

93  
20/



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"SALMONELLA: AISLAMIENTO Y TIPIFICACION, A  
PARTIR DE LODOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS  
DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS  
RESIDUALES DE CHAPULTEPEC"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MARIO ALBERTO OLVERA CARRILLO

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN



## **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.

## 2. INDICE

1.	RESUMEN	3
2.	INDICE	4
3.	INTRODUCCION	7
4.	OBJETIVOS	9
5.	GENERALIDADES	10
5.1	Aguas Residuales Y Plantas De Tratamiento	12
5.1.1	Tratamiento Preliminar	12
5.1.2	Tratamiento Primario	12
5.1.3	Tratamiento Secundario	13
5.1.4	Desinfeccion	17
5.2	Producción De Lodos	18
5.3	Salmonella En Lodos	20
5.4	Producción Y Tratamiento De Aguas Residuales En Mexico	23
5.5	Plantas De Tratamiento De Aguas Residuales En El Valle De Mexico	25
5.5.1	Planta De Tratamiento De Aguas Residuales De Chapultepec	26
5.6	Epidemiologia De Salmonelosis en Mexico	28
6.	DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	32

6.1	Material, Equipo, Medios De Cultivo, Reactivos Y Soluciones, Reactivos Biológicos	33
6.2	Metodología Del Aislamiento De <i>Salmonella spp</i> En Lodos Primarios Y Secundarios	35
6.2.1	Muestreo	35
6.2.2	Metodos Empleados	35
6.2.3	Análisis Del Efluente De Un Digestor Anaerobio Convencional De Lodos Primarios	39
6.3	Ensayo De Supervivencia De <i>Salmonella typhi</i> En Lodos Primarios	40
7.	RESULTADOS	45
7.1	<i>Salmonella</i> En Lodos Primarios	45
7.2	<i>Salmonella</i> En Lodos Secundarios	46
7.3	<i>Salmonella</i> En El Efluente De Un Digestor Anaerobio Convencional De Lodos Primarios	47
7.4	Ensayo De Supervivencia De <i>Salmonella typhi</i> En Lodos Primarios	55
8.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	57
8.1	<i>Salmonella</i> en Lodos Primarios	57
8.2	<i>Salmonella</i> en Lodos Secundarios	60
8.3	<i>Salmonella</i> en el Efluente De Un Digestor Anaerobio	63
8.4	Ensayo De Supervivencia de <i>Salmonella typhi</i> En Lodos Primarios	64
9.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66

10.	BIBLIOGRAFIA	68
11.	ANEXOS	76
I	Género <i>Salmonella</i>	76
II	Medios De Cultivo	88
III	Preparación De Soluciones	101
IV	Tratamiento Estadístico	103

### 3. INTRODUCCION

Ante la creciente demanda de agua del Valle de México para diferentes usos y en vista de la problemática actual para obtenerla, el tratamiento de aguas residuales resulta ser una buena alternativa para el ahorro de dicho recurso, ya que pueden ser reutilizadas en áreas donde no se requiere agua de primera calidad; además del ahorro de agua, permite el saneamiento de las aguas residuales y contribuyen a evitar la contaminación de mantos acuíferos, sistemas de agua potable, etc. Sin embargo, la capacidad de tratamiento de las plantas existentes no es suficiente para el volumen de agua residual producida en el valle y los sistemas existentes no sólo producen aguas tratadas, sino que además son obtenidos subproductos indeseables, tales como los sedimentos provenientes del agua tratada, a los cuales se les denomina "lodos". Los lodos obtenidos en las plantas que se encuentran en nuestra ciudad, no son tratados, sólo son recolectados y expulsados al sistema de drenaje, incorporándose al manto compuesto por las aguas residuales no tratadas y por el agua proveniente de las lluvias. Posteriormente esta mezcla es expulsada del Valle de México, llegando a la zona de riego del Mezquital, Hidalgo. Esta mezcla tiene ciertas propiedades fertilizantes por su contenido de nutrientes y se han utilizado para el riego de miles de hectáreas de cultivo.

En los lodos se concentra la mayor parte de la contaminación alojada en las aguas residuales, y si dichas aguas son de tipo

doméstico, un riesgo eminente lo constituyen los microorganismos patógenos, que incluyen bacterias, parásitos, hongos y virus.

Dentro de las bacterias patógenas detectadas en aguas residuales y lodos en diversos lugares del mundo, encontramos al género *Salmonella*. Las especies de *Salmonella* están formadas por microorganismos patógenos para el hombre y los animales, destacando la especie *S. typhi* que corresponde al agente etiológico de la fiebre tifoidea. Si consideramos que las salmonelosis (toda enfermedad producida por cualquier tipo de *Salmonella*), son enfermedades de origen intestinal, transmitidas por la contaminación de agua y alimentos por heces o aguas residuales, el estudio de la frecuencia y la resistencia de estos microorganismos en lodos provenientes de el tratamiento de aguas residuales adquiere gran importancia, al igual que el estudio de otros microorganismos patógenos y otro tipo de contaminantes.

El objetivo primario de este estudio es verificar la presencia de *Salmonella* en lodos primarios y secundarios de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas, con el fin de evaluar el riesgo que representan los lodos en su forma cruda, así como enfatizar en la necesidad de instalar tratamientos adecuados para la remoción de estos organismos patógenos así como de otros contaminantes.

#### 4. OBJETIVOS

I. Caracterizar una población representativa de lodos primarios y secundarios en cuanto a la presencia de las diferentes especies del género *Salmonella*.

II. Comparar la frecuencia de *Salmonella* en lodos primarios y en lodos secundarios.

III. Estudiar la sobrevivencia de *Salmonella* en los lodos crudos y lodos sometidos a tratamiento anaerobio.

IV. Evaluar el riesgo que presentan los lodos para la salud pública.

## 5. GENERALIDADES

### 5.1 Aguas Residuales Y Plantas de Tratamiento

Se conoce como agua residual a toda el agua que ha sido impurificada por diversos usos. El agua se considera contaminada cuando su composición o condición resultan inadecuadas para cualquiera o todas las funciones y propósitos para los que sería apropiada en su estado natural. De acuerdo a su origen se han clasificado en aguas residuales de tipo domestico (de casas habitación), tipo municipal (de instalaciones urbanas), tipo industrial (de todo tipo de industria) y de tipo agropecuario (de zonas de cultivo y granjas de crianza).<sup>8,25</sup>

Las aguas residuales domesticas y municipales contienen materia orgánica putrescible y potencialmente removible. Entre los compuestos orgánicos que encontramos en este tipo de aguas residuales se incluyen aminoácidos, ácidos grasos, jabones, ésteres, detergentes aniónicos, azúcares, aminas, amidas y muchos mas. tambien encontramos compuestos de tipo inorgánico en sales disueltas en forma iónica ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ).<sup>25</sup>

El agua residual de tipo domestico contiene un gran numero de microorganismos, destacando aquellos que son patógenos al hombre: podemos encontrar bacterias, parásitos, hongos e incluso virus. Otro tipo de contaminación presente en las aguas residuales son los metales pesados, ciertas sustancias toxicas,

etc. 9.8.24.25

El agua residual es potencialmente contaminante de mantos acuíferos, corrientes superficiales, y en general del medio ambiente por lo que se debe disponer en forma adecuada para impedir dicha contaminación. En ocasiones la disposición de las aguas de desecho se realiza en forma directa y sin ningún tratamiento previo, lo cual sólo es posible cuando la carga contaminante no es tan alta y el proceso de purificación se puede obtener naturalmente. Sin embargo, por la creciente contaminación de las aguas, ha sido necesaria la implantación de plantas de tratamiento de aguas. El tratamiento tiene como objetivo el separar la cantidad suficiente de contaminantes para que no sean nocivos al medio ambiente, reducir los riesgos de salud pública y además el remover la contaminación que pueda interferir con su uso potencial posterior, por lo que el grado de tratamiento dependerá del grado de contaminación, el uso que se pretenda dar al agua tratada, así como el presupuesto con que se cuenta. 16.24.25.27

Existen múltiples tecnologías en el tratamiento de aguas residuales, siendo las más conocidas y utilizadas aquellas en donde se emplean microorganismos para la degradación de la materia orgánica contaminante. Este tipo de tratamientos son conocidos como biológicos y se pueden realizar en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis. En la Ciudad de México han sido instaladas 17 plantas de tratamiento de aguas residuales con tratamientos biológicos de tipo aerobio (lodos activados, filtros biológicos y biodiscos). 9.15.10.23

El funcionamiento de las plantas de tratamiento de aguas residuales se lleva a cabo en diferentes etapas:

#### 5.1.1 Tratamiento Preliminar:

Está destinado a eliminar o separar los sólidos gruesos o flotantes, eliminar sólidos inorgánicos pesados y eliminar cantidades excesivas de grasas y aceites, con lo cual se protege el equipo de bombeo y hace más fáciles los procesos siguientes.<sup>9</sup>

Se utilizan rejas de barras o cribas finas, desarenadores, desmenuzadores (molinos, cortadoras o trituradoras), entre otros.<sup>9</sup>

#### 5.1.2 Tratamiento Primario:

Es utilizado para la separación o eliminación de la mayor parte de los sólidos suspendidos en las aguas de desecho, mediante el proceso de asentamiento en tanques de sedimentación. Para llevar a cabo esto la velocidad de la corriente disminuye hasta 1 o 2 cm por segundo. Se puede aumentar la sedimentación adicionando compuestos químicos, los cuales ayudan a sedimentar las partículas coloidales, alcanzando a eliminar hasta un 90% de los sólidos en suspensión del agua en tratamiento; entre los compuestos mencionados se encuentran el sulfato de aluminio (alumbre), sulfato ferroso con cal, sulfato ferrico y cloruro ferrico con o sin cal. Este procedimiento se efectúa con aguas residuales industriales, las cuales son difíciles de biodegradar.<sup>8,16,25</sup>

Todos los sedimentos producidos en este punto son conocidos como "Lodos Primarios".

Los lodos Primarios son un material de color oscuro, denso, muy oloroso, con alto contenido de agua y de un 4 a un 8% de sólidos secos. Este tipo de lodo es muy difícil de operar y se recomienda tratarlos para disminuir su carga contaminante antes de disponerse de algún modo. Generalmente contiene múltiples microorganismos patógenos, algunos compuestos tóxicos, metales pesados, etc. Debido a que este tipo de material no ha recibido ningún tratamiento de estabilización es fácilmente putrescible. <sup>8,29,30</sup>

Existen varios tipos de sedimentadores primarios tales como los tanques sépticos, tanques de doble acción, como el Imhoff, tanques de sedimentación simple, con eliminación mecánica de lodos, clarificadores de flujo ascendente, con eliminación mecánica de lodos. <sup>8</sup>

Con el tratamiento primario se elimina de un 40 a 60% de los sólidos suspendidos del agua residual y la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) de un 25 a 30%. El número de microorganismos se reduce de un 50 a un 90% con tiempos de retención de 3 a 6 horas. <sup>8,19,10,31</sup>

### 5.1.3 Tratamiento Secundario

Es un proceso netamente biológico, que es utilizado para

oxidar la materia orgánica presente en el efluente del tratamiento primario transformándolo en compuestos orgánicos e inorgánicos estables. Este tipo de tratamientos es llevado a cabo por microorganismos aerobios, por lo que la eficiencia del proceso está en función de la cantidad de oxígeno disuelto, así como también, la cantidad de materia orgánica a degradar y la temperatura de operación. Existen múltiples dispositivos para el tratamiento secundario tales como los filtros goteadores con tanques de sedimentación secundaria, tanques de aereación (lodos activados y aereación por contacto), filtros de arenas intermitentes, estanques de estabilización, etc. <sup>8.16.25</sup>

El tratamiento secundario que a nosotros nos interesa es el de los lodos activados, debido a que la mayor parte de las plantas de tratamiento de aguas que operan en nuestra ciudad, utilizan este tipo de procedimiento. La materia orgánica del efluente primario es mezclada en forma íntima con microorganismos aerobios que se encuentran suspendidos en forma floculenta. Los microorganismos se disponen sobre núcleos de materia orgánica, degradándola en forma subsecuente, formando verdaderas comunidades microbianas. Estos flóculos tienden a sedimentar si no se encuentran en agitación constante y en aereación y son conocidos como lodos activados o secundarios. <sup>8.16.25</sup>

Los lodos Secundarios o Activados son de color amarillo o café parduzco, poco oloroso, en ocasiones difíciles de operar, son biológicamente muy activos, debido a que están compuestos por un gran número de microorganismos, dentro de los cuales encontramos

bacterias, hongos protozoarios, rotíferos, algunos crustáceos, etc. Su contenido de agua es muy alto y el contenido de sólidos varía de 0.5 a 1.5%. Generalmente es mezclado con los lodos primarios para su tratamiento y eliminación.<sup>29,30</sup>

Los lodos activados tienen la propiedad de absorber y adsorber la materia orgánica coloidal y disuelta, además de compuestos inorgánicos como el amoníaco y algunos fosfatos. Para que esto se lleve al cabo se necesita que la mezcla de lodos y agua en tratamiento se encuentren en aereación de tipo mecánico o por difusión de aire. Es necesario alternar la aereación con la agitación de la mezcla, con el fin de darle tiempo a los lodos de asimilar la materia orgánica que absorben o adsorben, además de disminuir en lo posible los gastos de operación, considerando que si la aereación resulta deficiente, la eficiencia será pobre, pero si se excede en el suministro se originará un desperdicio. La cantidad de aire a proporcionar dependerá de la carga de DBO, la concentración de sólidos, el volumen de lodos activados en operación y la eficiencia que se desee en el abatimiento de la DBO. Se ha estimado que se requieren alrededor de 623 m<sup>3</sup> de aire para remover 1 Kg de DBO, en una planta que trate agua doméstica de composición media, pero la capacidad de aereación debe rendir el 150% de esta capacidad.<sup>29,30</sup>

Ya que la cantidad y tipo de microorganismos aerobios presentes en los efluentes del tratamiento primario no son suficientes para la formación de lodos capaces de degradar la materia orgánica que contienen, debido a que la generación de lodos activados es lenta, los lodos son reciclados en forma

continúa, considerando que tienen una vida media que puede ir de 3 a 4 días, cuando son utilizados para el tratamiento de aguas domésticas. Los lodos son recuperados en tanques de sedimentación similares a los del tratamiento primario, los cuales deben contener el suficiente oxígeno para evitar la inactivación de los microorganismos aerobios y se presenten condiciones sépticas. De estos tanques son tomados del 10 al 50% de los lodos para reciclarlos en los tanques de aereación y el resto debe tratarse y disponerse junto con los lodos primarios. Son utilizados en muchas plantas para facilitar la sedimentación primaria debido a su naturaleza floculenta y su capacidad de interactuar con la materia orgánica e inorgánica.<sup>8</sup>

En este tipo de tratamiento se espera una eficiencia global del 80 al 95%, en base a la reducción de la DBD y los sólidos suspendidos. Los lodos activados son muy eficientes cuando se opera en las condiciones óptimas, sin embargo son muy susceptibles a contaminantes de tipo industrial y otros tóxicos, condiciones extremas de temperatura, etc. Además el equipo e instalaciones son costosos y presentan múltiples problemas de tipo técnico.<sup>8,13,14,20,30</sup>

Existen múltiples variantes del proceso de lodos activados, los cuales se diferencian básicamente en los tiempos de aereación, agitación y tiempos de retención de las aguas en los tanques de tratamiento y son aplicados de acuerdo al tipo de aguas en tratamiento.<sup>8</sup>

#### 5.1.4 Desinfección:

Generalmente se aplica como tratamiento desinfectante la cloración de los efluentes. Sin embargo se puede dar un tratamiento de ozonificación, o simplemente depositar el efluente en una laguna de estabilización con el fin de inactivar a los microorganismos patógenos.

La cloración puede realizarse en cualquiera de las fases previas de tratamiento; ayuda a la preservación de las aguas antes de llegar a la planta o antes de su tratamiento, con lo que se evitan condiciones insalubres u ofensivas; se utiliza para eliminar microorganismos patógenos indeseables, básicamente bacterias, ya que muchos virus y parásitos resisten la desinfección con cloro; protege las instalaciones de la planta evitando la formación de gases corrosivos como el ácido sulfhídrico al eliminar los microorganismos formadores de dicho gas. Se utiliza además para abatir o controlar la carga de DBD. El cloro generalmente se suministra en forma de gas. La cantidad de gas utilizada para desinfectar debe ser lo suficientemente alta para eliminar todos los patógenos presentes, por lo que se requiere el realizar mediciones del cloro en forma rutinaria y realizar búsquedas esporádicas de patógenos en efluentes clorados. El cloro es muy reactivo e interacciona con los agentes reductores y la materia orgánica, para después reaccionar con el amoníaco y otros compuestos nitrogenados, produciendo cloraminas y otros compuestos de acción desinfectante.<sup>8,10</sup>

## 5.2 Producción De Lodos:

Los lodos son una mezcla de aguas residuales y sólidos sedimentados. De acuerdo a su origen reciben el nombre de primarios, secundarios o activados, lodos químicos, etc. Por su estado o tratamiento recibido son denominados como crudos o frescos, digeridos, húmedos o secos, etc. La cantidad y composición de los lodos dependerá del tipo de agua residual de que provenga, así como del proceso de tratamiento donde se obtengan.<sup>4,8</sup>

Los lodos producidos en las plantas de tratamientos de aguas domésticas presentan 4 problemas básicos:

- Pueden generar olores desagradables,
- Pueden contener organismos patógenos,
- Pueden contener tóxicos químicos,
- Presentan problemas de manejo y eliminación y por lo tanto problemas económicos.

Debido a lo anterior es necesario disponer de ellos en forma conveniente, de tal suerte, que no ocasionen problemas ni de tipo ambiental, ni de salud pública, ni económicos. Para poder hacer frente a este tipo de problemas se han desarrollado tratamientos que han podido solucionar uno o más de los problemas mencionados, pero no con la eficiencia que se desea. El objetivo que se persigue en un tratamiento de lodos, es obtener un lodo con características que no causen estragos al medio ambiente ni a la salud pública, al ser eliminados de la planta. A este tipo de efluente se le conoce como lodo estabilizado. Las características

de un lodo estabilizado serán definidas de acuerdo a la forma como vaya a disponerse. La digestión anaerobia de lodos de desecho es uno de los tratamientos más utilizados a nivel internacional, debido a que al operar en las condiciones adecuadas podemos eliminar un alto porcentaje de materia orgánica, así como inactivar o por lo menos disminuir la población patógena bacteriana presente en dichos lodos. <sup>3,20,30</sup>

Los lodos pueden disponerse básicamente de 4 maneras diferentes:

- Cremado o Incineración.
- Descargandolos al oceano.
- Composteo.
- Aplicación a las tierras de cultivo.

El cremado es un tratamiento sumamente energico que elimina el agua, los sólidos volatiles y microorganismos patogenos, pero su costo es muy elevado, ya que requiere de la instalación de equipo especial y consumo constante de energia. <sup>4,20,30</sup>

En el caso de la disposición por descarga al mar, cada día es menos utilizado debido a los problemas de contaminación que origina; un ejemplo de esta contaminación lo constituyen los moluscos y pescados para consumo humano infestados de patogenos. El grado de contaminación que se alcance dependerá de la procedencia de los lodos y si recibieron o no tratamiento previo a su eliminación. <sup>3,4,20,30</sup>

El composteo es una técnica muy efectiva para eliminar la

contaminación presente en lodos y en desechos sólidos. Este tipo de técnica favorece la eliminación parcial o total de agentes bacterianos patógenos y en menor proporción patógenos de otra índole, como parásitos, hongos, huevos de helminto. Sin embargo la transportación y el manejo de los lodos eleva considerablemente los costos. 4,20,30

La aplicación de lodos a las tierras de cultivo se ha empleado enormemente en varios países del mundo, como una opción para la eliminación de la contaminación, estabilización de lodos y aprovechamiento de su contenido de nitrógeno y fósforo (sustituyendo fertilizantes artificiales costosos). Sin embargo, los lodos contienen algunos compuestos tóxicos y organismos patógenos, por lo que representan un riesgo latente para la salud de las personas que trabajan la tierra y los consumidores de los vegetales. Los compuestos tóxicos pueden ejercer efectos adversos sobre los cultivos y sobre las personas que los ingieren, tienden a acumularse en el suelo. Los microorganismos patógenos pueden sobrevivir en ambientes acuáticos y terrestres durante periodos diversos que van de días a años en algunos casos. En base a lo mencionado, es necesario establecer programas de tratamiento y el uso racional de estos materiales con el fin de minimizar riesgos y aumentar los beneficios de su uso. 3,4,10,13,17,18,24,28,29,30

### 5.3 *Salmonella* En Lodos

Los lodos provenientes de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas contienen una gran cantidad y diversidad de

microorganismos, la mayor parte de ellos son saprófitos y los demás parásitos del hombre, animales o vegetales. Esto se debe a que en los lodos se concentran todos los microorganismos que provienen de la población que da origen a las aguas residuales. <sup>9,10,11,12</sup>

Dentro de los microorganismos parásitos encontramos a los patógenos. Para poder establecer los riesgos potenciales en renglón de salud pública que desencadena el manejo y disposición o eliminación de los lodos es necesario conocer que tipo de patógenos se encuentran en estos materiales, con que frecuencia aparecen, cual es su concentración y su persistencia con respecto al tiempo, así como también resulta importante el observar los aspectos epidemiológicos que desencadenan estos materiales. <sup>9,4,10,12,13</sup>

Las bacterias patógenas más comunes en los lodos de todo el mundo son las especies de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, así como las especies *E. coli* y *M. tuberculosis*. <sup>9,10,13</sup>

Debido a la obvia relación que existe entre las aguas residuales y la contaminación de tipo fecal, resultan ser de interés en salud pública el estudio de los géneros bacterianos *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio* (bacterias patógenas entericas). De ellas es más común aislar *Salmonella* de diferentes muestras del medio ambiente, por lo que es uno de los géneros más estudiados por microbiólogos ambientales e ingenieros sanitarios en la caracterización de muestras potencialmente contaminantes o

contaminadas y para monitorear la eficiencia de un tratamiento dado a dichas muestras en cuanto a la remoción de patógenos. Es riesgoso el realizar estudios basados únicamente en indicadores fecales, ya que en ocasiones la relación teórica que guardan estos microorganismos con los patógenos se rompe; se han realizado numerosos estudios en los cuales se ha observado que cuando una muestra contiene un gran número de coliformes totales y fecales la población de patógenos (se habla sólo de *Salmonella*) es nula, y en ocasiones el número de coliformes es muy bajo o es nulo y la población de *Salmonella* es muy alta. Se dice que la probabilidad del aislamiento de *Salmonella* disminuye a medida que la concentración de coliformes fecales se incrementa.<sup>19</sup>

La presencia de *Salmonella* en lodos ha sido estudiada en diversos países (Inglaterra, Suiza, Reino Unido, entre otros), ya que son ocupados para el abono de tierras de cultivo y han causado preocupación a las autoridades de estos países su persistencia en el medio ambiente. Se sabe que la concentración es muy variable y se encuentra afectada por las condiciones climáticas. Su concentración puede variar en semanas, días e incluso en horas, por lo que el establecer parámetros poblacionales de este microorganismo y otros presentes en los lodos se dificulta. Por ejemplo en algunos países desarrollados se han reportado concentraciones que van desde 40 a  $10^6$  por cada 100ml. Es de esperarse que en los países en desarrollo las poblaciones de este género en lodos se eleve, debido a los bajos recursos económicos y los malos hábitos de higiene. La presencia de *Salmonella* es más común y abundante en los lodos provenientes de plantas que sirven

a una población de 10,000 a 100,000 habitantes, comparado con plantas que benefician a poblaciones menores o mayores a dicho rango. <sup>9,4,6,10,12,19,20,31</sup>

La contaminación de los lodos por *Salmonella* se cataloga como un riesgo potencial a la salud pública, debido a que existen múltiples factores de tipo ambiental que disminuyen los riesgos de infección y enfermedad. Es necesario establecer los riesgos reales que representan los lodos para implantar los tratamientos adecuados, con el fin de evitar gastos innecesarios y se pueda controlar esta fuente potencial de contaminación y de infección.<sup>24</sup>

#### 5.4 Producción y Tratamiento de Aguas Residuales en México

Debido a la explosión demográfica creciente y a la explotación irracional de los recursos naturales renovables y no renovables en nuestro país, el problema de la contaminación ambiental se ha incrementado en todos los campos.<sup>27</sup> La producción de aguas residuales en el país tiene 3 diferentes orígenes:

- Sector Social, que incluye descargas domésticas y municipales.
- Sector Industrial.
- Sector Agropecuario

Para 1990 se ha estimado que la cantidad de agua requerida por estos sectores y la producción de aguas residuales en el país son:

Sector:	Agua Requerida	Agua Residual Producida
Social	146.4 m <sup>3</sup> /s	109.8 m <sup>3</sup> /s
Industrial	97.6 m <sup>3</sup> /s	82.9 m <sup>3</sup> /s
Agropecuaria	69,542 millones de m <sup>3</sup>	8,345 millones de m <sup>3</sup>

SEDUE: PRIMER SEMINARIO DE CONTAMINACION DEL AGUA. 1988

Para la prevención de la contaminación por las aguas residuales producidas por el sector social, así como su control, se han construido un número limitado de plantas de tratamiento en el país. De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua (CNA, 1989) en las 650 poblaciones con más de 10,000 habitantes sólo existen 256 plantas de tratamiento con una capacidad instalada de 14 m<sup>3</sup>/s, lo que representa aproximadamente el 12% del caudal total evacuado. El 65% de estas plantas no opera, el 7% opera con eficiencias menores al 40% de su capacidad, el 23% opera con eficiencias del 40 al 80% y sólo un 5% de las plantas alcanzan eficiencias superiores al 80%. El 54% de estas plantas opera con lagunas de estabilización, el 13% sólo con tratamiento primario y el 33% restante da tratamiento secundario por lodos activados, aereación extendida, filtros rociadores, zanjas de oxidación o lagunas de aereación. 15,16,17,23,27

Cabe mencionar que no existe tratamiento a los lodos de desecho producidos por estas plantas. El volumen de lodos líquidos producidos en México por el sector social, estimados para 1990, es

de 29.5 millones de metros cúbicos, que equivalen a 885,000 toneladas de materia seca.<sup>17,29,27</sup>

En el sector industrial la cantidad de plantas de tratamiento de aguas residuales para 1985 eran alrededor de 60. Para 1990 el volumen de lodos provenientes de la industria ascendían a 118.7 millones de m<sup>3</sup> que equivalen a 3,560 millones de toneladas de materia seca.<sup>17,29,27</sup>

### 5.5 Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en el Valle de México

Debido a las condiciones hidrológicas singulares del Valle de México y su situación geográfica, se ha tenido la necesidad de construir plantas de tratamiento de aguas residuales con el fin de sanear las aguas de desecho, para que no contaminen los mantos acuíferos y sistemas hidráulicos de agua potable, así como también el proveer a la ciudad de agua para reuso, ahorrando el agua potable que se utilizaría en actividades que no requieren agua de primera calidad, tal como el riego de áreas verdes, llenado de lagos de ornato, fuentes y usos industriales.<sup>15,16</sup>

Existen en la actualidad 17 plantas de tratamiento de aguas residuales en nuestra ciudad. Sin embargo dichas plantas no tienen la capacidad de tratar el volumen total de agua residual producida en el Valle de México, la cual asciende de 55 a 60 metros cúbicos por segundo. En 1990, la capacidad instalada total de estas plantas era de 3.4 m<sup>3</sup>/s. Por cuestiones económicas y la falta de

mantenimiento, el volumen total de aguas tratadas fue menor. El volumen de aguas residuales restante (sin tratamiento), es utilizado para el riego de 18,000 hectareas de cultivo en el Valle de México y para el riego de 80,000 hectareas en el Valle de Tula. El volumen destinado al distrito de desarrollo rural # 63 en el Valle del Mezquital corresponde a una tercera parte del volumen de aguas residuales producidas en el Valle de México y es desalojado a través del sistema de drenaje, junto con el agua proveniente de lluvias que no es aprovechado. El uso de las aguas residuales para el riego de esta zona, constituye el plan de aprovechamiento de aguas servidas más grande del mundo.<sup>15,16,24</sup>

Las plantas antes mencionadas, fueron diseñadas para utilizar el proceso biológico de Lodos Activados principalmente (tratamiento secundario). Dicho proceso se eligió considerando criterios económicos principalmente y porque al momento de su instalación la calidad Fisico-Químico-Biologicas (FQB) correspondían al tipo domestico, debido a que los desechos industriales no representaban un problema significativo.<sup>16</sup>

#### 5.5.1. Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Chapultepec

La planta de Chapultepec fue la primera que se instaló en la Ciudad de México, en 1956. Se encuentra ubicada al poniente de la Ciudad de México, en la 3ª sección del Bosque de Chapultepec en la Delegación Miguel Hidalgo.<sup>16</sup>

Esta planta trata las aguas provenientes de algunas colonias

vecinas a la misma, entre las cuales se incluyen Las Lomas de Chapultepec, Bosques de las Lomas y Polanco entre otras. Es importante mencionar que esta planta, trata las aguas provenientes del Instituto Nacional de Perinatología. Las aguas residuales llegan a la planta a través de 3 colectores provenientes de las colonias mencionadas y que desembocan en el desarenador de la planta.<sup>15,16</sup>

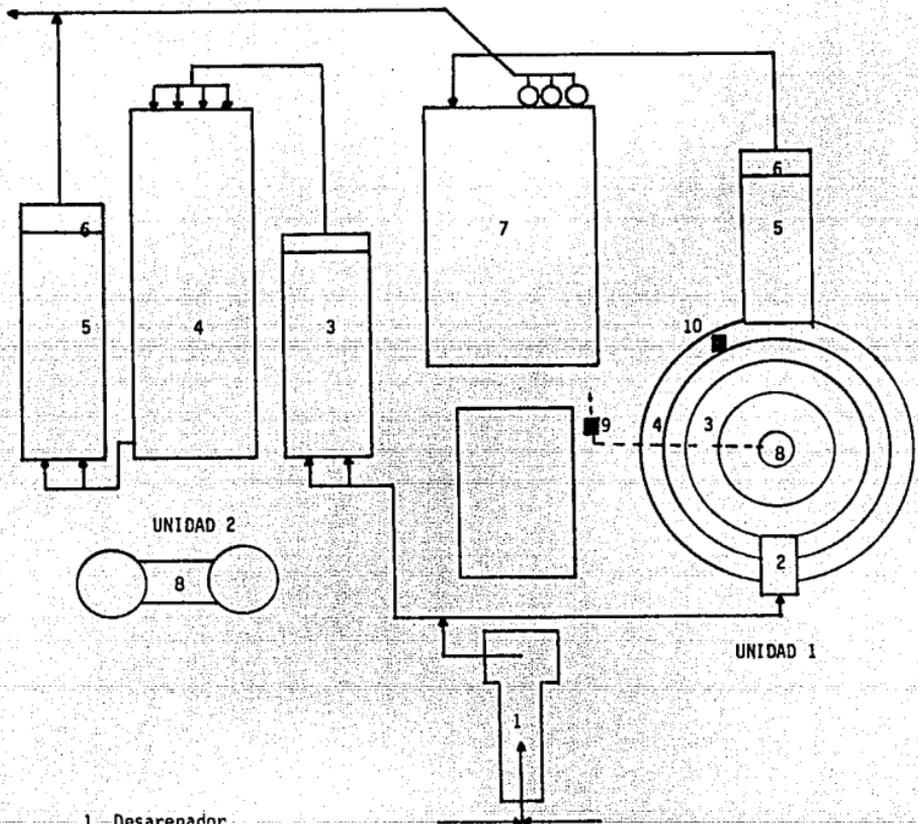
El agua que trata esta planta es considerada como de tipo doméstico. El agua residual que llega a este lugar recibe un tratamiento compuesto de 4 etapas: 1) Preliminar; 2) primario; 3) secundario (lodos activados); 4) cloración.<sup>15,16,22</sup>

Para llevar a efecto las etapas descritas la planta posee las siguientes instalaciones (ver figura 5.1):

- Un desarenador con rejillas y apoyado por un sistema de bombeo.
- 2 unidades de tratamiento constituidas por:
  - a) Tanques de sedimentación primaria,
  - b) Tanques de aereación de lodos activados,
  - c) Tanques de sedimentación secundaria.
  - d) Sección de cloración de las aguas tratadas.

Además cuenta con digestores anaerobios para lodos, los cuales no se encuentran en operación. Debido a esto los lodos son desechados por el drenaje sin tratamiento alguno al igual que en el resto de las plantas de la zona metropolitana, mezclándose con las aguas residuales no tratadas.<sup>22</sup>

Figura 5.1 : Planta de Tratamiento de Aguas  
Residuales de Chapultepec, DGCORH



1. Desarenador
2. Eliminador de Grasas
3. Sedimentadores Primarios
4. Tanques de Aereación
5. Sedimentadores Secundarios
6. Sección de Cloración
7. Estanque Recolector
8. Digestores de Lodos
9. Sitio de Toma de Muestra de Lodos Primarios
10. Sitio de Toma de Muestra de Lodos Secundarios

Las aguas tratadas en esta planta son utilizadas para el riego del Bosque de Chapultepec y el llenado de lagos y fuentes de ornato.<sup>15,16</sup>

### 5.6 Epidemiología de Salmonelosis en México

Las salmonelosis son muy frecuentes en los meses de verano al igual que todas las enfermedades infecciosas intestinales. Esto es más palpable en los países en desarrollo, afectando a la población humana y animal. Su distribución con respecto a otras enfermedades infecciosas intestinales, en cuanto a morbilidad y mortalidad se refieren es baja, por ejemplo, en México las salmonelosis constituyen alrededor del 2% del total de dichas enfermedades reportadas en el periodo 1980-1988. Sin embargo, el porcentaje tiende a aumentar en los últimos 2 años de dicho periodo. En la tabla 5.1 se observan los casos de salmonelosis reportadas en el país desde 1980 hasta 1990. Para 1990 se reportaron para el D.F., 195 casos de fiebre tifoidea y 1353 casos de otras salmonelosis. El estado con mayor número de casos de fiebre tifoidea fue Tamaulipas, mientras que Veracruz fué el estado con mayor incidencia del resto de las salmonelosis.<sup>9</sup>

Las enfermedades infecciosas intestinales año con año constituyen un problema serio a la salud pública de nuestro país. Los sectores más afectados son las poblaciones infantil, preescolar, escolar y senil. Esto se ve reflejado en la tabla 5.2 en la cual se presenta la mortalidad por enfermedades infecciosas intestinales, en las diferentes poblaciones del país, en los

años 1975 y 1987. Si comparamos los datos de 1975 con los más recientes, observamos que la tasa de mortalidad general disminuyó de 84.9 a 36.5. Este dato es muy similar en todas las poblaciones, lo cual es muy alentador.<sup>9</sup>

Cabe recalcar que en 1975, las salmonelosis en general constituían la 10<sup>a</sup> causa de muerte en las poblaciones preescolares y escolares con una tasa de mortalidad de 5.4 y 1.8 respectivamente, sugiriendo que se han hecho múltiples esfuerzos por reducir este tipo de enfermedades en nuestro medio.<sup>9</sup>

Estos datos nos dicen que los esfuerzos realizados han logrado frutos en este campo, pero también nos indican que debemos redoblar esfuerzos para minimizar al máximo este tipo de enfermedades. Las salmonelosis, como ya se ha mencionado, son transmitidas por vehículos contaminados, específicamente el agua y los alimentos. La purificación del agua de consumo humano y el tratamiento de las aguas residuales domésticas y agropecuarias, así como el saneamiento en general, pueden ser la solución del problema de infección a través del agua.<sup>9</sup>

El manejo de los alimentos no deben realizarlo personas enfermas o en estado de portador; el almacenamiento, transporte y procesamiento debe realizarse con limpieza absoluta. Se deben establecer controles estrictos en cuanto a la presencia de patógenos.<sup>9,16</sup>

El contacto directo o indirecto con una persona enferma o en

estado de portador constituyen un riesgo focal, muy común en nuestro medio. Si se eliminan los riesgos de infección a través del agua y los alimentos, la localización y tratamiento oportuno de enfermos y portadores, y el tomar las medidas adecuadas de higiene personal, disminuirán los niveles tan elevados que existen de estas enfermedades.

Tabla 5.1: Las Salmonelosis en México  
(número de casos reportados de 1980 a 1990)

AÑO	Enfermedades Infecciosas Intestinales	Fiebre Tifoidea	Fiebre Paratifoidea y otras Salmonelosis
1980	1'558,134	5,349	19,179
1981	2'351,650	5,084	25,261
1982	2'809,475	6,780	28,273
1983	3'241,447	7,992	33,564
1984	3'417,210	7,629	31,089
1985	3'753,822	7,980	33,534
1986	3'398,013	8,170	48,804
1987	3'571,980	11,078	68,423
1988	2'918,898	13,468	81,636
1989		15,978	89,001
1990		11,605	77,934

FUENTE: DGE/SSA: EPI-1-05, EPI-1-70, EPI-1-85

**Tabla 5.2: Mortalidad por Enfermedades Infecciosas Intestinales  
en los Estados Unidos Mexicanos (1975, 1987)**

Población	1975		1987	
	Tasa *	# Defunciones	Tasa *	# Defunciones
Infantil (< 1 año)	1,167.8	13,364	653.6	
Preescolar (1 a 4 años)	122.1	5,819	71.0	
Escolar (5 a 14 años)	12.3	1,132	5.4	
De 15 a 24 años	6.2	521	2.9	
De 25 a 44 años	12.4	1,187	5.9	
De 45 a 64 años	39.3	1,949	22.3	
65 años o más	248.0	5,542	191.6	

\*: Tasa de mortalidad por 100,000 habitantes de la población correspondiente.

FUENTE: DGE/SSA:

EPI-I-65, EPI-I-70, EPI-I-85

## 6. DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Se muestrearon lodos primarios y secundarios de la planta de tratamiento de aguas residuales de Chapultepec. Para el aislamiento e identificación de *Salmonella* en los lodos, se utilizó una marcha bacteriológica que puede resumirse en los siguientes pasos: Enriquecimiento de la muestra; diferenciación y selección de colonias sospechosas en placas con medios de cultivo específicos para tal fin; identificación por pruebas bioquímicas; confirmación serológica.

El procesamiento de las muestras descrito, fue utilizado también para la búsqueda de *Salmonella* en algunas muestras de efluente de un digestor anaerobio convencional de lodos primarios, con el fin de evaluar el tratamiento anaerobio en cuanto a la remoción de dicho patógeno.

Para establecer la resistencia de *Salmonella* en lodos primarios, se realizó un ensayo de sobrevivencia de *S. typhi* (como modelo experimental), con el fin de evaluar el riesgo potencial que implica la eliminación de los lodos en estado crudo, es decir sin tratamiento.

Los materiales, equipos, medios de cultivo, reactivos y soluciones utilizados en este estudio, así como los detalles del trabajo experimental se mencionan en este capítulo.

## 6.1 Material, Equipo, Medios De Cultivo, Reactivos Y Soluciones , Reactivos Biológicos

### Material

- Asas bacteriológicas
- Cajas Petri de 10 cm de diámetro
- Celdas espectrofotométricas
- Equipo de protección
- Lámpara
- Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1,000 ml
- Matraz volumétrico de 100 ml
- Mechero Bunsen y Fisher
- Pinzas de disección
- Pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Portaobjetos
- Sistema de filtración Millipore
- Tripies y telas de asbesto
- Tubos de ensayo de 12x75, 13x100 y 16x150
- Vasos de precipitados de 250 y 500 ml

### Equipo

- Autoclave
- Baño María a 45°C
- Cuenta colonias
- Espectrofotometro
- Estufa
- Incubadora a 35°C
- Microscopio óptico

### Medios de Cultivo

- Agar bacteriológico
- Agar citrato de Simmons
- Agar de hierro lisina(LIA)
- Agar de hierro triple azúcar (TSA)

- Agar nutritivo
- Agar Salmonella-Shigella
- Agar sulfito-bismuto
- Base agar urea
- Caldo malonato modificado de Edwing
- Caldo nutritivo
- Caldo selenito con cisteina
- Caldo tetracionato con carbonato
- Medio movilidad-indol-ornitina (MIO)
- Medio sulfhidrico-indol-movilidad

#### Reactivos y Soluciones

- Acriflavina 1:500
- Alcohol-acetona
- Alcohol etilico al 96%
- Cristal violeta
- Hipoclorito de sodio
- Lugol
- Reactivo de Ehrlich
- Safranina
- Solución de Yodo para caldo tetracionato
- Solución salina isotónica (SSI)

#### Reactivos Biológicos

- Suero polivalente contra *Salmonella* del grupo A al I + Vi
- Suero polivalente contra *Salmonella* del grupo A al E + Vi
- Suero monovalente contra *Salmonella* grupo D

## 6.2 Metodología del Aislamiento de *Salmonella* spp en Lodos Primarios y Secundarios

### 6.2.1 Muestreo:

Los lodos fueron colectados en la planta de tratamiento de aguas de Chapultepec. Los lodos primarios se muestrean a partir de la tubería de purga de los tanques de sedimentación primaria de la unidad 1. La muestra de los lodos secundarios se obtiene de la sedimentación de la mezcla líquida de los tanques de aireación de la misma unidad (ver figura 5.1). Fueron recolectadas dos muestras diferentes de lodos primarios y dos de lodos secundarios en cada día de muestreo con el fin de disminuir la probabilidad de fracaso en el aislamiento de *Salmonella* por una toma de muestra en forma inadecuada. Los lodos fueron recolectados en cubetas de plástico limpias y posteriormente se transportan en garrafones de PVC limpios. El muestreo lo realizó personal del laboratorio de Ingeniería Ambiental de la DEPF1 y se transportan en forma inmediata a las instalaciones del laboratorio donde se procesan al momento de llegada. El tiempo promedio empleado desde el momento de recolección al procesamiento de las muestras fue de 3 horas. Los muestreos se realizaron los días lunes y miércoles.

### 6.2.2 Métodos Empleados:

Se analizaron los lodos primarios y secundarios de la siguiente forma: Se colocan 2 ml de la muestra correspondiente en un tubo de ensaye que contenga de 8 a 10 ml de caldo selenito y otros 2 ml de lodo en un volumen similar de caldo tetrationato,

preparados el mismo día. Se incuban a 35°C de 12 a 18 hrs.

Al término de esta incubación, se estrián por agotamiento en placas de agar *Salmonella-Shigella* y de Sulfito-Bismuto 1 asada de cada uno de los medios de enriquecimiento. Se incuban las placas de 24 a 35°C. A partir de las placas son seleccionadas colonias sospechosas:

En agar *Salmonella-Shigella* buscamos colonias Lac<sup>-</sup>, es decir colonias que no fermenten lactosa. Las colonias Lac<sup>-</sup> viran el medio a color amarillo (alcalino), las colonias Lac<sup>+</sup> viran el medio a color rosa-rojo (ácido), debido a la producción de ácidos a partir de la lactosa. Las colonias de *Salmonella* generalmente producen H<sub>2</sub>S, por lo que en este medio toman una coloración negra, sin embargo la producción de este ácido puede ser limitada y no se manifiesta claramente el color negro. Las colonias son convexas, brillantes, de bordes enteros. En ocasiones puede existir enmascaramiento en cuanto al vire del medio, además de que pueden presentarse colonias con características rugosas.

En agar sulfito-bismuto se buscan colonias negras, convexas, de bordes enteros. Muchas de las colonias de *Salmonella*, tienen tonalidades diferentes que se disponen en forma concéntrica, que a las 48 hrs de incubación no se aprecian. Muchas de las colonias presentan halos de precipitación de color negro y algunas presentan un brillo metálico. Existen colonias en que no se aprecia su producción de H<sub>2</sub>S y presentan una coloración café-grisáceo. Muchos autores recomiendan la incubación de estas

placas por un tiempo de 48 hrs. Sin embargo, muchas colonias son fácilmente diferenciables a las 24 hrs, debido a los contrastes de color, ya que con más tiempo de incubación, muchas de las colonias que se desarrollan en este medio, diferentes a *Salmonella*, tornan a una coloración negra difícilmente diferenciable.

Una vez seleccionadas las colonias, es necesario realizar una tinción al Gram con el fin de verificar sus características microscópicas y confirmar la pureza de la colonia.

Todas las colonias sospechosas que estén compuestas por bacilos cortos gramnegativos y no tengan contaminación por otro tipo de microorganismo, se inoculan en una serie de pruebas bioquímicas, a fin de identificar el género de la colonia aislada, buscando preferentemente *Salmonella*. Las pruebas bioquímicas utilizadas en este estudio fueron:

- Fermentación de Carbohidratos: glucosa, lactosa y sacarosa.
- Catabolismo de citrato y malonato.
- Descarboxilación de Aminoácidos: lisina y ornitina.
- Hidrólisis de urea.
- Producción de H<sub>2</sub>S e indol.
- Movilidad.
- Producción de gas a partir de glucosa (G/I).

El perfil bioquímico que caracteriza a las especies de *Salmonella*, con respecto a los otros géneros de las enterobacterias se presentan en el anexo I.

Una vez que se han identificado bioquímicamente las colonias aisladas como *Salmonella*, se realiza la confirmación serológica. Para realizarla, se realizan ensayos de aglutinación en placa de vidrio. Los sueros utilizados en este estudio están dirigidos en contra del Antígeno O de superficie, por lo que se requiere saber si la cepa aislada se encuentra en fase lisa o en fase rugosa. Para conocer que tipo de cepa es la estudiada, se realiza un ensayo de autoaglutinación con acriflavina 1:500, en el cual las cepas rugosas autoaglutinan, a diferencia de las cepas lisas. Para realizar lo anterior, en un portaobjetos de vidrio, se suspende en una gota de solución salina isotónica (SSI), una asada de la cepa a estudiar, de tal forma que quede una suspensión homogénea y turbia. A continuación se le añade una gota de la solución de acriflavina y se mezclan perfectamente utilizando un aplicador de madera. Se agita el portaobjetos con movimientos suaves giratorios por un minuto y se observa a contraluz. Si las bacterias aglutinan, la cepa en estudio es de tipo rugoso y no podemos tipificarla con los sueros utilizados (ver anexo 1); si la cepa no aglutina en acriflavina corresponde a una cepa de tipo liso, por lo que se procede a realizar los ensayos serológicos.

Las cepas lisas son estudiadas con 2 sueros polivalentes y uno monovalente. El primer suero polivalente abarca del grupo A al grupo I y nos indica que la cepa aislada es *Salmonella*. El segundo polivalente abarca del grupo A al grupo E y nos indica si la cepa aislada pertenece a los grupos de mayor incidencia a nivel mundial. El suero monovalente para el grupo D, nos indicará si la

cepa aislada es *S. typhi*<sup>\*</sup>, agente etiológico de la fiebre tifoidea.

El procedimiento para la tipificación serológica es similar al descrito anteriormente para la autoaglutinación: en un portaobjetos se suspende en SSI una asada de la cepa, de tal manera que se obtenga una suspensión turbia y homogénea. Se le añade una gota del primer suero, se homogeniza con un aplicador de madera, se agita el portaobjetos con movimientos suaves durante 1 minuto y se lee a contraluz. Un resultado positivo estará dado por una aglutinación uniforme en la mezcla de reacción. El mismo procedimiento se realiza con los sueros restantes e incluso podemos realizar todos en un solo portaobjetos.

En el esquema 6.1 se resume la metodología antes descrita.

Con respecto al control de calidad de la marcha antes descrita, en todos los muestreos se realizaron testigos de esterilidad para cada uno de los medios. Como testigos positivos se utilizaron 3 cepas pertenecientes a la colección del cepario de la Facultad de Química: *S. typhi*, *S. paratyphi* A y *S. enteritidis*.

### 6.2.3 Análisis del Efluente de un Digestor Convencional de Lodos Primarios

El efluente fue muestreado de un digestor anaerobio convencional de 8.0 litros que opera en el laboratorio de

\* Deben coincidir características bioquímicas y serológicas.

Ingeniería Ambiental de la DEFFI. El digestor es alimentado diariamente con lodo primario de la planta de Chapultepec, con un tiempo de retención de 28 días. Para obtener la muestra se homogenizó el contenido del digestor y se extrae por una llave inferior, impidiendo la entrada de aire.

El análisis de la muestra es similar al realizado con los lodos primario y secundario, por lo que resultaría repetitivo el describirla nuevamente (ver técnica descrita y diagrama 6.1).

### 6.3 Ensayo de Supervivencia de *S. typhi* en lodo Primario.

Para realizar este estudio, se utilizaron lodos primarios esterilizados en autoclave, la cepa de referencia: *S. typhi* y caldo nutritivo como medio control. El ensayo tuvo como fin el observar la persistencia de *S. typhi* en lodos primarios con respecto al tiempo, ya que se define a esta especie como parásito obligado del hombre, incapaz de reproducirse y resistir mucho tiempo fuera de su huésped en medios naturales, por lo que su supervivencia en estos medios constituye un riesgo de salud muy importante.

Se prepararon una serie de matraces con 49.5 ml de lodo primario esterilizado y una serie de igual número con 49.5 ml de caldo nutritivo esterilizado. A cada matraz se le inoculó 0.5 ml de un cultivo de toda la noche de *S. typhi*, cuya población fue ajustada de acuerdo al tubo número 5 de la escala de Mac Farland ( $1.5 \times 10^9$  bacterias/ml). Posteriormente se colocaron en la

incubadora a 35°C. Cada matraz corresponde a un tiempo del ensayo; en cada tiempo, determinamos la cuenta viable.

#### Determinación de Cuenta Viable:

Se realizan diluciones seriadas de lodo y de caldo nutritivo para cada tiempo. Se toma 0.1ml de la dilución a estudiar y se añade a un tubo de ensayo que contenga 3.5 ml de agar blando (agar bacteriológico al 0.6%) previamente fundido a una temperatura de 45°C. Se homogeniza la mezcla y se vacía sobre una placa de agar nutritivo esterilizado. Se distribuye el agar blando en toda la superficie a manera de que se forme una película homogénea. Se incuban las placas 24 hrs a 35°C y se cuentan las colonias formadas. Sólo se toman como válidas las placas con un número mínimo de 30 colonias y un máximo de 300. Se calcula la cuenta viable con la siguiente fórmula:

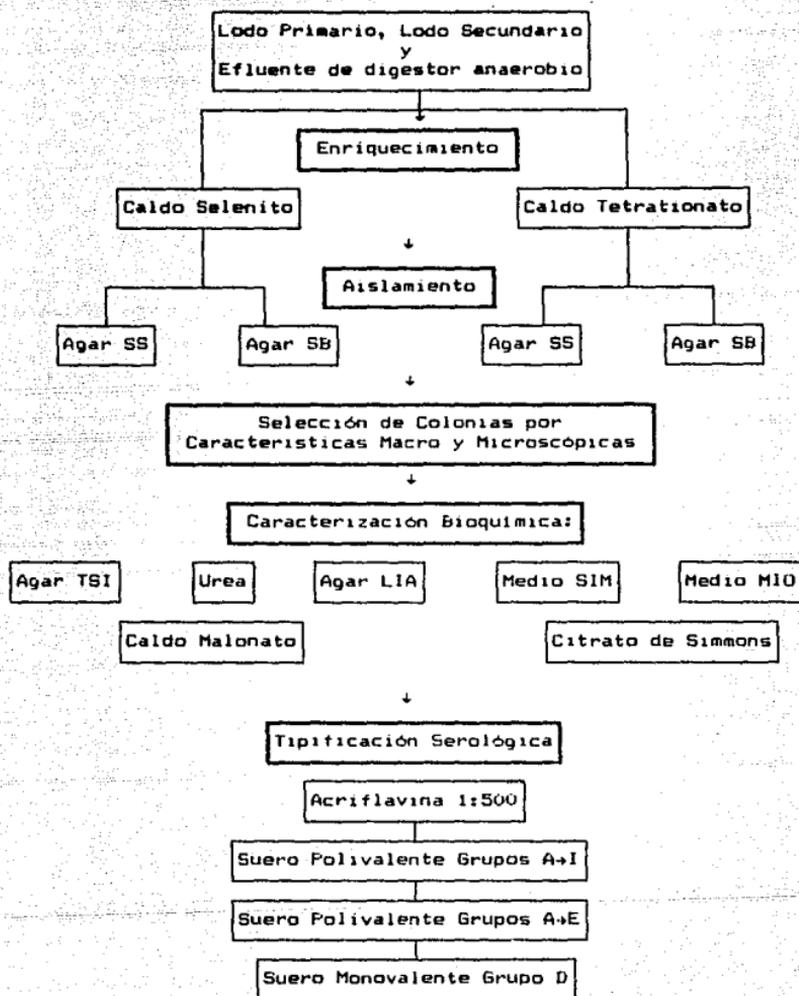
$$\text{Cuenta Viable} = \frac{\text{No. de colonias}}{0.1} \times \frac{1}{\text{Dilución}} = \text{UFC/ml}$$

donde el número de colonias corresponde al número reportado de colonias en la placa de la dilución correspondiente. El 0.1 expresa la alícuota de la dilución estudiada, y todo es multiplicado por la inversa de la dilución. La cuenta viable se expresa por Unidades Formadoras de Colonias por mililitro de muestra.

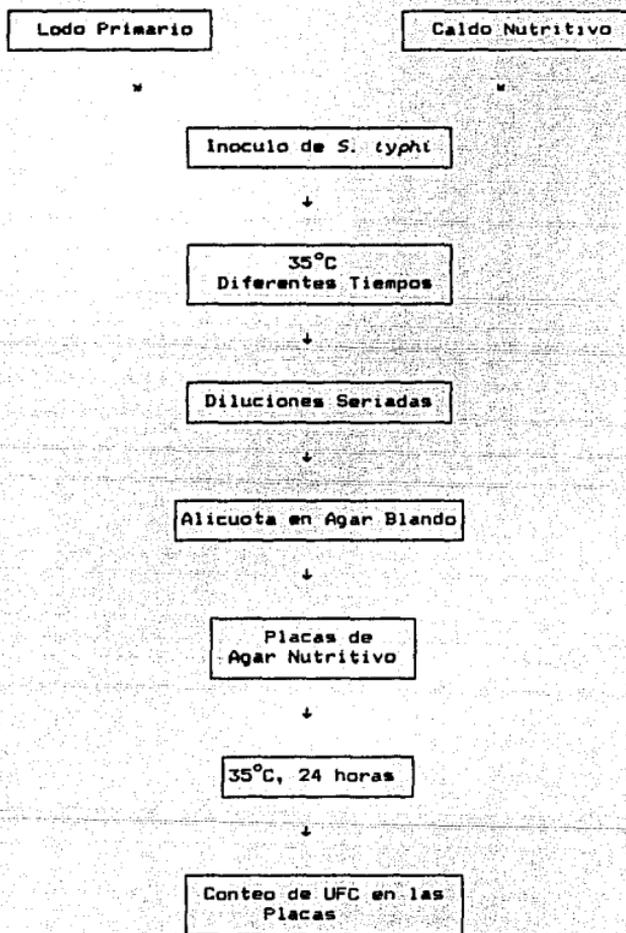
La técnica descrita se resume en el esquema o.2.

Se realizó esta prueba por duplicado tanto para lodo como para caldo nutritivo control. También se realizaron pruebas de esterilidad para lodos esterilizados y caldo nutritivo y se realizaron aislamientos regulares para comprobar que es precisamente *S. typhi* el microorganismo contado.

Esquema 6.1: Aislamiento y tipificación de *Salmonella* en Lodos



Esquema 6.2: Ensayo de sobrevivencia de Salmonella en Lodo Primario



## 7. RESULTADOS

### 7.1 *Salmonella* En Lodos Primarios

A partir de los lodos primarios analizados -33 días de muestreo con 66 muestras totales- se aislaron un total de 520 colonias sospechosas, de las cuales sólo 53 (10.2%) correspondían a cepas del género *Salmonella*. El número de días de muestreo *Salmonella* positivos fue de 22 (70%).

La especie de *Salmonella* más frecuentemente aislada fue *S. enteritidis*, seguida de *S. typhi* y *S. cholerae-suis*. Debido a que no pudo diferenciarse bioquímica y serológicamente a las cepas que posiblemente corresponden a la especie *S. cholerae-suis*, son consideradas en este estudio como *S. enteritidis*. (ver tabla 7.1).

De las cepas identificadas bioquímicamente como *Salmonella*, 46 (86%) fueron de superficie lisa y por lo tanto susceptibles de identificarlas serológicamente. El 100% de las cepas lisas pertenecen a los grupos de *Salmonella* de A hasta I; 43 (93%) de estas cepas corresponden a los grupos de A hasta E y sólo 2 (4.3%) de las cepas lisas analizadas pertenecen al grupo D (ver tabla 7.1).

En cuanto al aislamiento de *Salmonella* con las diferentes combinaciones utilizadas de caldo de enriquecimiento-medio selectivo, la combinación más eficiente resulto ser el caldo selenito con el agar sulfito-bismuto (49% de las cepas aisladas);

le siguen las combinaciones caldo selenito con agar Salmonella-Shigella (27%), caldo tetracionato-agar SS (13%) y por último tetracionato-sulfito-bismuto (ver tabla 7.4).

En los lodos primarios fueron aislados individuos de otras especies bacterianas, que se enlistan en la tabla 7.5.

## 7.2 Salmonella en Lodos Secundarios

A partir de los lodos secundarios estudiados (33 días de muestreo con 66 muestras totales) fueron analizadas 389 colonias sospechosas, de las cuales 29 (7.45%) correspondían a *Salmonella* spp. El número de muestreos *Salmonella* positivos fueron 15 (45%).

En este tipo de lodo la especie de *Salmonella* más frecuente fue *S. enteritidis*; se aisló sólo una cepa que posiblemente corresponde a *S. cholerae-suis*, pero no se aislaron cepas de *S. typhi* (ver tabla 7.2).

Veintisiete (93%) de las cepas de *Salmonella* spp aisladas y bioquímicamente identificadas son de superficie lisa; el 100% de estas, corresponden a los grupos que van desde A hasta I de *Salmonella*; 25 (92.6%) de estas cepas corresponden a los grupos que van de A hasta E, pero no se encontró miembros del grupo D.

En cuanto a la combinación de medios de enriquecimiento-selección para el aislamiento de *Salmonella* spp en

estos materiales fué la del caldo selenito con el agar sulfito bismuto (58.6% de las cepas aisladas); le siguen las combinaciones caldo selenito-agar SS (27.6%), caldo tetracionato-agar SS (10.3%) y por último (3.5%) caldo tetracionato con el agar SB (ver tabla 7.4).

En la tabla 7.5 se enlistan otras especies bacterianas aisladas e identificadas a partir de los lodos secundarios.

### 7.3 *Salmonella* En el Efluente de un Digestor Anaerobio Convencional de Lodos Primarios

Sólo fueron analizadas 5 muestras del efluente de un digestor anaerobio de lodos primarios. De este tipo de material fueron aisladas y seleccionadas 78 colonias sospechosas, de las cuales 12 (15.4%) correspondieron al género *Salmonella*. El porcentaje de muestras positivas fué del 80%.

La especie más frecuente fue *S. enteritidis* y se aisló una cepa de *S. typhi* (ver tabla 7.3).

El 100% de las cepas aisladas son de superficie lisa; estas cepas pertenecen a los grupos que van de A hasta I y de A hasta E; una cepa corresponde al grupo D (ver tabla 7.3).

De las combinaciones de medios utilizados para el aislamiento de *Salmonella* en este tipo de material, la que resultó más eficiente fué el caldo selenito con el agar sulfito bismuto

(58.33% de las cepas aisladas); le siguieron el caldo tetracionato con sulfito bismuto (25%) y las combinaciones del caldo selenito y tetracionato con el agar Salmonella-Shigella, ambas con el 8.3% de cepas aisladas (ver tabla 7.4).

En la tabla 7.5 se enumeran las especies bacterianas encontradas en el efluente además de *Salmonella*.

Tabla 7.1: *Salmonella* en Lodos Primarios.

Muestra	Fecha (1990)	Especie de <i>Salmonella</i>	Cepas		Grupos		
			L	R	A a I	A a E	D
1	23-IV	-					
2	25-IV	<i>S. enteritidis</i> *	1		1	-	-
3	30-IV	-					
4	2-V	<i>S. enteritidis</i>		1			
5	7-V	<i>S. typhi</i>	1		1	1	1
		<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
6	9-V	-					
7	14-V	-					
8	16-V	<i>S. typhi</i>	1		1	1	1
		<i>S. enteritidis</i>	4		4	4	-
9	23-V	<i>S. enteritidis</i>	2	1	2	1	-
10	28-V	<i>S. enteritidis</i>	1	1	1	1	-
11	30-V	<i>S. enteritidis</i>	2		2	2	-
12	4-VI	-					
13	6-VI	<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
14	11-VI	-					
15	13-VI	<i>S. enteritidis</i>	5		5	5	-
16	20-VI	-					
17	25-IV	<i>S. enteritidis</i>	4		4	4	-

*Salmonella sp.* : Identificada por pruebas bioquímicas.

Cepas L y R: Cepas de superficie lisa y rugosa, respectivamente.

Grupos A a I: *Salmonella* del grupo A a I.

Grupos A a E: *Salmonella* del grupo A a E.

Grupo D: *Salmonella* grupo D y posible *S. typhi*.

\*: Posible *Salmonella cholerae-suis*

Tabla 7.1: *Salmonella* en Lodos Primarios (continuación).

Muestra	Fecha (1990)	Especie de <i>Salmonella</i>	Cepas		Grupos		
			L	R	A a I	A a E	D
18	2-VII	-					
19	4-VII						
20	9-VII	<i>S. enteritidis</i>	4		4	4	-
21	11-VII	<i>S. enteritidis</i> *	1	1	1	1	-
		<i>S. enteritidis</i>	3		3	3	-
22	16-VII	<i>S. enteritidis</i>	4		4	4	-
23	18-VII	-					
24	25-VII	<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
25	30-VII	<i>S. typhi</i>		1			
26	20-VIII	<i>S. enteritidis</i>	2		2	1	-
27	22-VIII	<i>S. enteritidis</i>	2		2	2	-
28	27-VIII	<i>S. enteritidis</i>	2	1	2	2	-
29	29-VIII	<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
30	3-IX	-					
31	5-XI	<i>S. typhi</i>		1			
32	12-XI	<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
33	14-XI	<i>S. enteritidis</i>	2		2	2	-
Total		53	46	7	46	43	2

*Salmonella* sp: Identificada por pruebas bioquímicas.

Cepas L y R: Cepas de superficie lisa y rugosa, respectivamente.

Grupos A a I: *Salmonella* del grupo A a I.

Grupos A a E: *Salmonella* del grupo A a E.

Grupo D: *Salmonella* grupo D y posible *S. typhi*.

\*: Posible *S. cholerae-suis*.

Tabla 7.2: *Salmonella* en Lodos Secundarios.

Muestra	Fecha (1990)	Especie de <i>Salmonella</i>	Cepas		Grupos		
			L	R	A a I	A a E	D
1	23-IV	-					
2	25-IV	-					
3	30-IV	-					
4	2-V	-					
5	7-V	<i>S. enteritidis</i>	2		2	2	-
6	9-V	-					
7	14-V	<i>S. enteritidis</i>		1			
8	16-V	-					
9	23-V	<i>S. enteritidis</i>	1	1	1	1	-
10	28-V	-					
11	30-V	-					
12	4-VI	-					
13	6-VI	-					
14	11-VI	-					
15	13-VI	<i>S. enteritidis</i>	2		2	2	-
16	20-VI	<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
17	25-VI	<i>S. enteritidis</i>	4		4	4	-

*Salmonella* sp: Identificada por pruebas bioquímicas.

Cepas L y R: Cepas de superficie lisa y rugosa, respectivamente.

Grupos A a I: *Salmonella* del grupo A a I.

Grupos A a E: *Salmonella* del grupo A a E.

Grupo D: *Salmonella* grupo D y posible *S. typhi*.

Tabla 7.2: *Salmonella* en Lodos Secundarios (continuación)

Muestra	Fecha (1990)	Especie de <i>Salmonella</i>	Cepas		Grupos		
			L	R	A a I	A a E	D
18	2-VII	-					
19	4-VII	<i>S. enteritidis</i>	2		2	1	-
20	9-VII	<i>S. enteritidis</i>	2		2	2	-
21	11-VII	<i>S. enteritidis</i>	2		2	2	-
22	16-VII	<i>S. enteritidis</i>	3		3	3	-
23	18-VII	-					
24	25-VII	-					
25	30-VII	-					
26	20-VIII	<i>S. enteritidis</i>	4		4	3	-
27	22-VIII	-					
28	27-VIII	-					
29	29-VIII	<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
30	3-IX	-					
31	5-XI	<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
32	12-XI	<i>S. enteritidis</i> *	1		1	1	-
33	14-XI	<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
Total		29	27	2	27	25	-

*Salmonella* sp: Identificada por pruebas bioquímicas.

Cepas L y R: Cepas de superficie lisa y rugosa, respectivamente.

Grupos A a I: *Salmonella* del grupo A a I.

Grupos A a E: *Salmonella* del grupo A a E.

Grupo D: *Salmonella* grupo D y posible *S. typhi*.

\*: posible *Salmonella cholerae-suis*

Tabla 7.3: *Salmonella* en Efluente de Digestor Anaerobio:

Muestra	Fecha (1990)	Especie de <i>Salmonella</i>	Cepas		Grupos		
			L	R	A a I	A a E	D
1	5-XI	<i>S. typhi</i>	1		1	1	1
2	12-XI	<i>S. enteritidis</i>	1		1	1	-
3	14-XI	<i>S. enteritidis</i>	4		4	4	-
4	21-XI	<i>S. enteritidis</i>	6		6	6	-
5	26-XI	-	-	-	-	-	-
Total		12	12	-	12	12	1

*Salmonella* sp: Identificada por pruebas bioquímicas.  
 Cepas L y R: Cepas de superficie lisa y rugosa, respectivamente.  
 Grupos A a I: *Salmonella* del grupo A a I.  
 Grupos A a E: *Salmonella* del grupo A a E.  
 Grupo D: *Salmonella* grupo D y posible *S. typhi*.

Tabla 7.4: Eficiencia de los medios de Enriquecimiento-Selectivos para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Tipo de Muestra:	Caldo Selenito		Caldo tetratonato	
	Agar SS # cepas	Agar SB # cepas	Agar SS # cepas	Agar SB # cepas
Lodo Primario	23	51	11	10
Lodo Secundario	8	17	3	1
Efluente	1	7	1	3

**Tabla 7.5: Especies Bacterianas Aisladas a Partir de Lodos Primarios, Secundarios y Efluente Diferentes de *Salmonella* spp.**

Espece	Lodo Primario	Lodo Secundario	Efluente
<i>Citrobacter spp</i>	+	+	+
<i>Edwardsiella spp</i>	+	+	+
<i>Enterobacter spp</i>	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
<i>Klebsiella spp</i>	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+
<i>Proteus morganni</i>	+	+	+
<i>Proteus reffgeri</i>	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+
<i>Providencia spp</i>	+	+	-
<i>Pseudomonas spp</i>	+	+	+
<i>Shigella spp</i>	+	+	+

#### 7.4 Ensayo de Sobrevivencia de *Salmonella typhi* en Lodos Primarios

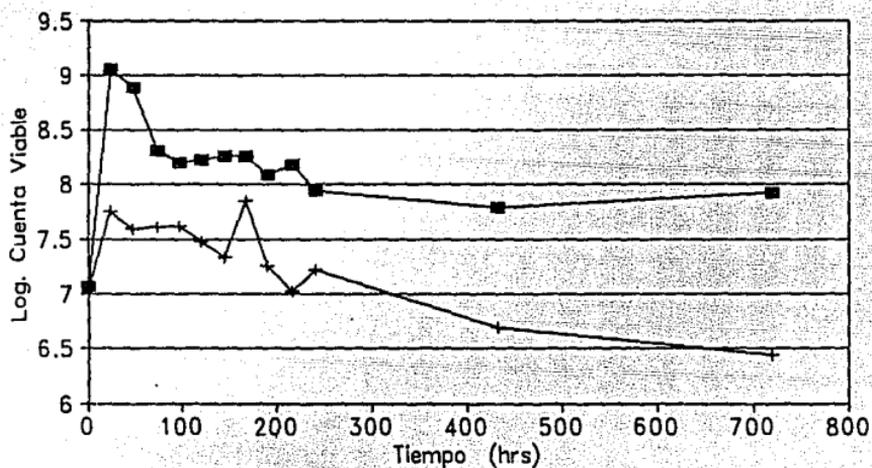
Los resultados obtenidos en este ensayo se resumen en la siguiente tabla:

Tiempo (hrs)	CONTROL (CALDO NUTRITIVO)		LODO PRIMARIO	
	Promedio Cta Viable (UFC/ml)	Log Cta. V.	Promedio Cta Viable (UFC/ml)	Log Cta V.
0	$1.19 \times 10^7$	7.07	$1.13 \times 10^7$	7.053
24	$1.16 \times 10^9$	9.06	$5.65 \times 10^7$	7.752
48	$7.85 \times 10^8$	8.89	$3.90 \times 10^7$	7.59
73	$2.04 \times 10^8$	8.31	$4.10 \times 10^7$	7.61
97	$1.60 \times 10^8$	8.204	$4.20 \times 10^7$	7.62
120	$1.70 \times 10^8$	8.23	$3.02 \times 10^7$	7.48
144	$1.85 \times 10^8$	8.26	$2.15 \times 10^7$	7.33
166	$1.95 \times 10^8$	8.26	$7.10 \times 10^7$	7.85
190	$1.24 \times 10^8$	8.09	$1.85 \times 10^7$	7.26
216	$1.52 \times 10^8$	8.18	$1.06 \times 10^7$	7.025
240	$8.80 \times 10^7$	7.94	$1.68 \times 10^7$	7.22
432	$6.30 \times 10^7$	7.79	$4.90 \times 10^6$	6.69
720	$8.70 \times 10^7$	7.93	$2.80 \times 10^6$	6.44

Después de los 60 días de iniciado el ensayo de sobrevivencia, encontramos microorganismos viables y con superficie lisa intacta, ya que pudimos identificar a *S. typhi* bioquímica y serológicamente.

En la siguiente página se muestran estos resultados en forma gráfica.

## Sobrevivencia de Salmonella en Lodos Primarios



■ Control      + Lodos Primarios

## B. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

### B.1 *Salmonella* en Lodos Primarios:

La frecuencia de *Salmonella spp* en los lodos primarios analizados fue alta (70% del total de días de muestreo), lo cual se debe a que en estos lodos se concentran un alto porcentaje de las bacterias y otros microorganismos provenientes del agua residual; al sedimentar la materia orgánica en el tratamiento primario, adsorbe gran parte de los microorganismos presentes en las aguas por lo que se depositan junto con los sólidos en el fondo del tanque. Es de esperarse que las muestras que resultaron negativas contengan una pequeña cantidad de salmonelas que no se pudieron aislar por estar por debajo de la sensibilidad de el método utilizado.

Se reporta que el porcentaje de remoción de *Salmonella* en el tratamiento primario puede ser superior al 90% de su población total<sup>91</sup>; si bien, la acumulación de lodos en el fondo del tanque de sedimentación primaria puede producir condiciones anaerobias, las especies de *Salmonella* pueden mantenerse viables debido a que son facultativas. Es por esta razón que la sedimentación primaria se considera como un proceso de desplazamiento de la contaminación y no un tratamiento efectivo de remoción. En los lodos sedimentados existen microorganismos saprófitos y depredadores que afectan el libre desarrollo o sobrevivencia de especies patógenas, pero la acción de dichas poblaciones no es suficientemente severa

como para eliminar completamente a los patógenos. Debido a lo antes expuesto, el descargar lodos crudos (sin tratamiento) al drenaje, puede ocasionar problemas en renglón de salud pública.

La especie de *Salmonella* más frecuente en los lodos primarios fué *S. enteritidis*, lo cual resulta lógico si consideramos que esta especie encierra a casi 2000 serotipos diferentes (antes considerados como especies) <sup>10,11,14,20</sup> y que las gastroenteritis causadas por esta especie son más frecuentes que las fiebres entéricas en nuestro país. Aunado a lo anterior debemos considerar que muchas de las cepas encontradas pueden provenir de animales domésticos e incluso animales del zoológico de Chapultepec (tercera sección).

Las cepas aisladas de *S. typhi* fueron escasas muy seguramente porque la población humana que genera las aguas residuales que trata la planta de Chapultepec presenta una frecuencia muy baja de enfermos de fiebre tifoidea y/o portadores de dicha especie. Es de esperarse que en el caso de que se presentase un brote de fiebre tifoidea en la zona vecina a la planta, la frecuencia de *S. typhi* en los lodos primarios aumente. De las cepas de *S. typhi* aisladas en estos lodos, dos son rugosas lo cual se piensa que se deba a que los medios ambientes que se encuentran desde su fuente de origen hasta los lodos sean lo suficientemente agresivos como para deteriorar o eliminar al antígeno de superficie. Sin embargo la frecuencia de salmonelas rugosas en lodos primarios es muy baja, lo cual es preocupante ya que debemos recordar que la virulencia de las salmonelas se asocia en parte con el antígeno O de

superficie.

Las cepas aisladas que se consideran como probable *S. cholerae-suis* no pudieron ser diferenciadas adecuadamente debido a que no se contaba con las pruebas bioquímicas confirmatorias (fermentación de trehalosa y/o arabinosa) ni con sueros monovalentes al grupo C; el único criterio utilizado para diferenciar *S. cholerae-suis* de *S. enteritidis* fue la producción de ácido sulfhídrico, debido a que resultaba más probable que *S. cholerae-suis* no produzca dicho ácido (60% da reacción positiva) que *S. enteritidis* (98% de las cepas da reacción positiva). El resto de las pruebas bioquímicas utilizadas en este estudio son de resultados similares entre ambas especies. Además debemos considerar que es poco probable que se hayan aislado una cantidad mayor de cepas de *S. cholerae-suis* en este trabajo, ya que la marcha utilizada para el aislamiento de *Salmonella spp* no favorece el aislamiento de dicha especie debido a que los caldos de enriquecimiento empleados son tóxicos a *S. cholerae-suis*.

La razón de utilizar los caldos de enriquecimiento en este tipo de muestras, es porque consideramos que la población de *Salmonella spp* con respecto a los demás géneros bacterianos presentes en el lodo es muy pobre, además de que las salmonelas se encuentran en un medio agresivo o por lo menos no es un medio óptimo para desarrollarse y por lo tanto resulta difícil aislarlas en los medios selectivos sin previo enriquecimiento.

La combinación de caldos de enriquecimiento-medio selectivo

más eficiente fué caldo selenito con agar sulfito bisnuto. El caldo selenito es muy recomendado en la literatura clínica, en cambio la literatura del área de ingeniería ambiental recomiendan ampliamente el uso del caldo tetratrationato. Sin embargo, la eficiencia de aislamiento dependerá no sólo del caldo de enriquecimiento empleado, sino que también dependerá del(os) medio(s) selectivo(s) utilizado(s) y de la experiencia de la persona que este trabajando en el aislamiento. Cabe señalar que el caldo tetratrationato utilizado no estaba enriquecido con verde brillante ni con L-cistina, por lo cual su sensibilidad era limitada.

La presencia de otro tipo de enterobacterias en los lodos primarios solo confirma que la contaminación fecal de este tipo de muestras es importante y que si bien las especies patógenas tal vez no ocasionen problemas de infección, pueden presentarse infecciones por agentes oportunistas en algún huésped susceptible, ya que las poblaciones de los grupos coliformes generalmente son muy superiores a las especies patógenas presentes en los lodos. Cabe señalar que las especies del género *Shigella* es poco frecuente en los lodos primarios, debido a que son bacterias poco resistentes a los medios adversos, como es el caso de estos lodos.

#### B.2 *Salmonella* en Lodos Secundarios:

En los lodos secundarios la frecuencia de *Salmonella spp* fue menor con respecto a los lodos primarios (45% de los días de muestreo fueron positivos), lo cual aparentemente es resultado de

que al efluente que proviene del sedimentador primario se le de un tratamiento adicional (secundario). Con el fin de comprobar si la diferencia porcentual de *Salmonella spp* en lodos primarios y secundarios es estadísticamente significativa y es el resultado de los tratamientos primario y secundario, procedemos a realizar un análisis de comparación de poblaciones, a través de los datos provenientes de las muestras analizadas, efectuando pruebas de dispersión y de tendencia central al 95% de probabilidad de confianza.

De acuerdo con los resultados provenientes del análisis estadístico, se cumple el supuesto de que las varianzas de las poblaciones a las que corresponden tales muestras son equivalentes; en cuanto a su tendencia central los datos presentados varían, es decir, las diferencias porcentuales que se observaron tanto en lodos primarios como secundarios parece ser el resultado de los tratamientos (primario y secundario), sin embargo, se recomienda llevar a cabo un mayor número de muestreos que permitan confirmar los resultados obtenidos. El tratamiento estadístico empleado se muestra con detalle en el anexo IV.

La razón de que existan cambios poblacionales entre lodos primarios y secundarios estriba en la gran competencia y depredación a la cual se enfrentan las salmonelas y otros patógenos en el tratamiento secundario, lo que es favorecido con el aumento en los tiempos de retención. Sin embargo, la población patógena no es eliminada completamente, por lo que la población sobreviviente al tratamiento es vertida al drenaje cuando se

eliminan los lodos en exceso.

Se observa una relación en la frecuencia de *Salmonella* entre las muestras de lodos primarios y secundarios, presentando sólo muestras positivas de lodos secundarios cuando la muestra primaria es positiva. Sin embargo se dió el caso de que se presentaron muestras positivas de secundario y negativas del primario en el mismo día de muestreo, lo cual puede deberse a que la *Salmonella* aislada en el lodo secundario sea parte de la población que ha sido reciclada y no eliminada en el tratamiento secundario.

En los lodos secundarios fueron aisladas sólo cepas de *S. enteritidis* y posibles *S. cholerae-suis*. Sin embargo no se aislaron cepas de *S. typhi*, por lo que muy probablemente esta especie se vea más afectada por los tratamientos convencionales que las otras especies, ya que su población y frecuencia en las aguas residuales y lodos de desecho es menor.

A pesar de que este tipo de muestra es diferente al lodo primario, la combinación más eficiente de aislamiento de cepas de *Salmonella spp.* fué caldo selenito-agar sulfito bismuto.

Las especies bacterianas aisladas e identificadas no pertenecientes al género *Salmonella*, corresponden a las mismas identificadas en los lodos primarios, por lo que no son eliminadas por completo en el tratamiento secundario.

### B.3 *Salmonella* en el Efluente de un Digestor Anaerobio Convencional

El efluente analizado procedía de un digestor anaerobio experimental que opera con un tiempo de retención de 28 días y a temperatura ambiente.

El análisis se realizó sólo a 5 muestras (por duplicado), por lo que no podemos realizar comparaciones objetivas con los resultados obtenidos en lodos primarios y secundarios, ya que 5 muestras no son suficientes para establecer dichas comparaciones; sin embargo se observa que en el efluente estudiado persisten el mismo tipo de especies de *Salmonella* que fueron aisladas del lodo primario (recordar que este digestor se alimenta con lodos primarios), las cuales se aislaron con relativa facilidad, por lo que se piensa que la digestión anaerobia afecta en forma parcial a las poblaciones presentes en el influente, disminuyéndolas más no eliminándolas. Observamos además que encontramos en el efluente prácticamente las mismas especies que fueron aisladas a partir de los lodos primarios y secundarios. Al lograr aislar cepas de *S. typhi* en este material se presume que la eliminación de las poblaciones patógenas en la digestión anaerobia es sólo parcial.

Si se establece la digestión anaerobia como tratamiento previo a la disposición de los lodos, debemos evaluar la eficiencia de remoción mediante el control de diferentes parámetros de operación, ya que es favorecida tal remoción al aumentar los tiempos de retención y la temperatura de operación

(digestión anaerobia termofílica).

#### B.4 Ensayo de Supervivencia de *S. typhi* en Lodos Primarios.

Durante este ensayo observamos que *S. typhi* es capaz de subsistir en los lodos primarios crudos por un largo tiempo, conservando su población en el mismo orden de magnitud del que fue su inóculo inicial, por un periodo de 10 días, con un pequeño aumento en su población después de las 24 horas de haber iniciado la prueba. La disminución de su población ocurrió después de los 15 días, pero persistieron algunas bacterias hasta los 60 días. Si bien el aumento de su población es muy inferior al observado en el medio control, la población patógena persiste por un largo periodo, lo que nos indica que este tipo de microorganismo se adapta en cierta medida a los nutrientes presentes en la muestra, permaneciendo viable y conservando sus características bioquímicas y serológicas.

Este ensayo se realizó con lodo primario esterilizado y a una temperatura de 35°C, por lo que las bacterias inoculadas no tuvieron competencia por los nutrientes ni fueron depredadas y contaban con una temperatura óptima de desarrollo. En condiciones reales las bacterias patógenas no se encuentran tan favorecidas ya que los factores mencionados anteriormente y otros (luz solar, presencia de tóxicos, etc.) afectan a su población, disminuyendo esta antes de llegar hasta un huésped sano. Sin embargo, debido a que *S. typhi* pudo adaptarse a este medio y permanecer viable, es probable que si se descargan lodos con una población alta de este

u otros patógenos puedan producir infección por vía directa o indirecta a un huésped susceptible ya sea animal o humano.

## 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

-Se confirma experimentalmente que en los lodos originados por el tratamiento convencional de aguas residuales de tipo doméstico se concentran contaminantes de tipo biológico que pueden acarrear problemas de contaminación ambiental y de salud pública.

-Los lodos primarios presentan una alta frecuencia del género bacteriano *Salmonella*, siendo más frecuente la especie *Salmonella enteritidis* y las menos frecuentes *S. typhi* y *S. cholerae-suis*, lo cual puede modificarse de acuerdo a la frecuencia de estas enfermedades en la población que dá origen a estos materiales.

-Se encontró que la frecuencia de *Salmonella* en lodos secundarios fue menor que en los lodos primarios, lo cual se debe a la eficiencia en la sedimentación primaria y al tratamiento secundario que se le da al efluente del sedimentador primario. La eficiencia de remoción se hace más patente con la especie *S. typhi*; *S. enteritidis* es la salmonela más frecuentemente aislada en lodos secundarios.

-La remoción total de *Salmonella spp* presente en lodos, por digestión anaerobia, no se logra en el digestor experimental analizado.

-*Salmonella typhi* es capaz de sobrevivir en un lodo primario estéril por más de 60 días, por lo que su probabilidad de sobrevivencia en condiciones reales dependerá de su número inicial

y su resistencia a factores ambientales externos.

-Aislar especies de *Salmonella* de lodos primarios y secundarios, así como su capacidad para subsistir en lodos primarios por largos periodos de tiempo, constituye un riesgo potencial para la salud pública si estos materiales no son tratados en forma adecuada.

-Se recomienda realizar un estudio epidemiológico que relacione la frecuencia y tipo de *Salmonella* en lodos crudos con la salmonelosis en la población expuesta en forma directa e indirecta con dichos lodos.

-Desarrollar un estudio cuantitativo o semicuantitativo de *Salmonella spp* en lodos crudos, así como también en efluentes de digestores anaerobios de lodos con el fin de evaluar en forma precisa la remoción de estos patógenos por acción del tratamiento anaerobio.

- Realizar un conteo de *Salmonella spp* en puntos claves de la planta de tratamiento de aguas residuales de Chapultepec con el fin de evaluar en forma precisa los porcentajes de remoción de dicho patógeno en cada una de las etapas de tratamiento de las aguas de desecho.

-Establecer programas de tratamiento de lodos de desecho con el fin de minimizar los riesgos a la salud pública y la contaminación que generan aquellos.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- 1) American Public Health Association, AWWA, WPCF  
"Standard Methods For The Examination Of Water And  
Wastewater"  
Décimo Quinta Edición 1980  
A. P. H. A.
  
- 2) Blair J.E.; Lennette, E.H.; Truant, J.P.  
"Manual Of Clinical Microbiology"  
Tercera Reimpresión  
Baltimore 1970  
American Society For Microbiology
  
- 3) Britton, B.L.; Damron; Edds, G.T.  
"Sludge-Health Risk Of Land Application"  
Primera Edición  
EUA 1980  
Edit. Ann Arbor Science
  
- 4) Bruce, A.M.  
"Sewage Sludge Stabilization And Disinfection"  
1984  
Edit. Ellis Horwood Limited

- 5) C. E. P. I. S.  
"Manual De Técnicas De Laboratorio"  
Lima, Peru  
C. E. P. I. S.
- 6) Cooke, M.B.; Thackston, E.L.; Malaney, G.W.  
"Reducing Coliform And Salmonella Bacterias During Anaerobic  
Digestion"  
Water & Sewage Works  
Enero 1978
- 7) Cowan, S.T.; Steel, K.J.  
"Manual Para La Identificación De Bacterias De Importancia  
Clínica"  
Segunda Edición, Segunda Reimpresión  
Mexico 1982  
Edit. CECSA
- 8) Departamento De Sanidad del Estado de Nueva York  
"Manual De Tratamiento De Aguas Negras"  
Primera Edición, Novena Reimpresión  
Mexico 1989  
Edit. LIMUSA

- 9) Dirección General De Epidemiología: DGE/SSA  
Informe Semanal De Casos Nuevos De Enfermedades, EPI-1-85,  
EPI-1-70, EPI-1-85  
México 1990  
Secretaría De Salubridad Y Asistencia
- 10) Dudley, D.J.; Guentzel, M.N.; Ibarra, H.J. et al  
"Enumeration Of Potentially Pathogenic Bacteria From Sewage  
Sludges"  
Applied & Environmental Microbiology  
Enero 1980, Vol. 39, No. 1
- 11) Edmonds P.  
"Microbiology, An Environmental Perspective"  
Primera Edición  
EUA 1978  
Edit. Macmillan Publishing Co. Inc.
- 12) Edwards, P.R.; Edwing, W.H.  
"Identification Of Enterobacteriaceae"  
Tercera Edición  
EUA 1972  
Edit. Burgess Publishing Co.
- 13) Feachem, R.G.; Garelik, H; Bradley, D.J. et al  
"Sanitation And Disease. Health Aspects Of Excreta And  
Wastewater Management"  
New York 1983 Edit. World Bank

14) Freeman, B.A.; Ph. D.

"Microbiología De Burrows"

Vigésima Segunda Edición

1986

Edit. Interamericana

15) Comisión Nacional Del Agua

Inventario Nacional De Plantas De Tratamientos De Aguas  
Residuales, 1990

México 1991

Gerencia De Tratamiento De Aguas

16) Guerrero, V.G.; Moreno, F.A.; Garduño, V.H.

"El Sistema Hidráulico Del Distrito Federal. Un Servicio  
Público En Transición"

Primera Edición

México D.F. 1982

Secretaría De Obras Y Servicios, DGL0H

17) Keime, M.P.

"Los Lodos, Un Subproducto Util En La Agricultura?"

III Congreso Nacional De Ingeniería Sanitaria Y Ambiental

Acapulco 1982

18) Kowal, N. E.

"Health Effects Of Land Treatment Microbiological"

EPA 600/1-82-007

Mayo 1982

19) Langeland, G.

"Salmonella spp. In The Working Environment Of Sewage  
Treatment Plants In Oslo, Norway"  
Applied & Environmental Microbiology"  
Mayo 1982, Vol. 43, No. 5

20) Lennette, E.H.

"Microbiología Clínica"  
Tercera Edición  
México 1982  
Editorial Médica Panamericana

21) Mac Faddin, J.F.

"Pruebas Bioquímicas Para La Identificación De Bacterias De  
Importancia Clínica"  
México 1984  
Editorial Médica Panamericana

22) Moeller, Ch.G.; Soler, A.F. et al

Proyecto De Tratabilidad Biológica Anaerobia De Lodos  
Primarios Y Secundarios En El D.F. Primera Etapa  
México 1990  
UNAM, FI, DGAPA-IMTA

23) Noyola, R.A.

"Tratamiento Anaerobio De Aguas Residuales: Una Experiencia  
De Adaptación De Tecnología En México"

Taller De Tratamiento Anaerobio De Aguas Residuales En América  
Latina

Instituto De Ingeniería, UNAM

México 1990

24) Organización Mundial De La Salud

"Directrices Sanitarias Sobre El Uso De Aguas Residuales En  
Agricultura Y Acuicultura"

Serie de Informes Técnicos 77B

Ginebra 1990

25) Organización Panamericana De La Salud; Oficina Sanitaria  
Panamericana

"Riesgos Del Ambiente Humano Para La Salud"

OMS 1976

26) Peniche, A.J.

"Estudio Comparativo De Tres Técnicas De Aislamiento De  
Salmonella spp, Realizadas En Muestras De Desechos Sólidos"

VII Congreso Nacional De Ingeniería Ambiental

Oaxaca, México 1990

27) Secretaría De Desarrollo Urbano Y Ecología

Primer Seminario De Contaminación Del Agua

Tlaxcala, México 1988

- 28) Secretaria De Recursos Hidraulicos. Comision Hidrologica De  
La Cuenca Del Valle De México  
"Uso Agricola De Las Aguas Negras"  
México D.F. 1970  
Secretaria De Recursos Hidraulicos
- 29) Vesilind, P.A.; Hagtman, G.C.; Skene, E.I.  
"Sludge Management And Disposal For The Practicing Engineer"  
Primera Edición  
EUA 1988  
Edit. Lewis Publishers, Inc.
- 30) Vesilind, P.A.  
"Treatment And Disposal Of Wastewater Sludges"  
Segunda Edición  
EUA 1980  
Edit. Ann Arbor Science
- 31) Yaziz, M.I.; Lloyd, B.J.  
"The Removal Of Salmonellas In Conventional Sewage Treatment  
Processes"  
Journal Of Applied Bacteriology, 1976, No. 46.
- 32) Zinsser, H.  
"Zinsser Microbiologia"  
Décimo Octava Edición  
Buenos Aires 1986  
Edit. Médica Panamericana



## Anexo I

### Género *Salmonella*

El género *Salmonella* está compuesto por un grupo de bacterias serológicamente y bioquímicamente complejo. Todos los miembros del género son potencialmente patógenos para el hombre, además de infectar a múltiples mamíferos, aves, reptiles y otros animales, debido a que son parásitos obligados. Las especies *S. typhi*, *S. enteritidis* serotipo *paratyphi* A, se encuentran sólo en el hombre, *S. paratyphi* B, C y *S. sendai*, tiene como reservorio primario al hombre. El resto de las salmonelas tienen como reservorio primario a los animales constituyendo un riesgo de infección al hombre, debido a que muchos de los animales infectados son utilizados para la alimentación o como mascotas. Algunos insectos como las moscas y las cucarachas constituyen un vector potencial de salmonelas.

Estas bacterias están asociadas con trastornos gastrointestinales y fiebres entéricas presentes en todo el mundo. La fiebre entérica más conocida a nivel histórico e internacional es la fiebre tifoidea. En 1856 William Budd sugirió que esta enfermedad era transmitida a través de aguas residuales y que la fuente de infección eran heces humanas. En 1880 Eberth encontró el agente etiológico (*S. typhi*) en bazos y nodulos mesentéricos de pacientes muertos por tifoidea. En 1884 Caffrey lo cultivó. En 1896 se aisló un microorganismo similar a *S. typhi*, que también producía fiebre entérica, pero no tan severas (bacilo paratífico). Se desarrollaron y establecieron múltiples métodos de

aislamiento y criterios bioquímicos para su diferenciación. Con el impulso de técnicas de análisis antigénico, su clasificación se enriqueció enormemente al grado que, en la actualidad se describen alrededor de 2000 serotipos diferentes de *Salmonella*. Debido a esto el esquema antigénico de Kauffman y White da categoría de especie a cada tipo antigénico, las cuales se enlistan en el Bergey's Manual, octava edición, subdivididos en 4 subgéneros. Sin embargo su manejo es poco práctico debido a que no todos los laboratorios microbiológicos poseen los recursos para manejar dicho esquema. Ewing y Edwards (1972) han propuesto la existencia de sólo 3 especies de *Salmonella*: *S. typhi* (un serotipo), *S. cholerae-suis* (un serotipo) y *S. enteritidis* (el resto de los serotipos). El sistema resulta ser más práctico ya que las 3 especies se pueden diferenciar en base a pruebas bioquímicas. En la tabla I.2 se enlistan dichas pruebas.

Las características microscópicas de las salmonelas son muy similares al resto de las enterobacterias. Todas son móviles a excepción de *S. enteritidis* serotipos *galinarum* y *pollorum*. La mayoría poseen fimbrias adhesivas (manosa-sensible por lo general). Pueden presentarse bacterias de superficie lisa o rugosa. Algunas poseen al antígeno Vi (Ag Vi) en la superficie a manera de cápsula, lo cual no es posible observarlo al microscopio.

Son anaerobias facultativas. Su requerimiento nutricional no es complejo, por lo que crecen con facilidad en los medios de cultivo habituales. Pueden utilizar sales de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa, piruvato o lactato como fuente de carbono

pero no fermentan a la lactosa. Producen ácido sulfhídrico a partir de tiosulfato y gas de la fermentación de glucosa. Sin embargo, *S. typhi* produce poca cantidad de ácido sulfhídrico y no produce gas. La gran mayoría es prototrofa a vitaminas y aminoácidos y sólo algunas cepas de *S. typhi* son auxótrofas a triptofano. Su temperatura óptima es de 37°C, aunque desarrolla adecuadamente a temperatura ambiente. Las características bioquímicas del género se han resumido en la tabla I.1.

Una identificación adecuada requiere del uso de los mejores procedimientos posibles de aislamiento, métodos bioquímicos diferenciales, además de procedimientos serológicos, hasta donde los recursos del laboratorio lo permitan.

Su estructura antigénica es similar a la de otras enterobacterias. Los antígenos O y H son los más utilizados en la tipificación:

El antígeno somático O es muy variable entre las salmonelas; se denominan con números arábigos; una cepa puede contener uno o más antígenos O y tienden a aparecer combinaciones periódicas formando numerosos grupos en base a los antígenos O comunes (denominados con letra mayúsculas y van de A a I) y subdividiendo en especies o serotipos por la determinación de los restantes antígenos O y H.

Los antígenos H o flagelares pueden presentarse en 2 formas: antígenos de fase 1 y de fase 2. Los antígenos de fase 1, llamados

Tabla 1.1: Características Bioquímicas para la diferenciación de Algunas Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*.

ESPECIE	Glu	Lac	Sac	Cit	Malo	LD	OD	S	I	M	Gas	Urea
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>S. cholerae-suis</i>	+	-	-	(+)	-	+	+	d	-	+	+	-
<i>S. enteritidis</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>S. paratyphi A</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Arizona hinshawii</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	(+)	d	+	d	-	d	d	-	+	+	d
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>Ent. aerogenes</i>	+	+	+	(+)	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>Enterobacter hafnie*</i>	+	(+)	d	(+)	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>Ent. liquefaciens*</i>	+	d	+	+	-	+	+	-	-	+	+	d
<i>Escherichia coli</i>	+	+	d	-	-	d	d	-	+	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	d	(+)	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>Proteus morganii</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	d	+
<i>Proteus rettgeri</i>	+	-	d	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	+	d	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Providencia spp</i>	+	-	d	+	-	-	-	-	+	+	d	-
<i>Serratia marsencens</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	d
<i>Shigella spp</i>	+	d	d	-	-	-	d	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+

+: DON DE LAS CEPAS O MAS POSITIVAS EN 1 O 2 DIAS

-: DON O MAS NEGATIVAS EN 1 O 2 DIAS

d: DIFERENTES TIPOS BIOQUIMICOS

(+): POSITIVAS DESPUES DE 3 DIAS DE INCUBACION

\*: SOLO A 37°C

FUENTE: EDWARDS, EDWING: "IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE"

Tabla 1.2: Diferenciación Bioquímica de las Especies de *Salmonella*

Especie	Treh	Arab	Cit	Gas	OD
<i>S. cholerae-suis</i>	-	-	(+)	+	+
<i>S. enteritidis</i>	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	-	-

FUENTE: EDWARDS, EDVINO: "IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE"

Abreviaturas Utilizadas:

Gluc:	Fermentación de Glucosa
Lact:	Fermentación de Lactosa
Sac:	Fermentación de Sacarosa
Citr:	Utilización de Citrato
Mal:	Utilización de Malonato
LD:	Descarboxilación de Lisina
OD:	Descarboxilación de Ornitina
S:	Producción de Ac. Sulfhídrico
I:	Producción de Indol
M:	Movilidad
Gas:	Producción de Gas en TSI
Urea:	Desdoblamiento de Urea
Treh:	Fermentación de Trehalosa
Arab:	Fermentación de Arabinosa.

también específicos, son compartidos por sólo unos cuantos microorganismos y reaccionan con sueros homólogos (se denominan con letras minúsculas), en cambio, los de fase 2 son comunes en muchos microorganismos y pueden presentar reacciones cruzadas con antisueros heterólogos (se denominan con números arábigos). Un microorganismo perteneciente a una colonia puede estar en una fase, pero el resto de la población puede encontrarse en la misma o en la otra fase.

Los antígenos capsulares tienen un papel poco importante en la clasificación serológica dentro de las salmonelas, pero un papel importante en la patogenicidad del microorganismo que lo posee. Se presenta sólo en las cepas de *S. typhi* y en algunas de *S. enteritidis* y se le denomina como antígeno Vi o de virulencia. Este Ag bloquea la aglutinación en placa con anticuerpos O específicos y pueden disminuir progresivamente en cultivos continuos de laboratorio.

Para la tipificación total o parcial de serotipos se necesitan sueros polivalentes y monovalentes. La profundidad será de acuerdo al presupuesto y los fines que se persigan. De acuerdo al sistema de Kauffman y White, cada serotipo tiene una fórmula antigénica definida que incluye los principales antígenos particulares (O, H<sub>i</sub>, H<sub>z</sub> y Vi). Sin embargo, al utilizar la clasificación por grupos de antígenos O como confirmación serológica primaria, podemos realizar una tipificación adecuada utilizando pocos sueros polivalentes y monovalentes, si consideramos que del 95% al 98% de los serotipos aislados del

hombre y de los animales pertenecen a los grupos serológicos A a E de *Salmonella*, dando prioridad al serotipo D que corresponde a *S. typhi*, debido a su importancia clínica.

En cuanto a la producción de toxinas, todas las especies de *Salmonella* producen una endotoxina que corresponde al lipopolisacárido de membrana externa, presente en cepas lisas. Algunas cepas producen una enterotoxina cuya actividad es similar a la que produce *E. coli* y *V. cholerae*.

Los antígenos de superficie junto con las diferentes toxinas y su capacidad de invasividad constituyen los elementos básicos de patogenicidad:

-Las cepas lisas son virulentas, en comparación con las rugosas que son avirulentas. El antígeno Vi incrementa la virulencia de las cepas y puede proteger al antígeno O del ataque de anticuerpos, además previene la fagocitosis. Los dos tipos de antígenos confieren la capacidad de adhesión a las células intestinales del huésped y ayudan a la supervivencia intracelular del microorganismo.

-La actividad enterotóxica reportada sólo en algunas especies de *Salmonella*, parece estar relacionada con la pared celular o membrana externa de la bacteria, ya que sólo induce a la diarrea cuando existe penetración.

-La *Salmonella* virulenta tiene la capacidad de atravesar

el epitelio intestinal y se establece en el o incluso pasa directamente a tejido subepitelial. Posteriormente las bacterias se multiplican y pueden diseminarse hacia otras partes del cuerpo. En la fase tardía de la enfermedad existe destrucción del epitelio.

Las salmonelosis pueden presentarse en cualquiera de sus 3 diferentes entidades clínicas: Gastroenteritis, Septicemia con lesiones focales o Fiebres Entéricas.

#### Gastroenteritis:

Se presenta aproximadamente 18 hrs después de ingerir al microorganismo. Se caracteriza por vómitos agudos, fiebre, diarrea y dolor abdominal. Se adquiere por lo general en la ingestión de alimentos contaminados y se le conoce como intoxicación alimentaria por *Salmonella*. Se necesitan aproximadamente  $10^6$  bacterias para causar la enfermedad, dependiendo de la virulencia de la cepa, la susceptibilidad del huésped y la protección que el vehículo proporciona a la acidez gástrica. Las poblaciones más vulnerables son los niños, ancianos y personas con algún estado patológico como anemia, infecciones subyacentes, gastrectomía, etc. El agente etiológico más frecuente es *S. enteritidis* serotipo *typhimurium*. La mayoría de los casos son autolimitantes existiendo poca o nula invasión de tejidos. La sintomatología dura por lo general de 2 a 5 días y en ocasiones el proceso es asintomático. El tratamiento no requiere de antibióticos, ya que estos sólo prolongan el estado de portador y los síntomas de la enfermedad.

Es sólo necesario el restituir el líquido y electrolitos perdidos por la diarrea y se debe evitar además el uso de antidiarreicos porque facilitan la adherencia y por ende la invasión, complicando y alargando la enfermedad.

#### Septicemia:

Es una complicación derivada de una gastroenteritis. La septicemia causada por *Salmonella* es prolongada y se caracteriza por fiebres, escalofríos, anorexia y anemia. Pueden desarrollarse lesiones focales en cualquier tejido produciendo osteomielitis, neumonía, absesos pulmonares, meningitis o endocarditis. La gastroenteritis es leve o inexistente en este cuadro y difícilmente se aísla al microorganismo de heces. Afecta principalmente a niños, ancianos y a personas predispuestas, con una alta probabilidad de muerte. El agente etiológico más frecuente en este padecimiento es *S. cholerae-suis*. Es necesario tratar en forma urgente al paciente con antibióticos como el cloranfenicol, ampicilina o trimetoprim-sulfametoxazol.

#### Fiebres Entéricas

Son enfermedades severas, distribuidas principalmente en países del tercer mundo. La fiebre tifoidea resulta ser la más grave y clásica, en comparación con la fiebre paratifoidea cuya tasa de mortalidad es menor. Para diagnosticar acertadamente las fiebres entéricas, es necesario el aislamiento e identificación del agente etiológico.

## Fiebre tifoidea

Es producida por *S. typhi*; esta bacteria es un parásito humano obligado y se considera que no puede multiplicarse en la naturaleza fuera de su huésped. Es excretado por enfermos o portadores en heces y en ocasiones orina (25% aprox); penetra en un huésped susceptible a través de alimentos, aguas, objetos contaminados o en forma directa (fecal-oral). Se requieren niveles elevados de la bacteria para causar la enfermedad: se requieren niveles de  $10^5$  bacterias para ocasionar la enfermedad en un 25% de las personas expuestas al agente, y se requiere de un nivel de  $10^9$  microorganismos para aumentar la tasa de infección al 95%. Sin embargo, cabe señalar que son excretadas hasta  $10^{10}$  bacterias por gramo de heces en pacientes con la fiebre y en portadores los niveles fluctúan de  $10^4$  a  $10^{11}$  bacterias por gramo de heces.

La fiebre tifoidea comienza con la colonización del tracto intestinal, penetrando el epitelio y multiplicándose en los ganglios mesentéricos. Algunas bacterias son transportadas a través de la linfa torácica hacia el torrente sanguíneo y de ahí se diseminan a diversos tejidos, incluyendo zonas del tejido reticuloendotelial donde son fagocitados pero no destruidos por los monocitos. En estos tejidos se multiplican y permanecen en espera. En esta etapa los síntomas son fiebre, letargo, malestar y dolores generalizados. Posteriormente las bacterias regresan al torrente sanguíneo en mayor número, provocando una bacteremia prolongada sumamente severa, caracterizada por la elevación de la temperatura corporal a  $39^{\circ}\text{C}$ . Durante este periodo es infectado el

sistema biliar, la médula ósea y otros tejidos. Puede presentarse diarrea. Los microorganismos reinfectan el tracto intestinal desde la vesícula biliar y pueden causar necrosis en las placas de Peyer. *S. typhi* es secretada en esta etapa por las heces y en ocasiones por la orina. La convalecencia aparece en la tercera semana, siempre y cuando no existan recaídas o complicaciones. Entre las complicaciones se pueden incluir la perforación intestinal, hemorragia, tromboflebitis, colecistitis, neumonía y formación de abscesos.

El estadio de portador fecal es consecuencia de una infección persistente de la vesícula biliar. En caso de que ocurra una infección persistente en vejiga, da lugar a portadores urinarios. El estadio de portador puede ser intermitente y puede prolongarse de meses a años.

Para el tratamiento de enfermos de fiebre tifoidea se utilizan ampicilina, cloranfenicol, amoxicilina (análogo a ampicilina) y trimetoprim-sulfametoxazol. En el caso de portadores crónicos se utiliza sólo ampicilina cuando no existe enfermedad vesicular: si esta existe es necesario extirpar la vesícula y aplicar ampicilina.

La fiebre tifoidea confiere al paciente un estado de inmunidad limitado, que puede suavizar los efectos de una segunda infección. Existe una respuesta humoral a los antígenos de *S. typhi* con producción de anticuerpos (Ac s) de la clase IgM e IgG. En las primeras 4 semanas aparecen los anticuerpos IgM (aglutininas), que en la clínica resultan útiles para el

diagnóstico al utilizar la prueba de Widal. Además existe la producción de Ac's IgA secretoras, que impiden la adhesión bacteriana durante una nueva colonización intestinal. Se presenta también una respuesta inmune celular a nivel sistémico que se le relaciona con una recuperación de la enfermedad sin complicaciones.

Se han desarrollado múltiples vacunas para una inmunización profiláctica: utilizando microorganismos muertos por vía parenteral, y utilizando suspensiones bacterianas inactivas, atenuadas o mutantes por vía oral; la más efectiva resulta ser la utilización de *S. typhi* Ty21a, galactosa epimerasa (mutante) por vía oral. Sin embargo, al igual que la enfermedad, la inmunidad adquirida en forma profiláctica no es permanente.

#### Fiebre Paratifoidea

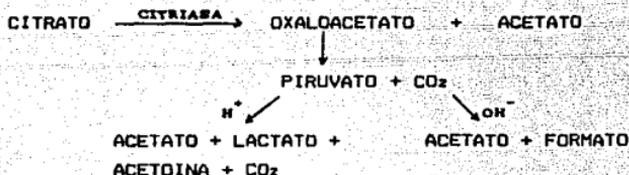
Esta enfermedad es muy similar a la fiebre tifoidea, con la diferencia de que su gravedad es menor y se caracteriza por un comienzo súbito con escalofríos, fiebre, diarrea, náuseas y vómito, se presenta cefalea y rigidez del cuello. Es producida por las salmonelas paratíficas: *S. enteritidis* serotipo paratyphi A, B, y C. El único método que existe para la diferenciación de esta enfermedad con la fiebre tifoidea es el aislamiento del agente causal.

ANEXO II  
Medios de Cultivo

- Agar Citrato de Simmons

Es utilizado para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar al citrato como única fuente de carbono.

El citrato es catabolizado en el ciclo de Krebs o por fermentación de citrato. En bacterias la hidrólisis está dada por la enzima Citriasa (citrato oxaloacetato liasa) o citrato desmolasa. Para esta actividad requiere de un catión bivalente ( $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ):



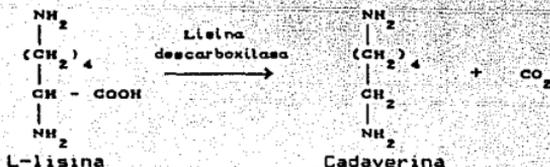
Cuando un organismo es capaz de utilizar al citrato como única fuente de carbono, generalmente utiliza las sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Las sales de amonio que se encuentran en este medio son desdobladas y hay liberación de amoníaco, cambiando el pH del medio a alcalino, lo cual se ve reflejado en el cambio de coloración (de color verde a azul) por la presencia del indicador azul de bromotimol. El crecimiento de microorganismos, así como el cambio en la coloración del medio indican una prueba positiva.

El medio se prepara de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se coloca en tubos de 13x100 con el agar inclinado. Es importante señalar que este debe ser el primer medio inoculado para evitar falsos negativos, por el arrastre de alguna otra fuente de carbono de otro medio previamente inoculado. Se mantiene en incubación 24 hrs a 35°C.

#### Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Es utilizado para observar la capacidad que tiene un microorganismo para descarboxilar a la lisina.

La descarboxilación de la lisina se lleva a cabo por la enzima lisina descarboxilasa, produciendo una diamina (cadaverina) y dióxido de carbono:



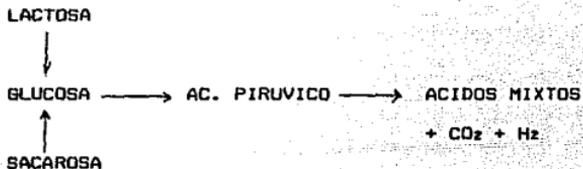
Las descarboxilasas se producen sólo cuando existe en el medio su sustrato específico (inducibles) y se presenta una condición ácida en el medio. La descarboxilación se realiza en condiciones anaerobias, es irreversible y se requiere del fosfato de piridoxal como coenzima. Al descarboxilar a la lisina, el pH del medio vira a alcalino, debido a la producción de aminas, tornando el medio a una coloración púrpura por la presencia del indicador púrpura de bromocresol.

En este medio podemos verificar la producción de ácido sulfhídrico.

El agar LIA se coloca en tubos de 13x100 de tal manera que solidifique en forma inclinada. Se inocula por estria en la superficie de la zona inclinada y picadura. Se incuba de 18 a 24 hrs a 35°C.

- Agar de Hierro y Tres Azúcares (TSI)

Es un medio diferencial muy utilizado para la identificación de enterobacterias. Se usa para determinar si un microorganismo es capaz de fermentar glucosa, lactosa y/o sacarosa con la producción de ácido y/o gas. Además podemos detectar organismos productores de ácido sulfhídrico (con menor sensibilidad que el medio SIM):



La concentración de glucosa es de 0.1% a diferencia de los otros dos azúcares que se encuentran a una concentración del 1%.

Cuando un microorganismo es capaz de utilizar glucosa y alguno de los azúcares restantes, o incluso los tres, el organismo fermenta en primer término a la glucosa y posteriormente utiliza uno o ambos disacáridos, confiriendo al medio un pH ácido, lo cual

se manifiesta por un cambio en la coloración del medio (a amarillo) debido al indicador rojo de fenol.

Si el microorganismo sólo es capaz de fermentar a la glucosa, esta se agota rápidamente en la parte inclinada del tubo, por lo que a las 24 hrs de incubación, esta zona tiene un pH alcalino, ya que las bacterias ocupan las peptonas que contiene el medio como fuente de carbono. El fondo del tubo en este caso permanece ácido, debido a que glucosa aún no se agota después del periodo de incubación o al menos la condición ácida aún perdura.

Existe la posibilidad de que algún microorganismo no pueda fermentar ninguno de los tres azúcares, lo cual se verá reflejado en una condición alcalina en todo el tubo, debido a la utilización de las peptonas como fuente de carbono (coloración roja en todo el tubo o no existe un cambio de color).

Este agar es colocado en tubos de 13x100 de manera que el agar solidifique en forma inclinada. Se inocular por estria en la superficie inclinada y por picadura. Se incuba de 18 a 24 hrs a 35°C. Es importante leer exactamente en este lapso de tiempo para evitar resultados falsos.

#### Agar Salmonella-Shigella (SS):

Es un medio diferencial moderadamente selectivo muy utilizado en la bacteriología sanitaria para aislar especies de *Salmonella* y *Shigella* a partir de diferentes tipos de muestras.

#### Propiedades diferenciales:

Con el agar SS es posible diferenciar microorganismos lactosa positivos y negativos, debido a que es el único carbohidrato presente en el medio; cuando es degradado por una colonia el pH se torna a ácido que se manifiesta por el virre del indicador rojo neutro a rojo-rosado. Cuando las bacterias no pueden utilizar la lactosa, utilizan a las peptonas presentes en el medio, cambia el pH a alcalino y las colonias viran a un color amarillo o incluso se presentan incoloras. Contiene además tiosulfato de sodio y citrato férrico con el fin de diferenciar las colonias productoras de ácido sulfhídrico (ver medio SIM), que producen un precipitado de color negro el cual colorea a la colonia productora.

#### Efecto Selectivo:

Este agar ha sido formulado para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*. Contiene una concentración alta de sales biliares y citrato de sodio, las cuales inhiben a todas las bacterias gram-positivas y muchos microorganismos gram-negativos, incluyendo a los coliformes, presentes en el inóculo.

El agar SS es preparado según las instrucciones del fabricante (no se esteriliza). Es inculado por agotamiento con una o dos asadas del caldo de enriquecimiento utilizado; se incuba de 18 a 24 hrs a 35°C de temperatura.

#### Agar Sulfito Bismuto (SB):

Es un medio altamente selectivo diseñado para el aislamiento

de *S. typhi* y otras salmonellas a partir de diferentes muestras.

#### Efecto selectivo:

El efecto selectivo del agar SB se basa en su contenido de verde brillante, que inhibe la flora gram-positiva, coliformes, *Shigella* y *Proteus*. La inhibición de las bacterias coliformes se ve favorecida por el contenido de bismuto presente en el medio.

#### Propiedades diferenciales:

En el agar SB podemos observar bacterias productoras de ácido sulfhídrico ya que contiene sulfito bismuto y sulfuro ferroso (ver medio SIM), por lo que las colonias productoras de este ácido se tornarán a un color negro por el depósito del precipitado sulfuro ferroso.

En presencia de  $H_2S$ , las salmonellas reducen a los cationes de bismuto en bismuto metálico en los alrededores de la colonia, lo cual da lugar a la aparición de un halo de brillo metálico alrededor de las mismas.

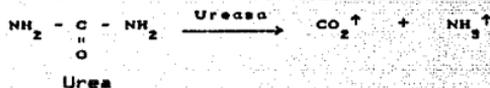
El agar SB se debe preparar de acuerdo a las instrucciones del fabricante el mismo día en que se va a utilizar, con el fin de que no se oxide el medio, ya que debe tener condiciones reductoras para que la inhibición y diferenciación sea efectiva. Al distribuirse en las cajas petri debemos tener cuidado de que en el medio se distribuya homogéneamente el precipitado de sulfito bismuto. Debido a que este medio es altamente selectivo podemos inocularlo directamente y/o utilizando medios de enriquecimiento.

Se inocula por agotamiento y se incuba de 24 a 48 hrs a 37°C de temperatura.

#### Agar Urea:

Es utilizado para determinar si un microorganismo es capaz de sintetizar a la enzima ureasa e hidrolizar a la urea presente en el medio.

La urea contenida en este medio es hidrolizada a dióxido de carbono y amoniaco por la enzima ureasa:



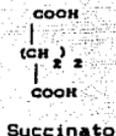
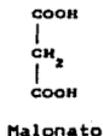
El amoniaco producido en esta reacción confiere un pH alcalino al medio, lo cual se verifica con el cambio de color al rojo púrpura por la presencia del indicador rojo de fenol. Las bacterias ureasa negativos no cambian la coloración del medio.

El agar urea es preparado en 2 fases: primero se prepara el agar base (9 partes), esterilizandolo en autoclave a 121°C, 15 minutos, enfriamos el agar a 45-50°C; la base de urea se prepara de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se esteriliza por filtración en membrana de 0.22 µ. Se añaden 9 partes de agar por 1 parte de la base de urea y se deja solidificar en forma inclinada. Se inocula por estria en la superficie y se incuba de 18 a 24 hrs a 35°C.

### Caldo Malonato:

Es utilizado para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar al malonato de sodio como única fuente de carbono.

El malonato es un inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa, la cual tiene como función el producir ácido fumárico a partir del succinato en el ciclo de Krebs. Esta inhibición se debe a que el ácido málico y succínico son estructuralmente similares:



Esta competencia por el sitio activo de la enzima ocasiona una inhibición en el crecimiento bacteriano, la cual se verá intensificada en función directa a la concentración del malonato, es decir, a mayor concentración de este ácido, mayor será la inhibición. Al haber un bloqueo en el ciclo de Krebs, se acumula el succinato, pero carece de los metabolitos subsiguientes del ciclo, por lo que se auxilia del ciclo del ácido glioxílico para la producción de dichos metabolitos. Sin embargo la acumulación de succinato inhibe el ciclo del ácido glioxílico al actuar sobre la enzima isocitrata.

Por lo tanto, sólo podrán desarrollarse los microorganismos que sean capaces de utilizar o fermentar al malonato. Cuando una

bacteria es capaz de utilizar al malonato como fuente de carbono, utiliza al sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, lo cual libera iones amonio que alcalinizan al medio, tornando a una coloración azul por la presencia del indicador azul de bromotimal.

El caldo malonato se distribuye en tubos de 13x100; se incuban de 18 a 24 hrs a 35°C de temperatura.

#### Caldo Selenito:

El caldo selenito es un medio de enriquecimiento de bacterias del género *Salmonella*. Este medio inhibe el crecimiento de bacterias coliformes y enterococos por la presencia del selenito de sodio, durante 6 a 12 hrs, favoreciendo el desarrollo en este periodo de las salmonelas presentes en la muestra.

La presencia de L-cistina en este caldo aumenta su sensibilidad.

El caldo selenito se prepara el día en que se va a utilizar sin necesidad de esterilizarlo; es colocado en tubos de 16x150 en volúmenes de 10 ml. Se incuba de 12 a 18 hrs a 35°C.

#### Caldo tetracionato:

Es un medio de enriquecimiento para todas las bacterias capaces de reducir al tetracionato (como *Salmonella*),

multiplicándose libremente, mientras la flora restante resulta inhibida por el tetracionato. Además presenta un efecto inhibitorio por su contenido de sales biliares. El efecto inhibitorio es eficaz dentro de las primeras 18 horas de incubación.

El tetracionato de este caldo se prepara in situ al añadir yodo, el cual oxida al tiosulfato presente en el medio. Este caldo contiene además carbonato de calcio, el cual neutraliza los productos de descomposición del tetracionato.

Podemos adicionar a este medio una solución de verde brillante y l-cistina para aumentar la sensibilidad del medio.

Se distribuye en tubos de 16x150 en volúmenes de 10 ml; se prepara el día de su uso añadiendo el yodo después de que se ha enfriado. Se incuba a 35°C durante 18 horas.

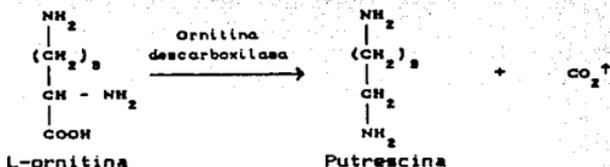
#### Medio Movilidad-Indol-Ornitina (MIO)

Se utiliza para verificar la movilidad de un microorganismo, así como también el observar su capacidad para producir indol y descarboxilar a la ornitina.

Con respecto a la movilidad y la producción de indol se explica más adelante en el medio SIM.

La ornitina es descarboxilada por la enzima ornitina

descarboxilasa produciendo una diamina (putrescina) y bióxido de carbono:



Una prueba positiva esta dado por el cambio del pH en el medio a alcalino, con el consiguiente cambio de coloración del medio al púrpura por la prescencia del púrpura de bromocresol.

Este medio se coloca en tubos de 13x100 o de 12x75; su consistencia es semisólida. Se incuba de 18 a 24 hrs a 35°C. Se deben leer movilidad y la descarboxilación de la ornitina antes de agregar el reactivo de Ehrlich.

#### Medio Sulfhídrico-Indol-Movilidad (SIM)

Es utilizado para verificar si un microorganismo es capaz de producir ácido sulfhídrico e indol, además para observar si el organismo en estudio es móvil.

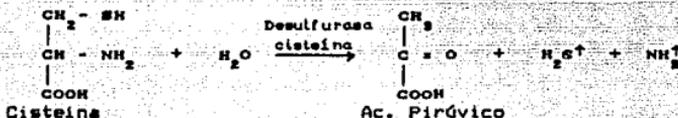
#### Producción de Acido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S):

Los aminoácidos azufrados libres pueden ser utilizados por algunas especies bacterianas heterotróficas como fuente de azufre con la liberación del Acido sulfhídrico (gas); además estos microorganismos pueden utilizar otras fuentes de azufre de las

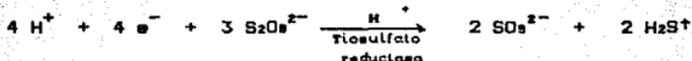
cuales pueden producir dicho ácido. Un ejemplo de estas fuentes son las peptonas y algunos compuestos inorgánicos del azufre: sulfatos, tiosulfatos o sulfitos.

Los mecanismos utilizados por estos microorganismos para la producción del ácido sulfhídrico son:

-Reducción del azufre presente en los aminoácidos metionina, cistina y cisteína en condiciones anaerobias, ejemplo:



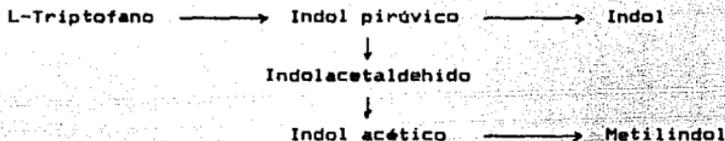
-Respiración anaerobia utilizando a un compuesto de azufre como último aceptor de electrones, ejemplo:



Debido a que el ácido sulfhídrico es incoloro, se revela su presencia reaccionando el sulfuro con la sal de un metal pesado como el hierro, el plomo o el bismuto, formando un precipitado de color negro. Este mecanismo está presente en los medios SIM, agar TSI y LIA, agar Salmonella-Shigella y el agar Sulfito Dismuto entre otros. El medio SIM es más sensible que el agar TSI en cuanto a la producción de este ácido, debido a que la presencia de sacarosa en el TSI, puede inhibir la producción de sulfhídrico.

## Producción de Indol:

El indol es un metabolito derivado del catabolismo del triptofano (aminoácido aromático); el triptofano puede ser oxidado por algunas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: Indol, escatol (metilindol) e indolacético, mediante el complejo enzimático triptofanasa:



El indol producido puede ser detectado al reaccionar con el *p*-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Ehrlich), ya que producen un compuesto quinoidico de color rojo violáceo en medio ácido.

## Movilidad:

Debido a la consistencia semisólida de este medio, podemos observar si una bacteria es móvil o inmóvil, al observar el movimiento de los microorganismos a partir de la línea de siembra. En el caso de que las bacterias sean móviles, el medio adquiere turbidez, a diferencia de las cepas inmóviles que sólo desarrollan en la línea de inoculación.

El medio SIM se coloca en tubos de 12x75 en forma vertical. Se incuba a 35°C de 18 a 24 hrs, leyendo producción de sulfhídrico y movilidad antes de añadir el reactivo de Ehrlich.

### ANEXO III

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

##### Alcohol-acetona:

Etanol al 96%	700 ml
Acetona	300 ml

##### Cristal violeta:

A) Cristal violeta	2 g
Etanol al 96%	cbp 20 ml

Mezclar y disolver el colorante

B) Oxalato de amonio	0.8 g
Agua	cbp 80 ml

Mezclar la solución A y B perfectamente.

##### Lugol:

Yodo	5.0 g
Yoduro de potasio	10.0 g
Agua	cbp 100 ml

Disolver el yoduro y el yodo en 10 ml de agua; aforar.

##### Safranina:

Safranina	0.25 g
Etanol al 96%	10 ml
Agua	cbp 100 ml

Disolver la safranina con el alcohol; aforar.

**Solución de yodo para Caldo Tetracionato:**

Yodo 6.0 g

Yoduro de potasio 5.0 g

Agua 20 ml

Disolver el yoduro en el agua; disolver el yodo en esta solución.

**Solución salina isotónica:**

Cloruro de Sodio 8.5 g

Agua cbp 1000 ml

## ANEXO IV

### Análisis Estadístico de las Muestras Primarias y Secundarias

Para poder evaluar el tratamiento que existe entre la formación de los lodos primarios y secundarios, debemos comparar las medias poblacionales con el fin de verificar si ambas muestras son similares (es decir que no presentan cambios por el tratamiento) o difieren, lo cual se verifica al realizar un ensayo de tendencia central. Antes de realizar la comparación de las medias, debemos de probar que tanto varían las poblaciones entre sí, con el fin de ver si son comparables o no; esto se realiza aplicando pruebas de dispersión (prueba F).

#### Prueba de Dispersión (Prueba F)

Para comprobar si la variación de ambas muestras se comportan en forma similar, se establecen dos hipótesis:

$$H_0 : \quad u_x = u_y$$

$$H_1 : \quad u_x \neq u_y$$

donde  $u_x$  corresponde a la varianza de las muestras primarias y  $u_y$  a la varianza de las secundarias. Con el fin de comprobar o rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ), debemos realizar la prueba F y compararla con la  $F_c$  (de tablas):

$$F = \frac{u_x}{u_y}$$

Si la F experimental se encuentra dentro del rango dado por  $F_c$ , las varianzas de ambas poblaciones son equivalentes,

se acepta la hipótesis nula y pueden ser comparadas entre sí. Si el valor de la F calculada no cae dentro del rango descrito, las poblaciones serían no equivalentes y no podría realizarse la comparación de medias. En el caso a los muestreos *Salmonella* positivos de lodos primarios y secundarios reportados en este trabajo, cumplen con la hipótesis nula de esta prueba y por lo tanto puede realizarse una comparación de sus medias poblacionales.

#### Prueba de Tendencia Central

Con el fin de verificar si existe alguna diferencia significativa entre los lodos primarios y secundarios (la cual puede estar dada por la eficiencia de los tratamientos) se realiza una comparación de medias poblacionales.

Se establecen las hipótesis:

$$H_0 : \mu_x = \mu_y$$

$$H_1 : \mu_x \neq \mu_y$$

donde  $\mu_x$  corresponde a la media poblacional de los muestreos primarios y  $\mu_y$  corresponde a la media poblacional secundaria. Para saber cual de las hipótesis mencionadas es verdadera, debemos determinar el valor de la distribución de las poblaciones (Z), y comparar el valor obtenido con el valor de Z determinado en tablas con un 95% de confianza. Para determinar la Z experimental utilizamos la siguiente ecuación:

$$Z = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{\sigma_x^2}{n_x} + \frac{\sigma_y^2}{n_y}}} = \frac{0.24}{0.11} = 2.18$$

Si el valor experimental de  $Z$  es mayor al encontrado en tablas (de  $-1.96$  a  $1.96$ ), es decir, el valor de  $Z$  sale del rango de confianza del 95%, la hipótesis nula se rechaza ya que las medias poblacionales difieren. En el caso de las muestras primarias y secundarias analizadas en este trabajo, los lodos primarios difieren de los secundarios por no caer el valor de  $Z$  experimental dentro del rango dado por la  $Z$  teórica, y esta diferencia puede deberse a los tratamientos que se encuentran entre estas dos muestras (tratamiento primario y secundario).

