

DETECCIÓN DE *Vibrio cholerae* O1 EN DIFERENTES HÁBITATS DE LA BAHÍA DE TODOS SANTOS, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

DETECTION OF *Vibrio cholerae* O1 IN DIFFERENT HABITATS OF TODOS SANTOS BAY, BAJA CALIFORNIA, MEXICO

Amelia Portillo-López
Marcial Leonardo Lizárraga-Partida

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)
Km. 107 carretera Tijuana-Ensenada
Ensenada 22860, Baja California, México

Recibido en enero de 1997; aceptado en agosto de 1997

RESUMEN

Se estudió la presencia de *Vibrio cholerae* O1 (Pacini, 1854) cultivable y no cultivable en muestras de agua, sedimento, plancton y mejillón, durante el periodo de enero a agosto de 1995 en la Bahía de Todos Santos, BC, México. Se analizaron un total de 52 muestras, en las cuales no se encontró *V. cholerae* O1; sin embargo, *V. cholerae* no O1 estuvo presente en 28.8% de ellas. Se aisló un total de 43 cepas de *V. cholerae* no O1, 44% en plancton, 37% en agua y 19% en sedimento. En mejillón no se detectó la presencia de *V. cholerae* no O1. En la parte norte de la bahía se presentaron las mayores concentraciones microbianas de coliformes, bacterias heterótrofas viables, bacterias tipo *Vibrio* y el mayor número de cepas de *V. cholerae* no O1. La parte sur de la bahía, donde se realizan cultivos de mejillón, presentó la menor cantidad de cepas de *V. cholerae* no O1, así como también las menores concentraciones de los otros grupos bacterianos.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, cólera, cultivable, anticuerpos fluorescentes monoclonales, zooplancton.

ABSTRACT

The presence of *Vibrio cholerae* O1 (Pacini, 1854) in its culturable and nonculturable stages was studied in water, sediment, plankton and mussel samples, from January to August 1995 in Todos Santos Bay, BC, Mexico. Fifty-two samples were analyzed without finding *V. cholerae* O1; however, non-O1 *V. cholerae* was present in 28.8% of the samples. Forty-three strains of non-O1 *V. cholerae* were isolated, 44% from plankton, 37% from water and 19% from sediment. Non-O1 *V. cholerae* was not detected in mussel samples. The highest bacterial concentrations of coliforms, heterotrophic bacteria, *Vibrio*-like bacteria and the highest number of non-O1 *V. cholerae* were found in the northern part of the bay. The lowest incidence of non-O1 *V. cholerae*, as well as the lowest concentrations of the other bacterial groups were found in the southern part of the bay, where mussels are commercially cultured.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera, culturable, fluorescent monoclonal antibodies, zooplankton.

INTRODUCCIÓN

Vibrio cholerae (Pacini, 1854) es un bacilo Gram negativo, causante de la enfermedad

INTRODUCTION

Vibrio cholerae (Pacini, 1854) is a Gram-negative bacillus that causes the enteric disease

entérica en el hombre llamada cólera. Se ha clasificado este organismo en 139 serogrupos, de acuerdo con su estructura antigénica "O". Los del serogrupo O1 han estado asociados con las epidemias del cólera, mientras que el resto de los serogrupos están agrupados como los no O1, o vibrios no coléricos (Colwell y Spira, 1992; Manning *et al.*, 1994). Sin embargo, a partir de 1992, un serogrupo no O1 denominado O139 ha estado causando una epidemia en la región de la India y Bangladesh (Ghosh *et al.*, 1994; Morris, 1994).

Este organismo es fácilmente diseminado hacia diferentes regiones geográficas a través del turismo, el transporte comercial y la importación de mariscos (Wachsmuth *et al.*, 1993; Blake, 1994; Swerdlow e Isaacson, 1994; Murphree y Tamplin, 1995). Actualmente, se sabe que en el ambiente marino el zooplancton juega un papel muy importante en la transmisión de *V. cholerae*, así como también los organismos planctívoros implicados en la cadena alimenticia; dentro de éstos se menciona a los peces y crustáceos como susceptibles de contaminarse y ser vectores hacia el ser humano (Huq *et al.*, 1983; Epstein *et al.*, 1993; Huq *et al.*, 1996). Los moluscos bivalvos juegan también un papel importante en la transmisión del cólera, debido a su tipo de alimentación; por filtración pueden concentrar grandes cantidades de bacterias patógenas cuando se encuentran en áreas contaminadas (Murphree y Tamplin, 1995). Los mariscos son vectores de *V. cholerae* O1 cuando se les ingiere con una escasa o nula cocción (Finch *et al.*, 1987; Kaysner and Hill, 1994; Mintz *et al.*, 1994; Tauxe *et al.*, 1994).

Uno de los principales problemas para la detección de *V. cholerae* O1 en el ambiente marino es su escasa abundancia y su condición fisiológica producida por presiones ambientales, razón por la cual los métodos de cultivo tradicionales son frecuentemente ineficaces. No obstante, la detección con anticuerpos monoclonales fluorescentes (AMF) (Brayton y Colwell, 1987) permite demostrar su presencia aun cuando se encuentre en condiciones no cultivables. El método tradicional de cultivo, así como el método de detección directa

called cholera. This organism has been classified into 139 serogroups, according to its antigenic "O" structure. Those of the O1 serogroup have been associated with cholera epidemics, whereas the rest of the serogroups are classified as non-O1, or noncholeric vibrios (Colwell and Spira, 1992; Manning *et al.*, 1994). However, the non-O1 serogroup, O139, has caused an epidemic in India and Bangladesh since 1992 (Ghosh *et al.*, 1994; Morris, 1994).

This organism is easily spread to other geographic regions via tourism, commercial shipments and shellfish imports (Wachsmuth *et al.*, 1993; Blake, 1994; Swerdlow and Isaacson, 1994; Murphree and Tamplin, 1995). It is known that zooplankton play an important role in the transmission of *V. cholerae*, as do planktivores that form part of the food chain, among them fish and crustaceans that can become contaminated and, in turn, present a health risk to humans (Huq *et al.*, 1983; Epstein *et al.*, 1993; Huq *et al.*, 1996). Bivalve mollusks are also important transmitters of cholera, since they are filter feeders that can concentrate large amounts of pathogenic bacteria when they are found in polluted areas (Murphree and Tamplin, 1995). Shellfish are vectors of *V. cholerae* O1 when ingested with little or no cooking (Finch *et al.*, 1987; Kaysner and Hill, 1994; Mintz *et al.*, 1994; Tauxe *et al.*, 1994).

One of the main difficulties in detecting *V. cholerae* O1 in marine environments is its low abundance and physiological condition produced by environmental factors that make traditional culture methods ineffective. However, they can be detected with fluorescent monoclonal antibodies (FMA) (Brayton and Colwell, 1987) even when they occur in nonculturable conditions. Both the traditional culture method and direct detection method with FMA were used in this study.

There are no systematic studies of *V. cholerae* O1 for the coastal zone of Mexico, even though many cases of cholera have been reported, mainly in the Gulf of Mexico (Secretaría de Salud, 1997). The purpose of this study was to detect the occurrence of culturable and nonculturable *V. cholerae* O1, in order to

con AMF fueron aplicados en el presente estudio.

En México no se han realizado estudios sistemáticos de *V. cholerae* O1 en la zona costera, a pesar de que se ha reportado un número importante de casos de cólera en esta zona, principalmente en el Golfo de México (Secretaría de Salud, 1997). El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *V. cholerae* O1 cultivable y no cultivable en dos áreas de la Bahía de Todos Santos, una con alta contaminación y la otra con escasa contaminación (Orozco-Borbón y Gutiérrez-Galindo, 1983; Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984), en la cual se están llevando a cabo cultivos comerciales de moluscos bivalvos, a fin de establecer el potencial epidemiológico de esta región. En Baja California, México, donde se localiza la bahía en estudio, hasta mayo de 1997 no se han registrado casos de cólera (Secretaría de Salud, 1997).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo muestreos bimensuales de enero a agosto de 1995 en la Bahía de Todos Santos, Baja California, para detectar la presencia de *Vibrio cholerae* O1 en muestras de agua, sedimento, plancton y mejillón. Adicionalmente, se estimó la concentración de bacterias heterótrofas viables (BHV), bacterias tipo *Vibrio* (BTV), coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF).

Área de estudio

Se seleccionaron cuatro estaciones de muestreo (fig. 1). La primera estación se localizó dentro de la rada portuaria, zona afectada por embarcaciones de carga y descarga, de barcos mercantes, barcos turísticos, el arroyo Ensenada y el arroyo El Gallo. La segunda estación se localizó frente al arroyo El Gallo; en este arroyo son descargados los desechos de la industria pesquera, desechos domésticos, así como las aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas negras de la ciudad de Ensenada. La tercera estación se localizó frente a la boca del Estero de Punta Banda, por lo que esta zona está impactada principalmente por las aguas del

establish its epidemiological potential, in two areas of Todos Santos Bay: one is severely polluted and the other, where bivalve mollusks are commercially cultured, is slightly polluted (Orozco-Borbón and Gutiérrez-Galindo, 1983; Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984). In Baja California, Mexico, where the bay is located, no cases of cholera have been reported as of May 1997 (Secretaría de Salud, 1997).

MATERIALS AND METHODS

Bimonthly samplings were conducted from January to August 1995 in Todos Santos Bay, Baja California, to detect the presence of *Vibrio cholerae* O1 in samples of water, sediment, plankton and mussel. The concentration of viable heterotrophic bacteria (VHB), *Vibrio*-like bacteria (VLB), total coliforms (TC) and fecal coliforms (FC) was also estimated.

Study area

Four sampling stations were selected (fig. 1). The first station was located inside the harbor and is influenced by cargo ships, cruise ships and the Ensenada and El Gallo streams. The second station was located off the El Gallo stream, which receives discharges of domestic and industrial wastes, as well as wastewater from the Ensenada treatment plant. The third station was located off the mouth of Estero de Punta Banda; it is mainly affected by water from this lagoon and only slightly by the El Gallo stream. The fourth station was located in the southern part of the bay and does not have any point sources of pollution; the mussel *Mytilus galloprovincialis* is commercially cultured in this area.

The surface temperature of the water was measured at each station with a calibrated mercury thermometer with 0.1°C intervals.

Collection of samples

The surface water samples were collected in 4-L sterile glass bottles. The sediment was collected with a Van Veen drag. The first 10 cm were subsampled and stored in sterile glass jars.

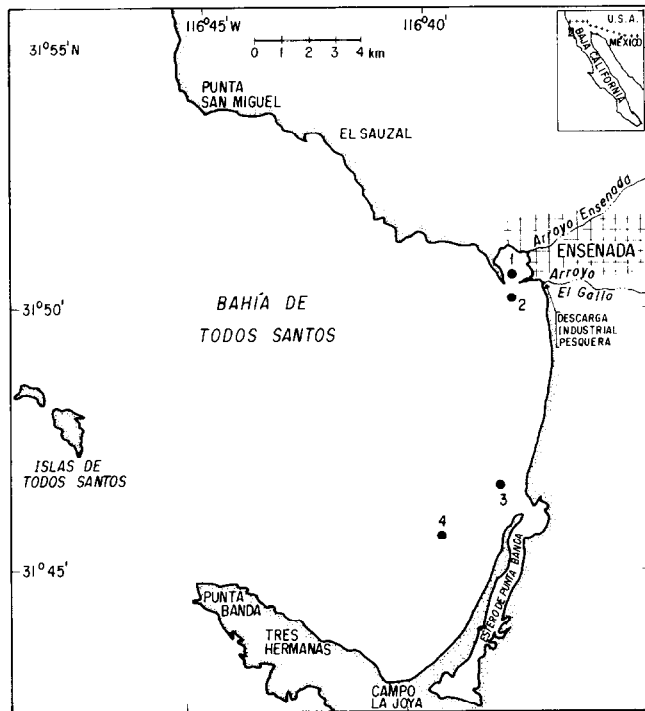


Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo en la Bahía de Todos Santos, Baja California.
Figure 1. Location of the sampling stations at Todos Santos Bay, Baja California.

estero y tiene una escasa influencia del arroyo El Gallo. La estación cuatro se localizó en la parte sur de la bahía y se caracterizó por no presentar fuentes puntuales de contaminación. Esta última es además una zona donde se realizan cultivos comerciales del mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

En cada estación de muestreo se midió la temperatura superficial del agua, usando un termómetro de mercurio calibrado con intervalos de 0.1°C.

Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de las aguas superficiales, usando botellas de vidrio estériles con una capacidad de 4 L. El sedimento se recolectó con una draga Van Veen,

The zooplankton was collected during 10-min surface tows, using a cylindroconical net with a mesh size of 73 μm , 0.30 m in diameter by 1 m in length. The samples were stored in sterile jars. For the mussel analysis, a minimum of two dozen organisms was collected from the culture area located in the southern part of the bay (station 4) and placed in plastic bags. All the samples were labeled and transported, in an ice chest at ambient temperature (~18-20°C), to the laboratory for processing within 6 h of their collection.

Microbiological analysis

The technique of the US Food and Drug Administration (1992) was modified to isolate culturable *V. cholerae* O1. The flow chart in

submuestreando la fracción correspondiente a los primeros 10 cm, la cual fue almacenada en frascos de vidrio estériles. El zooplancton fue recolectado mediante arrastres superficiales de 10 min, usando una red cilíndrica de 0.30 m de diámetro por 1 m de largo y 73 µm de luz de malla. Una vez recolectadas, las muestras fueron almacenadas en frascos estériles. Para el análisis de mejillón, se recolectó un mínimo de dos docenas de organismos en el área de cultivo localizado al sur de la bahía (estación 4); éstos se colocaron en bolsas de plástico para su transporte. Todas las muestras etiquetadas se transportaron dentro de una hielera a temperatura ambiente (18-20°C aproximadamente), para procesarse en el laboratorio en un tiempo no mayor de 6 h desde su recolección.

Análisis microbiológico

La metodología utilizada para el aislamiento de *V. cholerae* O1 cultivable fue una modificación de la técnica de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, 1992). El diagrama de flujo de la fig. 2 muestra todas las pruebas efectuadas y su secuencia.

Análisis de agua: Se filtraron 3 L de agua por un filtro estéril de 0.45 µm de tamaño de poro; posteriormente, este filtro se colocó en 225 mL de agua de peptona alcalina estéril (APA).

Análisis de sedimento: Se incubaron 25 g de sedimento en 225 mL de APA.

Análisis de zooplancton: El zooplancton fue homogeneizado 1 min en una licuadora estéril a máxima velocidad; posteriormente, se tomaron 5 mL y se colocaron en 45 mL de APA.

Análisis de mejillón: Las muestras de mejillón (carne y licor) se homogeneizaron 2 min en una licuadora estéril a máxima velocidad; posteriormente, se tomó 25 g y se colocó en 225 mL de APA.

Todas las muestras, excepto el agua, se cultivaron a dos temperaturas, 37 y 42°C, por 12 h. Después, se estiraron en el medio de TCBS

fig. 2 shows all the tests made and their sequence.

Water analysis: Three liters of water were passed through a 0.45-µm mesh filter; this filter was then placed in 225 mL of sterile alkaline peptone water (APW).

Sediment analysis: Twenty-five grams of sediment were incubated in 225 mL of APW.

Zooplankton analysis: The zooplankton were homogenized for 1 min in a sterile blender at high speed; 5 mL were then placed in 45 mL of APW.

Mussel analysis: The mussel samples (meat and liquor) were homogenized for 2 min in a sterile blender at high speed; 25 g were then placed in 225 mL of APW.

All the samples, except the water, were cultured at two temperatures, 37 and 42°C, for 12 h. They were then streaked onto TCBS (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose) and cultured at 37°C for 18-24 h. The yellow colonies were stored on T₁N₁ (1% triptone and 1% NaCl) and incubated at 37°C for 24 h. The isolated colonies were subjected to a series of biochemical tests (Food and Drug Administration, 1992), and those colonies with characteristic responses to *V. cholerae* were subjected to the FMA test, specific for the O1 serotype. The negatives were considered non-O1 *V. cholerae*.

The FMA technique was used to analyze nonculturable *V. cholerae* O1 in organisms and sediment. Homogenate samples were used for the organisms and supernatant water samples for the sediment. This technique was not used for the water samples, since all the water was used to detect culturable *V. cholerae* O1.

For the coliform analysis, the most probable number (MPN) was determined for the water, sediment and mussel samples, using the standard five-tube method of tenfold dilution with a Durham-type fermentation bell (American Public Health Administration, 1989). These samples were also used to quantify the concentration of VHB, using Zobell culture medium (Vargas-Cárdenas and

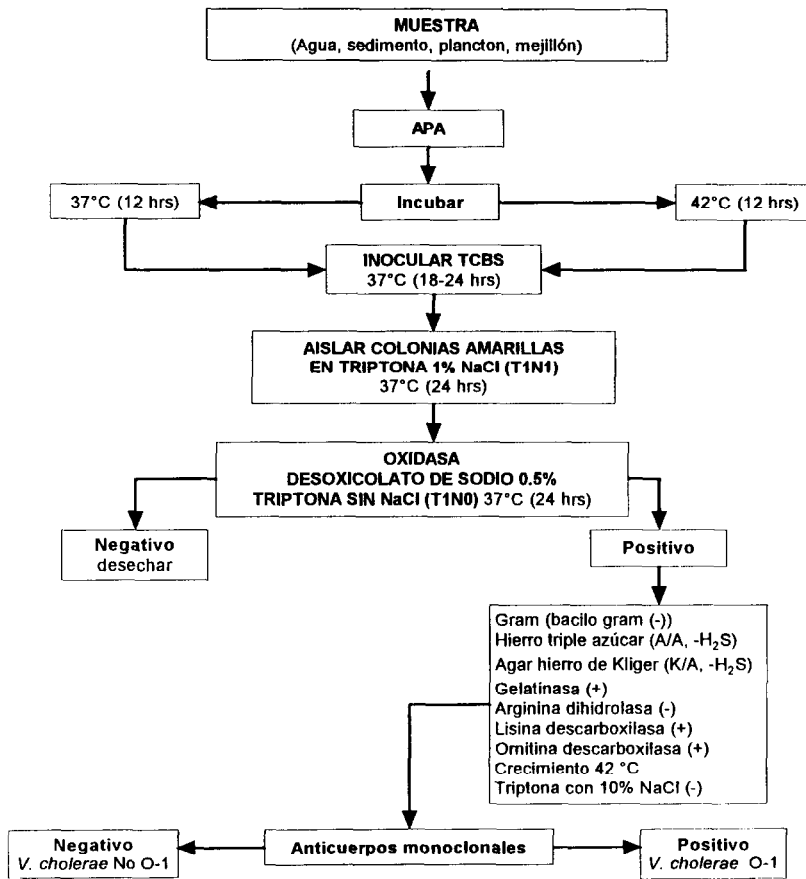


Figura 2. Técnica de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, 1992) modificada para el aislamiento de *Vibrio cholerae* O1.

Figure 2. Technique of the US Food and Drug Administration (1992) modified for isolating *Vibrio cholerae* O1.

(tiosulfato citrato bilis sacarosa) y se cultivaron a 37°C por 18 a 24 h. Posteriormente, se aislaron las colonias amarillas en T₁N₁ (triptona 1% y NaCl 1%) y se incubaron a 37°C por 24 h. Las colonias aisladas fueron sometidas a una serie de pruebas bioquímicas (Food and Drug Administration, 1992) y, a todas aquellas colonias con respuestas características a *V. cholerae*, se les aplicó la prueba de AMF, específica del serotipo O1. Las negativas fueron consideradas *V. cholerae* no O1.

Para el análisis del *V. cholerae* O1 no cultivable en organismos y sedimento, se aplicó la

Lizárraga-Partida, 1993), as well as the concentration of VLB, using TCBS culture medium. Both types of bacteria (VLB and VHB) were inoculated with the spread plate method and incubated at 30°C for 24 and 48 h.

RESULTS AND DISCUSSION

Vibrio cholerae O1 was not detected in the 52 samples analyzed. However, non-O1 *V. cholerae* was isolated from 28.8% of the samples, of which 44% was from plankton, 37% from water and 19% from sediment. Even

técnica de AMF. En el primer caso se tomaron muestras del homogeneizado y en el segundo se tomó agua sobrenadante. Esta técnica no se utilizó en muestras de agua, debido a que toda el agua se utilizó para la detección de *V. cholerae* O1 cultivable.

Para el análisis de coliformes en muestras de agua, sedimento y mejillón, se determinó el número más probable (NMP) con el método estándar de dilución geométrica, en cinco tubos, con campana de fermentación tipo Durham (American Public Health Administration, 1989). En las mismas muestras anteriores se cuantificó la concentración de BHV, con el medio de cultivo Zobell (Vargas-Cárdenas y Lizárraga-Partida, 1993), así como también la concentración de BTV, con el medio de cultivo TCBS. Ambos tipos de bacterias (BTV y BHV) se sembraron en placa por duplicado y se incubaron a 30°C durante 24 y 48 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se detectó *V. cholerae* O1 en las 52 muestras analizadas. Sin embargo, *V. cholerae* no O1 fue aislado del 28.8% de las muestras, de las cuales el 44% fue en plancton, 37% en agua y 19% en sedimento. Aun cuando *V. cholerae* no O1 ha sido comúnmente aislado de moluscos (Hood *et al.*, 1981, 1984; Morris, 1994), en el presente estudio nunca se encontró, al igual que Tison *et al.* (1986), quienes aislaron *V. cholerae* no O1 de agua, sedimento y algas, pero no de cangrejos, almejas y ostiones en las costas de Oregon. No obstante, Kaysner *et al.* (1987), durante su estudio en varios esteros de la costa oeste de los Estados Unidos, aislaron *V. cholerae* no O1 en agua (55%), sedimento (22%) y moluscos (6.1%).

Vibrio cholerae no O1 fue aislado en un intervalo promedio de temperatura de 15.2 a 21.2°C y el mayor número de cepas de *V. cholerae* no O1 se registró en el mes de agosto, cuando se reportó la mayor temperatura promedio, de 21.2°C. Estos resultados concuerdan con varios investigadores (Hood *et al.*, 1984; Colwell y Spira, 1992), quienes mencionan que cuando la temperatura es baja, la presencia de *V. cholerae* es restringida y, por lo contrario, es mayor durante los meses cálidos.

though non-O1 *V. cholerae* has been isolated from mollusks (Hood *et al.*, 1981, 1984; Morris, 1994), it was not detected in this study. Similar results were reported by Tison *et al.* (1986), who isolated non-O1 *V. cholerae* from water, sediment and algae, but not from crabs, clams or oysters along the Oregon coast. However, Kaysner *et al.* (1987), in their study of various estuaries along the west coast of the United States, isolated non-O1 *V. cholerae* from water (55%), sediment (22%) and mollusks (6.1%).

Non-O1 *V. cholerae* was isolated in an average temperature range of 15.2 to 21.2°C. The greatest number of strains of non-O1 *V. cholerae* were found during August, when the highest average temperature, 21.2°C, was recorded. These results concur with those of several researchers (Hood *et al.*, 1984; Colwell and Spira, 1992), who state that the occurrence of *V. cholerae* is restricted when the temperature is low and greater during the warm months.

The predominance of non-O1 *V. cholerae* in the plankton samples during August (table 1) may be related to the abundance of zooplankton in the bay, since greatest zooplankton abundance is reported for the summer months (Castro-Longoria, 1987), which is when there can be some type of association, as an increase in *V. cholerae* has been found when large concentrations of zooplankton occur (Epstein *et al.*, 1993; Huq *et al.*, 1996).

August was also the only month when non-O1 *V. cholerae* colonies were isolated during the incubations of APW at a temperature of 42°C (table 1). It has been shown that this temperature is selective for the isolation of *V. cholerae* from mollusks (DePaola *et al.*, 1987); however, in this study, it was only effective for plankton and sediment. Venkateswaran *et al.* (1989) showed that this temperature was more effective for isolating *V. cholerae* from water.

Considering the values of bacterial concentration obtained in this study and the coliform results reported for this area (Orozco-Borbón and Gutiérrez-Galindo, 1983; Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984, 1985), the bacterial concentrations from stations 1 and 2 were averaged, as were those from stations 3 and 4 for

Tabla 1. Aislamiento de *Vibrio cholerae* no O1 en los diferentes hábitats estudiados. APA = agua de peptona alcalina.

Table 1. Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* from the different habitats studied. APA = alkaline peptone water.

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

El predominio de *V. cholerae* no O1 en las muestras de plancton durante el mes de agosto (tabla 1), posiblemente esté relacionado con la abundancia del zooplancton en la bahía, ya que es durante los meses de verano cuando se registran las mayores abundancias de zooplancton (Castro-Longoria, 1987) y es cuando se puede dar un tipo de asociación, ya que se ha encontrado un incremento de *V. cholerae* cuando existen grandes concentraciones de zooplancton (Epstein *et al.*, 1993; Huq *et al.*, 1996).

Agosto también se caracterizó por ser el único mes donde se aislaron colonias de *V. cholerae* no O1 al incubar el APA a una temperatura de 42°C (tabla 1). Se ha comprobado que la temperatura de 42°C es selectiva para el aislamiento de *V. cholerae* en moluscos (DePaola *et al.*, 1987); sin embargo, en este estudio, sólo fue eficaz en el plancton y sedimento. Venkateswaran *et al.* (1989) señalan que esta temperatura fue más eficiente en el aislamiento de *V. cholerae* en agua.

each type of habitat. The results show that the first two stations can be classified as area 1, highly polluted, and the last two as area 2, slightly polluted.

Area I (northern part of the bay) had the greatest number of non-O1 *V. cholerae* strains and the highest concentration of coliforms, VHB and VLB (tables 1, 2, 3, 4). This area has already been classified as highly polluted, with fecal coliform concentrations greater than 16,000 MPN 100 mL⁻¹ (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984, 1985; Orozco-Borbón and Sañudo-Wilhelmy, 1988). The high occurrence of non-O1 *V. cholerae* in this area is mainly due to the input of available nutrients from the organic pollution found there; Reddacliff *et al.* (1993) showed that there is a greater isolation of non-O1 *V. cholerae* from areas of greater organic pollution. It has also been shown that there is no linear correlation between non-O1 *V. cholerae* and microbial indicators of pollution (Kaper *et al.*, 1979). In this study, a quantitative

Tabla 2. Promedio mensual de la concentración de bacterias por estaciones de muestreo.
Table 2. Monthly average of bacterial concentration per sampling station.

	Agua superficial (100 mL ⁻¹)				Sedimento (100 g ⁻¹)			
	1	2	3	4	1	2	3	4
BHV*	3.58×10^6	2.36×10^6	2.31×10^6	3.64×10^5	3.06×10^8	3.22×10^7	4.85×10^6	2.12×10^7
BTV*	1.46×10^4	1.42×10^4	1.15×10^4	1.75×10^3	2.60×10^6	3.66×10^5	3.21×10^5	77,600
CT*	807	488	8	3	8,344	5,282	111	18
CF*	366	249	3	1.6	6,372	1,524.5	27.5	0

Tabla 3. Promedio mensual de la concentración de bacterias en agua superficial.
Table 3. Monthly average of bacterial concentration in surface water.

	Área 1				Área 2			
	Enero	Marzo	Mayo	Agosto	Enero	Marzo	Mayo	Agosto
BHV 100 mL ⁻¹	1.75×10^6	2.35×10^6	2.02×10^6	5.75×10^6	5.75×10^5	2.90×10^5	1.98×10^6	2.50×10^4
BTV 100 mL ⁻¹	1.1×10^3	2.68×10^4	5.7×10^3	2.41×10^4	7.0×10^2	4.0×10^2	1.0×10^4	155
CT 100 mL ⁻¹	835	>1,600	11.9	144	4.8	<1.8	4.4	12.5
CF 100 mL ⁻¹	275	920	2	33	1	0	3.2	4.8

Tabla 4. Promedio mensual de la concentración de bacterias en sedimento.
Table 4. Monthly average of bacterial concentration in sediment.

	Área 1				Área 2			
	Enero	Marzo	Mayo	Agosto	Enero	Marzo	Mayo	Agosto
BHV 100 g ⁻¹	-	3.72×10^8	8.52×10^7	4.93×10^7	-	8.68×10^6	4.94×10^7	3.30×10^4
BTV 100 g ⁻¹	3.37×10^5	5.15×10^6	4.02×10^5	4.5×10^4	-	9.62×10^4	3.97×10^5	1.05×10^3
CT 100 g ⁻¹	8,165	16,000	1,850	1,239	9	144	18	32
CF 100 g ⁻¹	4,634	9,750	170	1,239	0	55	0	0

* BHV = bacterias heterótrofas viables, BTV = bacterias tipo *Vibrio*, CT = coliformes totales, CF = coliformes fecales.

Tabla 5. Concentración de bacterias en mejillón. BHV = bacterias heterótrofas viables, BTV = bacteria tipo *Vibrio*, CT = coliformes totales, CF = coliformes fecales.

Table 5. Concentration of bacteria in mussels. BHV = viable heterotrophic bacteria, BTV = *Vibrio*-like bacteria, CT = total coliforms, CF = fecal coliforms.

	Enero	Marzo	Mayo	Agosto
BHV 100 g ⁻¹	9.10×10^5	3.30×10^7	1.90×10^6	5.90×10^5
BTV 100 g ⁻¹	2.83×10^5	7.14×10^5	1.0×10^4	9.3×10^4
CT 100 g ⁻¹	800	5,400	350	1,100
CF 100 g ⁻¹	23	18	<1.8	<1.8

Considerando los valores de concentración bacteriana obtenidos en este estudio y los resultados de coliformes de otros investigadores en la misma área (Orozco-Borbón y Gutiérrez-Galindo, 1983; Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984, 1985), se procedió a promediar entre sí los valores de concentración bacteriana de las estaciones 1 y 2, así como de las estaciones 3 y 4, para cada tipo de hábitat. Los resultados muestran que se pueden clasificar las dos primeras estaciones como área 1, de alta contaminación, y las dos siguientes como área 2, de baja contaminación.

El área 1 (parte norte de la bahía) registró el mayor número de cepas de *V. cholerae* no O1, así como también la mayor concentración de coliformes, BHV y BTV (tablas 1, 2, 3, 4). Esta zona ya ha sido señalada como una área de alta contaminación, con concentraciones de coliformes fecales superiores a 16,000 NMP 100 mL⁻¹ (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984, 1985; Orozco-Borbón y Sañudo-Wilhelmy, 1988). La mayor presencia de *V. cholerae* no O1 en esta área obedece principalmente al mayor aporte de nutrientes disponibles por parte de la contaminación orgánica ahí presente; Reddacliff *et al.* (1993) señalan que existe mayor aislamiento de *V. cholerae* no O1 en las áreas de mayor contaminación orgánica. Asimismo, se menciona la no correlación lineal entre *V. cholerae* no O1 y los indicadores microbianos de contaminación (Kaper *et al.*, 1979). En el presente estudio no se llevó a cabo un análisis cuantitativo de *V. cholerae* no O1; por lo tanto, no se realizó ningún tipo de análisis estadístico.

En el área 2 (parte sur de la bahía) se registró el menor número de bacterias y colonias de

analysis of non-O1 *V. cholerae* was not conducted and, therefore, no type of statistical analysis was made.

Area 2 (southern part of the bay) had the lowest number of bacteria and colonies of non-O1 *V. cholerae*, and it was not detected in the mussels (tables, 1, 2, 3, 4, 5). At station 4, where mussels are cultured, the surface water had a fecal coliform average of 1.6 MPN 100 mL⁻¹, whereas the mussels did not have values greater than 23 MPN 100 mL⁻¹ (table 5); these values are very similar to those found by Lizárraga-Partida and Vargas-Cárdenas (1996). This suggests that the area has not been affected by pollutants from the city and, therefore, the mollusks extracted from the area do not present any potential danger to consumers.

In general, the occurrence of non-O1 *V. cholerae* in Todos Santos Bay, in both the high and low pollution areas, is not unusual, since this species is a normal inhabitant of estuarine and marine bacterial communities of coastal regions (Colwell *et al.*, 1990; Colwell and Spira, 1992). It has also been isolated from many tropical and warm habitats in different parts of the world (Morris, 1994).

Non-O1 *V. cholerae* in Todos Santos Bay does not present any public health risk, as it occurs in very low concentrations, even in the most polluted area. However, the occurrence of non-O1 *V. cholerae* in the water, sediment and plankton of the bay indicates that the ecological conditions needed for the toxicogenic serogroups O1 and O139 to occur exist, which is why it is important to track its presence and/or absence, especially during the warm months when its concentration increases. It is also

V. cholerae no O1 y no se detectó en el mejillón (tablas 1, 2, 3, 4, 5). En la estación 4, zona donde se cultiva mejillón, el agua superficial tuvo un promedio de coliformes fecales de 1.6 NMP 100 mL⁻¹, mientras que el mejillón no presentó valores superiores a los 23 NMP 100 mL⁻¹ (tabla 5), valores muy similares a los encontrados por Lizárraga-Partida y Vargas-Cárdenas (1996); esto significa que esta zona aún no ha sido impactada por la contaminación de la ciudad, por lo que los moluscos extraídos de esta área no representan un peligro potencial para el consumidor.

En un contexto general, se puede decir que la presencia de *V. cholerae* no O1 en la Bahía de Todos Santos, tanto en el área de alta como en el de baja contaminación, no es de extrañar, ya que se ha considerado a esta especie como un habitante normal de la comunidad bacteriana estuarina y marina de las regiones costeras (Colwell *et al.*, 1990; Colwell y Spira, 1992). Asimismo, se ha aislado de una gran cantidad de hábitats, tanto en regiones tropicales como templadas de diferentes partes del mundo (Morris, 1994).

Vibrio cholerae no O1 en la Bahía de Todos Santos no representa un peligro para la salud pública, ya que se encuentra en muy baja concentración, aun en el área más contaminada. Sin embargo, la presencia de *V. cholerae* no O1 en el agua, sedimento y plancton de la bahía de Ensenada es indicativo de que existen las condiciones ecológicas necesarias para que puedan presentarse los serogrupos toxigénicos O1 y O139, por lo que es importante un seguimiento de su presencia y ausencia, principalmente en los meses cálidos, que es cuando aumenta su concentración. También es importante establecer un programa de vigilancia de *V. cholerae* O1 en la bahía, debido a que el puerto de Ensenada recibe a barcos del sur de México, así como de Centro y Sudamérica, los cuales pueden traer consigo *V. cholerae* toxigénico, tanto en sus productos comerciales como en el agua de las centinas y balastre de los barcos, medio por el cual se ha demostrado su dispersión geográfica (Wachsmuth *et al.*, 1993; McCarthy y Khambaty, 1994).

important to establish a monitoring program for *V. cholerae* O1 in the bay, since the harbor receives ships from southern Mexico and Central and South America that can transport toxigenic *V. cholerae* in their cargo or in the water in their ballast tanks, means by which it has been shown to be transported worldwide (Wachsmuth *et al.*, 1993; McCarthy and Khambaty, 1994).

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Guadalupe Vargas-Cárdenas, Fausto Arellano and Dahen Gómez for their participation in the samplings and laboratory analysis; to César O. Almeda for his help with the samplings and computer work; and to all the people who in one way or another contributed to this work. This study was financed by CICESE (project No. 623115) and CONACYT, under the project "Detección de *Vibrio cholerae* O1 cultivable y no cultivable en organismos marinos y estuarinos de las costas mexicanas" (No. 5167-T9407).

English translation by Jennifer Davis.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la valiosa colaboración de Guadalupe Vargas-Cárdenas, Fausto Arellano y Dahen Gómez en los muestreos y en el análisis de laboratorio. También se agradece a César O. Almeda su participación en los muestreos y en el trabajo de cómputo, así como a todas aquellas personas que colaboraron de alguna forma en la elaboración de este trabajo. Este trabajo fue financiado por el CICESE (proyecto No. 623115) y CONACYT, bajo el proyecto titulado "Detección de *Vibrio cholerae* O1 cultivable y no cultivable en organismos marinos y estuarinos de las costas mexicanas" (No. 5167-T9407).

REFERENCIAS

American Public Health Association (1989).
Standard methods for the examination of

- water and wastewater. 17th ed. Am. Public Health Assoc., Washington, DC.
- Blake, P.A. (1994). Historical perspectives on pandemic cholera. In: I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, pp. 293-295.
- Brayton, P.R. and Colwell, R.R. (1987). Fluorescent antibody staining method for enumeration of viable environmental *Vibrio cholerae* O1. J. Microbiol. Methods, 6: 309-314.
- Castro-Longoria, E. (1987). Variación espacial y temporal en la biomasa del zooplancton de la Bahía de Todos Santos, BC, México, octubre de 1982 a septiembre de 1983. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, BC, México, 58 pp.
- Colwell, R.R. and Spira, W. (1992). The ecology of *Vibrio cholerae*. In: D. Barua and W.B. Greenough III (eds.), Cholera. Plenum Medical Book Co., New York, pp. 107-127.
- Colwell, R.R., Tamplin, M.L., Brayton, P.R., Gauzens, A.L., Tall, B.D., Herrington, D., Levine, M.M., Hall, S. and Sack, D.A. (1990). Environmental aspects of *Vibrio cholerae* in transmission of cholera. In: R.B. Sack and K.T.K. Zinnaka (eds.), Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas. Sci. Publ., Tokyo, pp. 327-343.
- DePaola, A., Kaysner, C.A. and McPhearson, R.M. (1987). Elevated temperature method for recovery of *Vibrio cholerae* from oysters (*Crassostrea gigas*). Appl. Environ. Microbiol., 53: 1181-1182.
- Epstein, P.R., Ford, T.E. and Colwell, R.R. (1993). Marine ecosystems. The Lancet, 342: 1216-1219.
- Finch, M.J., Valdespino, J.L., Wells, J.G., Pérez-Pérez, G., Arjona, F., Sepulveda, A., Bessudo, B. and Blake, P.A. (1987). Non-O1 *Vibrio cholerae* infections in Cancún, Mexico. Am. J. Med. Hyg., 36: 393-397.
- Food and Drug Administration (1992). Bacteriological Analytical Manual. 7th ed. AOAC International, Arlington, Virginia, 529 pp.
- Ghosh, A.R., Koley, H., De, D., Garg, G., Bhattacharya, M.K., Bhattacharya, S.K., Manna, B., Nair, G.B. Shimada, T., Takeda, T. and Takeda, Y. (1994). Incidence and toxigenicity of *Vibrio cholerae* in a freshwater lake during the epidemic of cholera caused by serogroup O139 Bengal in Calcutta, India. Microbiol. Ecol., 14: 285-292.
- Hood, M.A., Ness, G.E. and Rodrick, G.E. (1981). Isolation of *Vibrio cholerae* serotype O1 from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Appl. Environ. Microbiol., 41: 559-560.
- Hood, M.A., Ness, G.E., Rodrick, G.E. and Blake, N.J. (1984). The ecology of *Vibrio cholerae* in two Florida estuaries. In: R.L. Metcalf and W. Stumm (eds.), Vibrios in the Environment. J. Wiley, New York, 634 pp.
- Huq, A., Small, E.B., West, P.A., Huq, M.I., Rahman, R. and Colwell, R.R. (1983). Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Appl. Environ. Microbiol., 45: 275-283.
- Huq, A., Huq, B., Chowdhury, M.A.R., Islam, M.S., Montilla, R. and Colwell, R.R. (1996). A simple filtration method to remove plankton-associated *Vibrio cholerae* in raw water supplies in developing countries. Appl. Environ. Microbiol., 62: 2508-2512.
- Kaper, J., Lockman, H., Colwell, R.R. and Joseph, S.W. (1979). Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol., 37: 91-103.
- Kaysner, C.A. and Hill, W.A. (1994). Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in food and water. In: I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, pp. 27-37.
- Kaysner, C.A., Abeyta, C., Wekell, M.M., DePaola, A., Stott, R.F. and Leitch, J.M. (1987). Incidence of *Vibrio cholerae* from estuaries of the United States west coast. Appl. Environ. Microbiol., 53: 1344-1348.

- Lizárraga-Partida, M.L. and Vargas-Cárdenas G. (1996). Influence of water circulation on marine and faecal bacteria in a mussel growing area. *Mar. Pollut. Bull.*, 32: 196-201.
- Manning, P.A., Stroecher, U.H. and Morona, R. (1994). Molecular basis for O-antigen biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: Ogawa-Inaba Switching. In: I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, DC, pp. 77-91.
- McCarthy, S.A. and Khambaty, F.M. (1994). International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2597-2601.
- Mintz, E.D., Popovic, T. and Blake, P.A. (1994). Transmission of *Vibrio cholerae* O1. In: I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, DC, pp. 345-356.
- Morris, J.G. Jr. (1994). Non-O group I *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease. In: I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, DC, pp. 103-115.
- Murphree, R.L. and Tamplin, M.L. (1995). Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3656-3660.
- Orozco-Borbón, M.V. y Gutiérrez-Galindo, E.A. (1983). Contaminación fecal costera en la zona del puerto de Ensenada, Baja California. *Ciencias Marinas*, 9(1): 27-34.
- Orozco-Borbón, M.V. y Sañudo-Wilhelmy, S.A. (1988). Estudio de coliformes, estreptococos y bacterias patógenas a lo largo de la costa de Baja California. *Ciencias Marinas*, 14(3): 1-8.
- Reddacliff, G.L., Hornitzky, M., Carson, J., Petersen, R. and Zelski, R. (1993). Mortalities of goldfish, *Carassius auratus* (L.), associated with *Vibrio cholerae* (non-O1) infection. *J. Fish Dis.*, 16: 517-520.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A., Morales-Yáñez, A. y Vargas-Flores, J.A. (1984). Contaminación fecal en la bahía de Ensenada, Baja California, México. *Ciencias Marinas*, 10(1): 7-17.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A., Rivera-Duarte, I., Segovia-Zavala, J.A., Orozco-Borbón, M.V., Delgadillo-Hinojosa, F. y del Valle-Villorín, J. (1985). Estado actual de la contaminación marina en la Bahía de Todos Santos, BC: diagnóstico y alternativas para su reducción y control. Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, Ensenada, BC, México, 32 pp.
- Secretaría de Salud (1997). Sistema nacional de vigilancia epidemiológica. *Boletín de Epidemiología*, Vol. 14, México.
- Swerdlow, D.L. and Isaacson, M. (1994). The epidemiology of cholera in Africa. In: I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, DC, pp. 297-307.
- Tauxe, R., Seminario, L., Tapia, R. and Libel, M. (1994). The Latin American epidemic. In: I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and Cholera. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, DC, pp. 321-344.
- Tison, D.L., Nishibuchi, M., Seidler, R.J. and Siebeling, R.J. (1986). Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* serovars from Oregon coastal environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 444-445.
- Vargas-Cárdenas, M.G. y Lizárraga-Partida, M.L. (1993). Manual de prácticas de laboratorio del curso de bacteriología marina. Comunicaciones Académicas, Serie Ecología. CICESE, Ensenada, BC, México, 31 pp.
- Venkateswaran, K., Takai, T., Navarro, I.M., Nakano, H., Hashimoto, H. and Siebeling, R.J. (1989). Ecology of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Salmonella* spp. and role of zooplankton in their seasonal distribution in Fukayama coastal waters, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1591-1598
- Wachsmuth, I.K., Evins, G.M., Fields, P.I., Olsvik, O., Popovic, T., Bopp, C.A., Wells, J.G., Carrillo, C. and Blake, P.A. (1993). The molecular epidemiology of cholera in Latin America. *J. Infect. Dis.*, 167: 621-626.