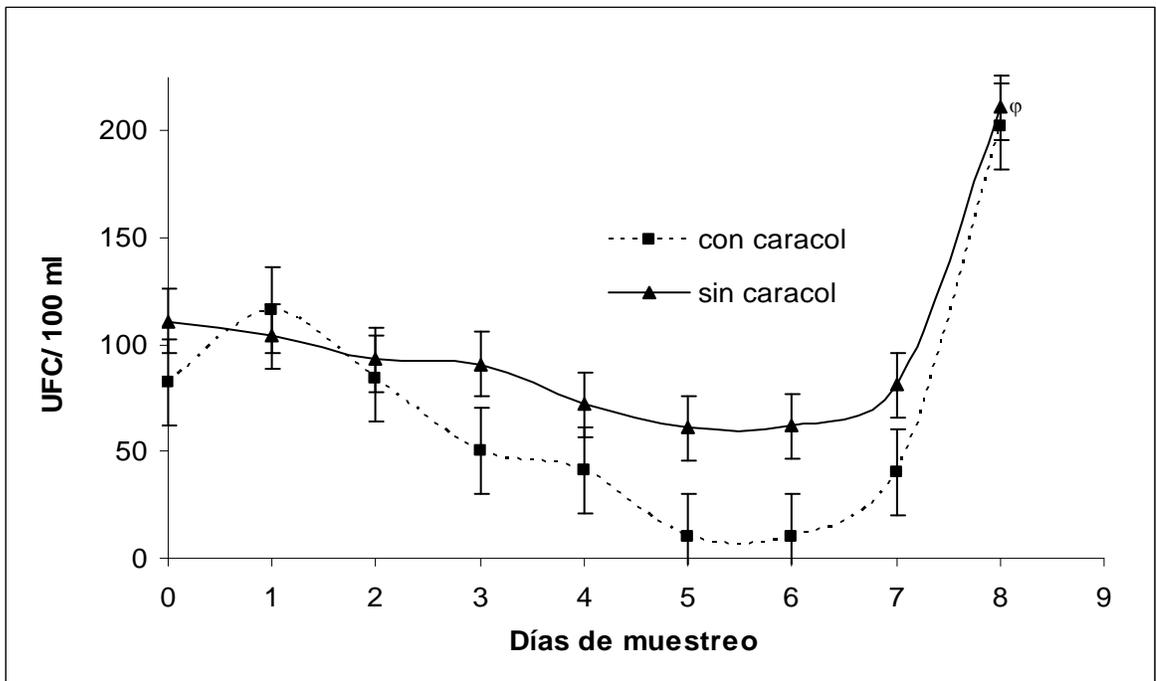
La disminución en la población de *Enterococcus* en las muestras de agua durante los primeros ocho días de muestreo de “Bay House” (Figura 4), pudo deberse al poco oleaje y la baja velocidad de la corriente que permitieron la precipitación de los sólidos y bacterias en el estrato bentónico. Sin embargo, la tormenta del octavo y noveno día de muestreo homogenizó la arena contaminada con el agua y aumentó drásticamente el número de UFC en ésta (Figura 4).

En “Trade Winds”, sitio que se escogió por su estado de baja contaminación, la diferencia entre el primer y último día de muestreo fue de 0 UFC en las muestras de agua e interfase agua-arena. Hubieron muestras con conteos bajos (<50 UFC) resultado de la aleatoriedad de los muestreos y la cuantificación genérica del método. En general, la tendencia en el sitio se mantuvo estable incluso en el octavo y noveno de muestreo.



^φ Datos afectados por tormentas

Figura 3. Tendencia de la población de *Enterococci* spp. en la interfase agua-arena del sitio contaminado (Bay House), isla de Utila, Honduras.



^φ Datos afectados por tormentas

Figura 4. Tendencia de la población de *Enterococci* spp. en el agua del sitio contaminado (Bay House), isla de Utila, Honduras.

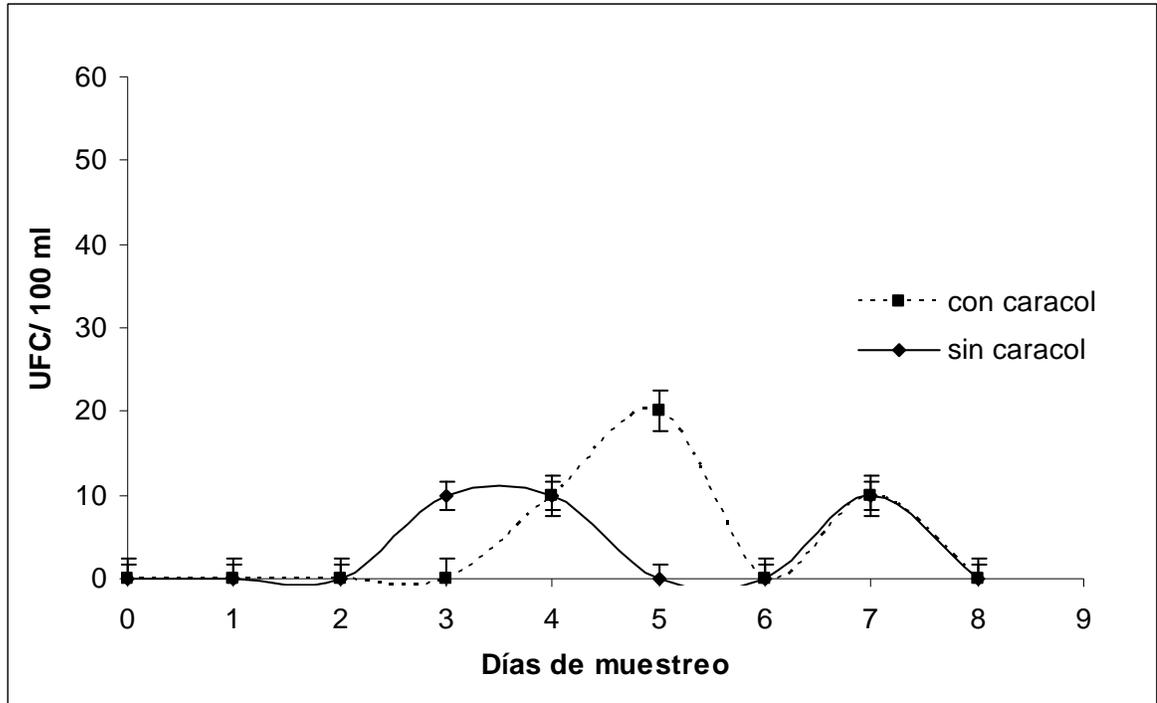
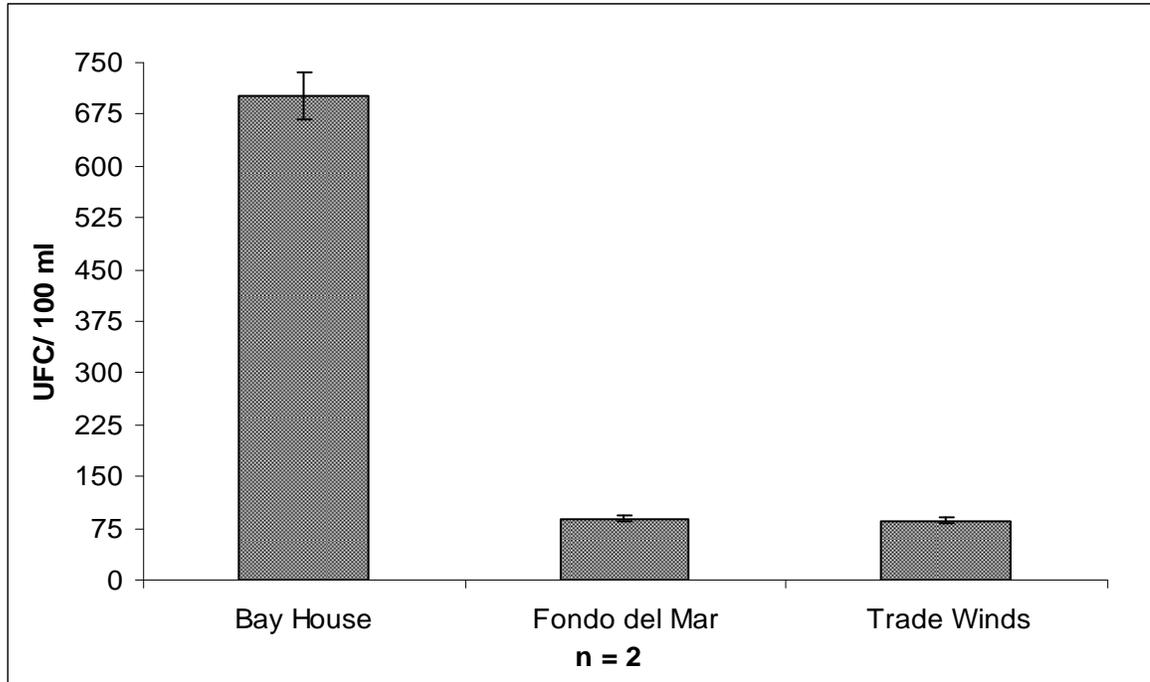


Figura 5. Tendencia de la población de *Enterococi* spp. en la interfase agua- arena del sitio no contaminado (Trade Winds), isla de Utila, Honduras.

Evaluación de la acumulación de *Enterococci* spp. en vísceras de *Strombus gigas*. Por razones éticas y legales sólo se sacrificaron seis caracoles en el experimento por lo que no se hicieron análisis estadísticos y correlaciones entre la acumulación de bacterias patógenas en las vísceras del *S. gigas* y los ambientes contaminados por estos microorganismos. Sin embargo, los resultados sugieren que existe una relación entre la acumulación de *Enterococci* y los sitios de recolección. Mientras que las muestras de “Trade Winds” (sitio no contaminado) tuvieron poblaciones de 88 UFC, similares a las muestras de los caracoles recolectados del “fondo del mar”, el conteo en los caracoles sometidos al tratamiento en “Bay House” (sitio contaminado) sobrepasaron las 700 UFC, (Figura 6). Es posible que las condiciones de alta contaminación fecal en la bahía de Utila resulten en un incremento poblacional en las vísceras de los *S. gigas*.

Se intentó analizar muestras del tejido muscular (carne) del *S. gigas* después del sacrificio para cuantificar su posible contaminación durante este proceso. Sin embargo el método QL no es apto para analizar este producto ya que el color blanco del tejido muscular refleja la luz UV invalidando la cuantificación de las bacterias. No se descarta que exista un riesgo potencial de toxicidad alimentaria por la contaminación cruzada del tejido muscular del caracol durante el proceso de sacrificio artesanal. El Codex Alimentario ha establecido que la tolerancia al número de bacterias patógenas humanas en los productos cárnicos preparados debe de ser cero debido al peligro de infecciones agudas causadas por dichos patógenos (FDA 2003).

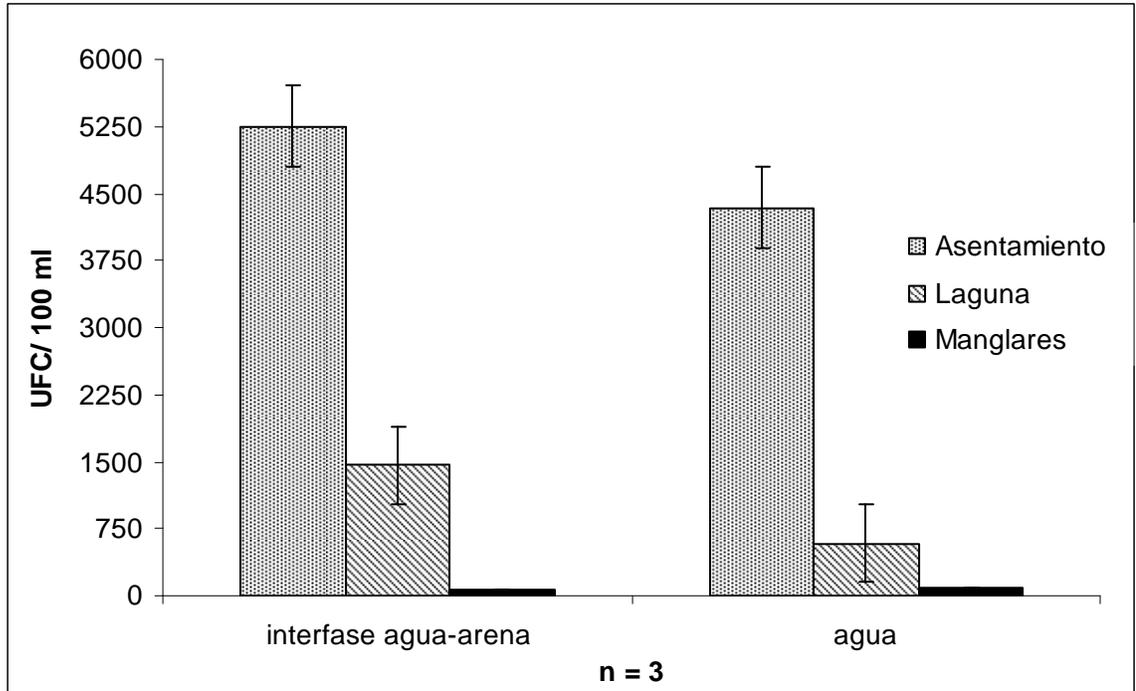


n = al número de caracoles utilizados para determinar la media.

Figura 6. Niveles de *Enterococci* spp. en las vísceras de los caracoles sometidos al tratamiento contaminado (“Bay House”), no contaminado (“Trade Winds”) y al momento de colección (“Fondo del Mar”).

Detección de las fuentes de contaminación. La mayor descarga de contaminantes proviene de dos fuentes principales: 1) Las instalaciones y locales que evacuan los desechos fecales y orgánicos en el mar, y 2) la microcuenca que irriga la isla y que canaliza los efluentes hasta desembocar en las playas de Utila. En la microcuenca se encontró que el mayor foco de contaminación son los asentamientos informales cuyas aguas acarrean un promedio de 4,338 UFC (Figuras 6 y 7). Por el contrario, en las aguas de los manglares no perturbados el promedio fue de 83 UFC (figura 7).

Los manglares por si mismos constituyen ecosistemas cerrados capaces de mejorar la calidad del agua (Danielsen *et al.* 2005). Por el contrario, uno de los mayores problemas y focos de contaminación fecal en Utila son los sitios donde los manglares han sido destruidos para colocar viviendas improvisadas. Estos sitios carecen de tren de aseo, tanques sépticos, y sistema de tuberías, propiciando la fuga de desechos fecales y orgánicos al sistema de aguas (Figura 8). La laguna central, que también es parte de este sistema, promedia poblaciones de 584 UFC. Estos niveles se pueden atribuir a fugas de las fosas sépticas mal permeabilizadas y a la evacuación directa de desechos de los negocios y casas que se encuentran alrededor.



n = al número de muestras recolectadas por cada ecosistema

Figura 7. Nivel de *Enterococci* spp. determinado por muestreos aleatorios en tres ecosistemas de de la microcuenca en la isla de Utila, Honduras.



Figura 8. Destrucción de manglares para crear áreas de vivienda en Utila, Honduras.

CONCLUSIONES

- La quimiolumiscencia no es funcional para evaluar muestras que contengan partículas blancas (tales como la carne del Caracol *S. gigas*) o refractantes que puedan intervenir con la iluminación UV para la cuantificación de bacterias.
- El caracol *S. gigas* es capaz de reducir las poblaciones de *Enterococci* spp. en espacios limitados de la interfase agua-arena de los esteros marinos actuando como biorremediador o filtro ambiental.
- Los caracoles no tuvieron un efecto significativo en las muestras de agua de ambos tratamientos.
- Se comprobó que los caracoles *S. gigas* son portadores de *Enterococci* spp. Los datos encontrados sugieren que hay una relación entre la acumulación de patógenos en las vísceras de *S. gigas* y los ambientes contaminados por estos microorganismos.
- Durante el proceso de sacrificio existe el riesgo de contaminación cruzada por las bacterias patógenas que se encuentran en las vísceras del caracol.

RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones futuras en condiciones de ambiente controlado como tanques tipo acuario. Complementar el estudio con análisis a lo largo del tracto digestivo de los caracoles para determinar si el *S. gigas* es un biodigestor de *Enterococci* spp.
- Evitar comer *S. gigas* teniendo en cuenta las virtudes de este gastrópodo como biorremediador.
- Ya que la Isla es afectada por huracanas y cambios climáticos drásticos, se recomienda mayor asepsia en el tren de aseo y estímulo a la conservación de especies que mantengan limpias las fuentes de agua.
- Que la Isla de Utila dictare una alerta en cuanto a la descarga de patógenos en las aguas de la bahía

LITERATURA CITADA

- CITES (Comission for Internatinal Trade of Endangered Species, UK). 2004. Review of the Implementation of Recommendations on *Strombus gigas*. Review of Significant Trade in Species of Animals included in CITES Appendix II. Doc. AC 14.14.3 14^{va} Reunión de la comisión de especies CITES. Caracas, Venezuela.
- Danielsen, F. Dorman, S; Walters, F; Edisson, F. 2005 The Asian tsunami: a protective role for coastal vegetation. *Science* 310: 643.
- FAO (Food and Agriculture Organization, IT). 2006. Regional Workshop on the Monitoring and management of the Queen Conch, *Strombus Gigas*. FAO Fishery Report 832. 1-5 de Mayo 2006.
- FDA (Food and Drugs Administration, US). 2003. Código de regulaciones federales, Capitulo 9: Animals and Animal Production (en línea). Consultado el 29 de Junio 2007. Disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/9CF318.html>
- Fischetti, V; Novick, R; Ferretti, J; Portnoy, D; Rood, J (eds.). 2000. Gram-Positive Pathogens. ASM Press. Washington, D.C.
- Hensen, R. 1994. Food availability and feeding preferences of the queen conch *Strombus gigas* collected from natural habitats. Congreso Nacional de Pescadores de Concha, Hilton Head Island, US. *Shellfish Res*, 4(1): 91.
- IDEXX[®]. 2001. Enterococcus Enterolert[®] Quanti-tray[®] 2000 Method Standard Operating Procedure: Standard Operating Procedure references D6053 (en línea). American Society for Testing and Materials. Consultado el 04 de diciembre, 2001. Disponible en www.idexx.com/water/enterolert/index.jsp.
- Jin, G; Jeng, H; Bradford, H; Englande, A. 2004. Comparison of *E. coli*, *Enterococci*, and fecal coliform as indicators for brackish water quality assessment. *Water Environment*, 6 (3): 245-55.
- Minitab[®]. 2006. Statistical Software. Run for Repeated Measures ANOVA and One way ANOVA. Consultado en Junio de 2007. Utils, Honduras.
- Morales, F. 2003. Queen Conch (*Strombus gigas*), genetics analysis and population assessment. Congreso de los pescadores del Golfo y el Caribe, 11-15 de Noviembre 2002. Mexico.
- Philippe, A; Jin, G; Fedder, L. 2005. Chemiluminescence of *Enterococci* isolates from freshwater. *Microbiology Letters*, 245 (1): 123-129.
- Randall, J. 1964. Contributions to the biology of the queen conch *Strombus gigas*. *Mar. Sci Gulf. Carib*, 14:246-295.
- Ryan K; Ray C (eds.). 2004. Medical Microbiology, 4th ed. McGraw Hill. New Yor, US.

- Spencer, P; Chan, J (eds.).1997. Application of the Geometric Mean, Mathematics Network (en línea). Universidad de Toronto. Consultado en 9 de septiembre, 2007. Disponible en ww.math.toronto.edu/mathnet/questionCorner/geomean.html
- Stoner, A; Hensen, F; Norman, S. 1995. Effects of a large herbivorous gastropod on macrofauna communities in tropical seagrass meadows. *Mar Ecol Prog*, 121: 125-137.
- Tewfik, A; Anderson, A; Peterson, F; Fherrir, S. 1998. Assessment of the Queen Conch *Strombus gigas* (Gastropoda: Strombidae) population in Cayos Cochinos, Honduras. *Tropical Biology*, 46 (4): 137-150

ANEXOS

Anexo 1. Diagrama ecológico mostrando los puntos de muestreo: la interfase bentónica la y la columna de agua.



Anexo 2. Imagen de las bandejas cuantificables de IDEXX® positiva para *Enterococcus*.



Anexo 3. Protocolo de Enterolert[®] de IDEXX[®] para detección de *Enterococci* spp.

Enterococcus Enterolert[®] Quanti-tray[®] 2000 Method Standard Operating³

1. Principle

The Enterolert[®] reagent, based on IDEXX's Defined Substrate Technology[®], is used for the detection of enterococci in water. Enterolert[®] uses 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside as the defined substrate nutrient-indicator. This compound, when hydrolyzed by enterococcus β -glucosidase, releases 4-methylumbelliferone which exhibits fluorescence under a UV365nm lamp. This reagent system is specifically formulated to achieve optimum sensitivity and specificity in the detection and identification of enterococcus. After 24 hours incubation at 41°C, if enterococcus is present, the reagent should show fluorescence when exposed to a long-wave (365-366 nm) UV lamp. The test should detect one (1) enterococcus in 100 mL of water within 24 hours.

2. Equipment

- 2.1 IDEXX Quanti-Tray[®] Sealer w/ insert
- 2.2 41 \pm 0.5°C incubator
- 2.3 Long-wave UV Lamp (365-366 nm)
- 2.4 Nalgene polysulfone dilution bottles marked at 90 and 99 mLs.

3. Supplies

- 3.1 100 mL sterile bacteriological sample bottles or 100 mL Whirlpak bags. Larger sample bottles may be needed for bacteriological duplicates.
 - 3.2 Enterolert[®] reagent
 - 3.3 IDEXX Quanti-Tray[®] 2000
 - 3.4 10 mL pipets - sterile, disposable
 - 3.5 50 mL pipets - sterile, disposable
 - 3.6 90 mL sterile dilution blanks (DDI water)
 - 3.7 50 mL sterile dilution blanks (DDI water)
- Note: Do not dilute samples in buffered water. The Enterolert[®] reagent is buffered.

4. Sample Handling

Enterococcus samples must arrive at the laboratory within 6 hours of collection. Samples must be processed within 2 hours of arriving at the laboratory. Samples that arrive after the 6 hour time limit will not be analyzed.

Enterococcus samples are accepted only in approved sterile plastic bottles. Chlorinated samples must be collected in bottles treated with sodium thiosulfate.

5. Analytical Methodology for freshwater samples with enterococcus values <2400 MPN/100 mL and relatively free from turbidity, color, and/or solids.

A single standard test volume of 100 mL may be used for water which is determined through experience to be relatively free of bacterial contamination as well as turbidity, color, and solids.

³ American Society for Testing and Materials D6053. Standard Test Method for Enterococci in Water and reports to the TNRCC under EPA STORET code 31701. Revised 12/4/01.

- 5.1 Turn on Quanti-Tray[®] Sealer 10-15 minutes before starting analysis. The sealer is ready to use when the green light comes on.
- 5.2 Record time sample is inoculated on the worksheet.
- 5.3 Shake sample 25 times in 7 seconds in 1 ft. arc.
- 5.4 Aseptically pour off excess to a volume of 100 mL.
- 5.5 Add Enterolert[®] reagent. The reagent has a light yellow color in water.
- 5.6 Shake well to dissolve reagent.
- 5.7 Place the rubber insert on the input shelf with the large cutout facing away from the Sealer
- 5.8 Confirm that reagent has dissolved completely. If not, shake bottle again.
- 5.9 Carefully pour the entire contents of the sample into a sterile Quanti-Tray[®] 2000.
- 5.10 Lightly tap the small wells to release trapped air.
- 5.11 Put the Quanti-Tray[®] 2000 onto the rubber insert, well side down, with the open end facing away from the sealer, making sure that the tray is properly seated in the rubber insert.
- 5.12 Slide the Quanti-Tray[®] into the sealer until the motor begins to draw it in.
- 5.13 Remove the Quanti-Tray[®] from the back of the sealer.
- 5.14 Label the Quanti-Tray[®] with the sample number and dilution factor.
- 5.15 Place the Quant -Tray[®] in the incubator, well side down, within 30 minutes of adding reagent.
- 5.16 Incubate for 24 hours @ $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- 5.17 Record date and time the sample will be read on the incubator door.
- 5.18 Turn sealer off when not in use.

6. Analytical Methodology for freshwater samples with enterococcus values <2,400 MPN/100mL which contain interfering amounts of color, turbidity, and/or solids.

A single standard test volume of 50 mL diluted with 50 mL sterile DDI water to a 100 mL total volume is used when samples are relatively free from bacterial contamination but contain interfering substances which could mask fluorescence. Adjust this volume according to the history of the each sample site and information obtained from the sampler about possible sewage contamination. Sample dilutions must be used within 20 minutes.

- 6.1 Turn on Quanti-Tray[®] Sealer 10-15 minutes before starting analysis. The sealer is ready to use when the green light comes on.
- 6.2 Record time sample is inoculated on the worksheet.
- 6.3 Shake sample 25 times in 7 seconds in 1 ft. arc.
- 6.4 Dilute samples as follows:
 - 1 to 2 dilution Pipet 50 mL of sample into a 50 mL sterile dilution blank for a total volume of 100mL.
- 6.5 Add Enterolert[®] reagent. The reagent has a light yellow color in water.
- 6.6 Shake well to dissolve reagent.
- 6.7 Place the rubber insert on the input shelf with the large cutout facing away from the Sealer.
- 6.8 Confirm that reagent has dissolved completely. If not, shake bottle again.
- 6.9 Carefully pour the entire contents of the dilution blank into a sterile Quanti-Tray[®] 2000.

- 6.10 Lightly tap the small wells to release trapped air.
- 6.11 Put the Quanti-Tray[®] 2000 onto the rubber insert, well side down, with the open end facing away from the sealer, making sure that the tray is properly seated in the rubber insert.
- 6.12 Slide the Quanti-Tray[®] into the sealer until the motor begins to draw it in.
- 6.13 Remove the Quanti-Tray[®] from the back of the sealer.
- 6.14 Label the Quanti-Tray[®] with the sample number and dilution factor.
- 6.15 Place the Quanti-Tray[®] in the incubator, well side down, within 30 minutes of adding reagent.
- 6.16 Incubate for 24 hours @ $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- 6.17 Record date and time the sample will be read on the incubator door.
- 6.18 Turn sealer off when not in use.

7. Analytical Methodology for marine samples and freshwater samples with enterococcus values between 2,400 and 50,000 MPN/100mL

The single standard test volume is 10 mL diluted with 90 mL sterile DDI water to a 100 mL total volume. Adjust this volume according to the history of the each sample site and information obtained about possible bacterial contamination and other interferences.

Sample dilutions must be used within 20 minutes.

- 7.1 Turn on Quanti-Tray[®] Sealer 10-15 minutes before starting analysis. The sealer is ready to use when the green light comes on.
- 7.2 Record time sample is inoculated on the worksheet.
- 7.3 Shake sample 25 times in 7 seconds in 1 ft. arc.
- 7.4 Dilute samples as follows:
 - 1 to 10 dilution Pipet 10 mL of sample into a 90 ml sterile dilution blank for a total volume of 100mL.
- 7.5 Add Enterolert[®] reagent. The reagent has a light yellow color in water
- 7.6 Shake well to dissolve reagent.
- 7.7 Place the rubber insert on the input shelf with the large cutout facing away from the Sealer.
- 7.8 Confirm that reagent has dissolved completely. If not, shake bottle again.
- 7.9 Carefully pour the entire contents of the dilution blank into a sterile Quanti-Tray[®]2000.
- 7.10 Lightly tap the small wells to release trapped air.
- 7.11 Put the Quanti-Tray[®] 2000 onto the rubber insert, well side down, with the open end facing away from the sealer, making sure that the tray is properly seated in the rubber insert.
- 7.12 Slide the Quanti-Tray[®] into the sealer until the motor begins to draw it in.
- 7.13 Remove the Quanti-Tray[®] from the back of the sealer.
- 7.14 Label the Quanti-Tray[®] with the sample number and dilution factor.
- 7.15 Place the Quanti-Tray[®] in the incubator, well side down, within 30 minutes of adding reagent.
- 7.16 Incubate for 24 hours at $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- 7.17 Record date and time the sample will be read on the incubator door.
- 7.18 Turn sealer off when not in use.

8. Interpretation

Do not read samples before 24 hours. Samples can be incubated up to 28 hours. After 28-hours, lack of fluorescence is a VALID NEGATIVE TEST and can be reported as such. Fluorescence after 28 hours is an INVALID result and **should not** be reported.

Note: Use an Enterolert[®] negative (sterility) control with each sample read. This control tray should be stored in the dark between uses.

8.1 Detect fluorescence using the IDEXX viewing box and UV Lamp. Any fluorescence is

positive for enterococcus.

8.2 Mark each + well with a black marker.

8.3 Ask a supervisor to check each tray for confirmation of fluorescence, if possible.

9. Recording

Count the number of positive large wells and small wells and record on the worksheet next to the correct dilution.

10. Data Reduction

10.1 Calculate the MPN (for each dilution) using the IDEXX MPN tables or the Quanti-Tray[®]2000 computer program.

10.2 Multiply the result by the dilution factor.

11. Reporting Rules

11.1 Use a tray that has between 30 and 80 positive (fluorescing) wells (small + large) if available.

11.2 If 2 trays fall in the 30-80 range, use the average of the extended counts.

11.3 If no trays fall in the 30-80 range, use the average of the extended counts.

11.4 If both trays are >2420, use the higher dilution.

11.5 If both trays are <0.99, use the lower dilution.

11.6 If only one tray is < or >, use the other tray.

11.7 Round the result to 2 significant figures.

11.8 All calculations should be audited by a supervisor before distribution of reports.

11.9 Report results as enterococcus MPN/100 mL

12. Analytical Quality Control

12.1 For each lot of medium, check productivity and accuracy by testing known positive and negative control cultures. Recommended QC cultures: Positive *Enterococcus faecium* or *Enterococcus faecalis*

Negative *Serratia marcescens* or *E. coli*

12.2 Perform bacteriological duplicate analyses on 10% of samples tested and at least once per run.

13. Discard of Positive Samples

All Quanti-Trays[®] that have any positive wells (fluorescing) must be sterilized in a 30 minute autoclave cycle and disposed of in an appropriate manner.

Anexo 4. Listado de especies para el género *Enterococcus*⁴.

E. avium
E. casseliflavus
E. cecorum
E. columbae
E. dispar
E. durans
E. faecalis
E. faecium
E. flavescens
E. gallinarum
E. hirae
E. malodoratus
E. mundtii
E. pseudoavium
E. raffinosus
E. saccharolyticus
E. seriolicida
E. solitarius
E. sulfureus

⁴ Monstain, H J. *et al.* 1998. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology* 144 (5): 1171. Virginia, US.

GLOSARIO

1. **Bentos:** Ecosistema marino definido por la interfase agua- superficie de anclaje, refiriéndose por superficie de anclaje a la arena, los corales y superficies sólidas estables en el mar.
2. **Organismo bentónico:** La biótica que vive en, o muy cerca de, la superficie inferior del mar, río o lago.
3. **Columna de Agua:** Estrato de agua sobre una superficie cuyas dimensiones están definida. Debe tener una dimensión de profundidad y presión sobre la superficie en la que yace.
4. **Detrito:** residuos, generalmente sólidos, que provienen de la descomposición de fuentes orgánicas y minerales.
5. **Epífita:** se refiere a cualquier planta (microscópica o superior) que crece sobre otro vegetal usándolo solamente como soporte, pero que no lo parásita.
6. **Método del Número Mas Probable:** Es una técnica de estimación ya definida en tablas de poblaciones microbiales en sustratos líquidos. Se basa en la dilución e incubación de replicados a través de varias series de diluciones. A este método es complementario el uso de patrones positivos y negativos de medios que han sido sometidos a incubación. Los resultados son producto de una derivación poblacional basada en la formula de Halvorson y Ziegler:

$$[a_1 p_1 / (1 - e^{-a_1 x})] + \dots + [a_k p_k / (1 - e^{-a_k x})] = a_1 n_1 + \dots + a_k n_k$$
7. **Organismo facultativo:** Organismo que puede vivir en presencia o ausencia de oxígeno en el medio.
8. **Quimioluminiscencia:** Fenómeno de emisión de radiación electromagnética (luminiscencia) debida a la perdida de exceso de energía en las moléculas o átomos de una sustancia o compuesto químico que han sido alcanzados como resultado de una reacción química previa (e.i. hipermetabolismo).