

11651



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

DETERMINACION DE *Vibrio cholerae* 01
EN HORTALIZAS Y EN EL AGUA UTILIZADA
PARA SU RIEGO EN UN EJIDO CON
RESTRICCIONES DE CULTIVO

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
(AREA MICROBIOLOGIA)

P R E S E N T A:

I. B. Q. RAQUEL GOMEZ PLIEGO

DIRECTORA: M. en C. NIDIA ARAGON SALGADO
ASESORES: M. en C. VICENTE LOPEZ MERCADO
M. en C. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO, 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado
FES-Cuautitlán
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "DETERMINACION DE Vibrio cholerae O1 EN HORTALIZAS Y EN EL AGUA UTILIZADA PARA SU RIEGO EN UN EJIDO CON RESTRICCIONES DE CULTIVO".

que presenta el (la) alumno (a) RAQUEL GOMEZ PLIEGO

con número de cuenta 9280839-3 y número de expediente 100921006

para obtener el grado de MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA

Consideramos que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

a _____ de _____ del _____

NOMBRE DE LOS SINODALES

Presidente	<u>M.C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE</u>	<i>Clara Ines Alvarez M</i>
Vocal	<u>M.C. ANA MARIA SANDOVAL VILLASANA</u>	<i>A. Sandoval</i>
Secretario	<u>M.C. VICENTE LOPEZ MERCADO</u>	<i>V. Lopez</i>
Primer Suplente	<u>M.C. NIDIA ARAGON SALGADO</u>	<i>Nidia Aragon</i>
Segundo Suplente	<u>M.C. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON</u>	<i>A. L. Sagahon</i>

AGRADECIMIENTOS:

A la M. en C. Nidia Aragón Saigado, por su amistad, apoyo y dirección de este trabajo.

Al M. en C. Vicente López Mercado, por su orientación, consejos y aporte del equipo utilizado para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Virginia Lara Sagahón por su asesoría en el análisis estadístico.

A la M en C Clara Inés Álvarez Manríquez por el aporte de materiales, equipos y valiosos comentarios en la realización de este trabajo.

A la Dra. Sara Valdéz Martínez por el aporte de medios de cultivo.

Al M. en C. Guillermo Valdivia Anda por su ayuda en la serotipificación de las cepas aisladas.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por el apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (IPN) por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

El presente trabajo lo dedico con todo mi amor a Ramón por su confianza, ayuda motivación, consejos y comprensión que me ha brindado a lo largo de la vida que hemos recorrido juntos.

A mi hijo que con su entusiasmo y amor me animó cuando más lo necesitaba.

A mi padre Luis, por la ayuda que me dio para lograr esta meta, a ti mamá por haberme dado la vida

A mis hermanas por su cariño y apoyo.

y principalmente a Dios por todas las cosas bellas que me a regalado

INDICE

Sección	Tema	Página
1.	Resumen	1
2.	Introducción	3
3.	Antecedentes	4
3.1	El cólera	4
3.1.1	Historia	4
3.1.1.1	Pandemias	4
3.1.1.2	El cólera en América	7
3.1.1.3	El cólera en México	8
3.1.2	Etiología	9
3.1.3	Patogénesis	10
3.1.4	Signos y síntomas	15
3.1.5	Epidemiología	16
3.1.5.1	Mecanismo de transmisión	16
3.1.5.2	Prevención y control del cólera	20
3.2	La contaminación del agua	21
3.2.1	Restricción de cultivos	25
3.2.2	Parámetros Físicoquímicos	28
3.3	Impacto económico y social	33
4.	Objetivos	36
4.1	General	36
4.2	Específicos	36
5.	Metodología	37
5.1	Zona de estudio	37
5.2	Diseño del muestreo de hortalizas	43
5.3	Muestreo de agua para análisis físicoquímicos	44
5.4	Muestreo de agua para análisis microbiológicos	45
5.4.1	Muestreo de agua para determinación de Organismos coliformes fecales	45
5.4.1.1.	Determinación de coliformes fecales (NMP).....	45
5.4.2	Muestreo de agua para determinación de <i>V. cholerae</i>	46
5.4.2.1	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> en agua de riego	47
5.5	Serotipificación de <i>Vibrio cholerae</i>	48
5.6	Muestreo de hortalizas	48
5.7	Cinética de desinfección	50
6.	Resultados y Discusión	52
7.	Conclusiones	94
8.	Apéndice	96
9.	Bibliografía	120

1. RESUMEN

Vibrio cholerae es el agente infeccioso causante de la enfermedad conocida como cólera, que ha producido epidemias devastadoras en diferentes épocas y en diversas partes del mundo.

El cólera se transmite por la vía oral-fecal. Los principales medios de transmisión son el agua y los alimentos contaminados.

El riego con aguas residuales ha sido señalado como una de las fuentes de contaminación de los alimentos (hortalizas). En consecuencia, las autoridades han restringido el cultivo de frutas y hortalizas regadas con aguas residuales.

Sin embargo, nosotros creemos que se deben realizar estudios para conocer el grado de contaminación en cada una de las zonas antes de restringir el cultivo y afectar económicamente a la población dedicada a ésta actividad agrícola.

En el presente trabajo se analizaron aguas de riego y hortalizas cultivadas durante siete meses del año en el Ejido de Cuautla, perteneciente a la Entidad Federativa de Morelos.

Vibrio cholerae fue aislado en el agua de riego y se encontró un alto contenido de microorganismos coliformes fecales tanto en el agua de riego como en las hortalizas.

Desde el punto de vista microbiológico, el agua del canal no cumple con las especificaciones establecidas para ser utilizada en el riego de hortalizas, sin embargo, desde el punto de vista físicoquímico se encontró que es de excelente calidad; por lo que solo basta dar solución al problema microbiológico.

Finalmente, se describen dos alternativas para la disminución y eliminación de la población de *Vibrio cholerae* en el área afectada.

2. INTRODUCCIÓN

Se ha descrito ampliamente que *Vibrio cholerae* 01 es transmitido principalmente por agua contaminada con desechos fecales y en segundo lugar por alimentos y bebidas contaminadas con heces y/o vómito de personas enfermas.

La transmisión de la enfermedad por agua contaminada puede ser por dos formas: por ingestión directa ó por recontaminación de los alimentos, de ésta última, la contaminación de alimentos crudos (frutas y hortalizas) por utilización de agua residual a través del riego es de las más importantes.

En el Estado de Morelos existen Distritos de Riego que han sido notificados con la restricción de cultivos ya que el agua utilizada se encuentra contaminada con microorganismos coliformes fecales y con un alto de riesgo de encontrar presente a la bacteria *Vibrio cholerae*.

En este trabajo se evaluó la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua de riego perteneciente al Canal "El Zapote", así como de las hortalizas cultivadas utilizando dicha agua.

El estudio se realizó durante diferentes meses del año, sobre todo en los que corresponden a las estaciones de primavera y verano, valorando las variables de temperatura y pH del agua, mismas que favorecen las condiciones de crecimiento de organismos coliformes fecales y de *Vibrio cholerae*.

Con el propósito de dar una alternativa de solución a los agricultores que se encuentran bajo la restricción de cultivos, se diseñaron equipos para dar tratamiento al agua de riego y disminuir con ello el factor de riesgo, ya que la mayoría de las hortalizas estudiadas se consumen crudas y completas.

3. ANTECEDENTES

3.1. El cólera

El cólera es una infección aguda intestinal, grave, que se caracteriza por inicio brusco, diarrea acuosa profusa, vómitos ocasionales, deshidratación rápida, acidosis y colapso circulatorio. La muerte suele sobrevenir unas horas después de su aparición (24,36,65,81,82,117,118).

3.1.1. Antecedentes Históricos

El cólera es una enfermedad aguda e infecciosa que fue descrita antes de la época de Hipócrates (Siglo V antes de Cristo). Se han descrito siete pandemias de ésta enfermedad ubicando su origen en Asia entre los Siglos XV y XVIII.

3.1.1.1. Pandemias del cólera

La primera pandemia fue localizada en el territorio de la actual Bangladesh desde donde la enfermedad se fue extendiendo rápidamente hacia una amplia franja de la Región Euroasiática- africana, se dice que los responsables de la propagación fueron las tropas inglesas y el tráfico de esclavos.

La segunda pandemia, cuyo origen nuevamente fue la planicie del Río Ganges, se extendió hacia países de Asia, Europa, África y América. Los conflictos bélicos contribuyeron a su propagación. Durante la segunda pandemia se promovieron por primera vez la creación de Consejos Locales de Salud en Londres en el año de 1832.

La tercera pandemia, la cuál ocurrió a mediados del Siglo XIX cobró numerosas víctimas entre las tropas inglesas, francesas e Italianas durante la Guerra

de Crimea, posteriormente, la enfermedad entró al Continente Americano y tocó tierras mexicanas.

De 1851 a 1885 fueron celebradas seis Conferencias Sanitarias internacionales sobre el cólera, la peste y la fiebre amarilla, de éstas no se obtuvieron resultados prácticos debido a que se desconocía la etiología de las enfermedades.

Fue en 1854 cuando John Snow, en Inglaterra, describió las medidas para la prevención de la enfermedad, tales como la limpieza estricta de las personas que cuidaban a los enfermos, manejo apropiado de las excreciones y de la ropa de cama, manejo estricto del agua para consumo (hervir ó filtrar), lavado y cocción de los alimentos, aislamiento del enfermo y comunicación inmediata de los nuevos casos de cólera, propuso además medidas preventivas a largo plazo, abastecimiento de agua potable a las comunidades, construcción de drenajes, etc.

En 1883 el científico alemán Roberto Koch realizó el descubrimiento del agente causal, *Vibrio cholerae*, un bacilo curvo de gran movilidad.

En la actualidad ocurre la transmisión de la séptima pandemia. El cólera es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en algunos países de Asia y África, y desde 1991 también en Latinoamérica. A fines de los años 40, parecía que el cólera se encontraba totalmente dominado, sin embargo, en 1961, después del lapso interpandémico más largo (37 años), se inició la Séptima pandemia: de las aguas de Sulawesi (Indonesia) emergió *Vibrio cholerae* O1 Biotipo El Tor

Debido a que la enfermedad se extendió al Sudeste Asiático, a la Península Índica y al Medio Oriente, se tendió un cordón militar en la frontera oriental de Irán,

se dispuso que quienes procedían de países en donde había cólera ingirieran cloranfenicol; a pesar de ésta medida, el vibrio se introdujo en el Oeste (25, 36, 67, 80, 98, 117, 118).

En el período de 1961 a 1989 se reportaron un total de 1. 713, 057 casos de cólera en 117 países del mundo. El curso de la séptima pandemia ha presentado tres períodos. En el primer período, de 1961 a 1969, veinticuatro países, predominantemente de Asia, reportaron cerca de 419, 968 casos. En el segundo período, de 1970 a 1977, setenta y tres países de Asia, África, Europa y América reportaron 706, 261 casos, y en el tercer período, de 1978 a 1989, ochenta y tres países reportaron 586, 828 casos. La epidemia global ha sido más severa entre 1967 y 1974. Subsecuentemente la morbilidad declinó y aumentó hacia 1989, permaneciendo alta y estable con 44, 000 a 52, 000 casos por año (25, 117)

La Tabla 1 muestra algunas características de las pandemias de cólera

Tabla 1. Pandemias del cólera.

Pandemia	Período	Duración interpandemia (años)	Lapso (años)	Origen	Biotipo
I	1817-1824	8	----	-----	Clásico
II	1826-1837	12	2	Bangladesh	Clásico
III	1848-1862	15	11	Bangladesh	Clásico
IV	1864-1875	12	2	Bangladesh	Clásico
V	1883-1896	13	8	Bangladesh	Clásico
VI	1899-1923	25	13	Bangladesh	Clásico
VII	1981 a la fecha	39	39	Indonesia	El Tor

Fuente. (25)

3.1.1.2. El cólera en América

El 23 de enero de 1991 el cólera reaparece en América después de más de 100 años de ausencia. El primer caso registrado ocurrió en la Provincia de Chancay, Perú, a los pocos días de éste, se presentó otro en Chimbole, 400 Km al norte de Chancay. A mediados de febrero del mismo año más de 10, 000 pacientes fueron tratados semanalmente; la epidemia se propagó e incluyó a un nuevo país casi cada mes. El primero de marzo se reportó el primer caso en la Provincia Del Oro en Ecuador, el 10 de marzo en Colombia se reportó un caso en la Costa del Pacífico. Hacia abril se presentaron los primeros casos en Chile y Brasil; en forma paralela se notificaron 23 casos en los Estados Unidos de Norteamérica (16 de ellos asociados con viajeros provenientes de Latinoamérica)

Canadá registró dos casos procedentes del Sur del Continente. En México apareció en junio y un mes después en Guatemala. Para agosto en el Salvador y en Bolivia, Panamá lo reportó en septiembre, Honduras en octubre y Nicaragua en noviembre; a fines de 1991, 391, 000 casos y cerca de 4, 000 muertos fueron reportados por la Organización Panamericana de Salud

El Continente Americano fué, sin duda, el territorio más afectado durante 1991 ya que acumuló el 70.5 % de los casos mundiales notificados ante la Organización Mundial para la Salud. O.M.S. (25).

En 1992 el cólera se mantuvo en los mismos países, agregándose otros cinco. De los 439,226 casos de cólera reportados hasta el mes de marzo, el 81% se concentró en Perú; el 12% en Ecuador y el 3% en Colombia. El bacilo recorrió Perú a gran velocidad (tres mil casos diarios al iniciar la epidemia) por lo que tuvo un gran impacto en la prestación de servicios médicos. De las 4, 364 defunciones ocurridas

en el año el 70% sucedieron en Perú; el 15% en Ecuador y el 5% en Colombia. En 1993 se detectaron casos en Brasil, Colombia, Ecuador, Chile, Perú y México entre otros; en suma, el cólera se ha difundido extensamente desde 1961 hasta 1998 en 98 países del mundo. Durante el período comprendido entre 1984 a 1991 se reportaron alrededor de 40, 000 casos anuales en aproximadamente 35 países, la mayoría en los Continentes Africano y Asiático (25).

3.1.1.3. El cólera en México

Los reportes históricos indican que el primer caso de cólera registrado en el presente Siglo en nuestro país, se confirmó el 13 de junio de 1991 en una localidad de la Sierra Sur del Estado de México, San Miguel Totolmaloya, municipio de Sultepec. Nueve días después se transmitió a Tula, Hidalgo, afectando a cincuenta personas distribuidas en trece localidades. En los primeros cuarenta días se presentaron brotes en los estados de Hidalgo, Puebla y Chiapas. A diez días del primer reporte en Totolmaloya, se habían registrado 402 casos en cinco entidades. En 1991 se registraron 2, 690 enfermos en 17 entidades. En 1992 se registraron 8,162 casos y 99 en 24 Estados de la República. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Desde ése primer caso, a la fecha, la enfermedad se ha transmitido por todo el territorio nacional, siendo Tabasco, Puebla, Veracruz, Yucatán e Hidalgo las Entidades Federativas más afectadas (76 - 106).

Tabla 2. El cólera en México.

Año	Casos	Defunciones	Letalidad	Entidad
1991	2690	34	1264	Tabasco, Hidalgo, Puebla, Chiapas
1992	8162	99	1213	Tabasco, Hidalgo, Puebla, Morelos
1993	11091	198	1785	Puebla, Veracruz, Chiapas, México
1994	4059	56	1360	Veracruz, Chiapas, Tabasco, México
1995	16430	142	0.864	Yucatán, Veracruz, Campeche, Chiapas
1996	1088	5	0.460	Tabasco, Chiapas, Yucatán, Veracruz
1997	2338	18	0.770	Puebla, México, Tamaulipas, Guanajuato
1998	71	—	—	—

Fuente. (76 - 106)

3.1.2. Etiología.

El cólera es causada por el agente infeccioso *Vibrio cholerae*, el cuál es un bacilo Gram negativo, curvo, de extremos redondeados, con un flagelo polar que le da gran movilidad (24,36,65,81,82,102,117,118).

Vibrio cholerae pertenece a la familia vibrionasea, filogenéticamente cercana a la familia de las enterobacterias. Tiene más de 90 serogrupos que se diferencian en base a sus antígenos somáticos. El causante principal del cólera es *Vibrio cholerae* O1, del cuál existen dos biotipos: Clásico y El Tor, los cuáles son serológicamente indistinguibles; dentro de cada biotipo hay tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hykojima.

Este vibrión sobrevive por períodos de hasta siete días fuera del organismo, especialmente en ambientes húmedos y templados. En el agua puede sobrevivir de

unas cuantas horas a algunas semanas, sobre todo si ésta se encuentra contaminada con materia orgánica y tiene un pH entre 6.0 y 9.0. Es susceptible a la desecación, ebullición, cloro, desinfección y tetraciclinas, y en menor grado a la estreptomycinina y a las sulfamidas.

3.1.3 Patogénesis

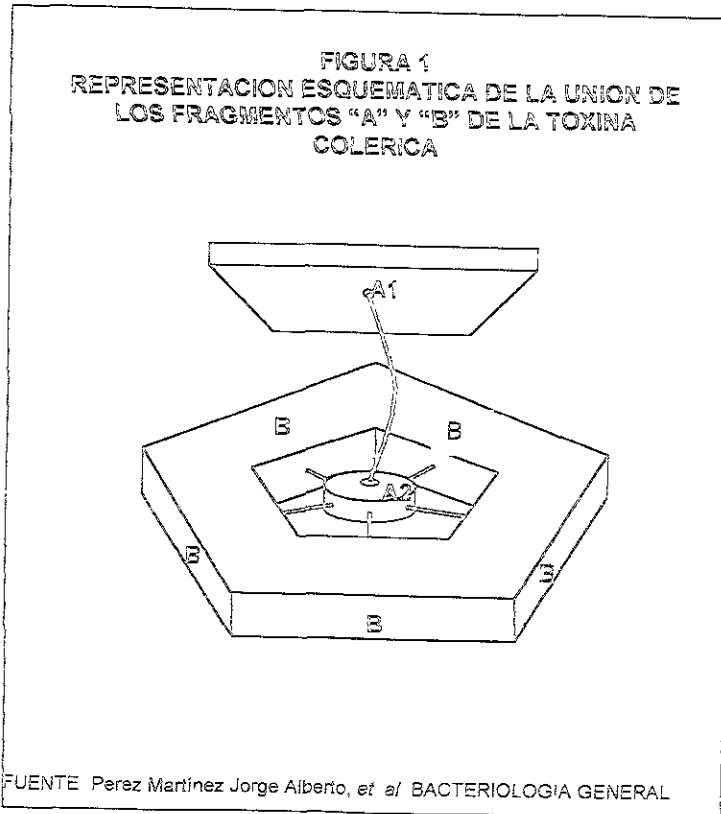
Vibrio cholerae es una bacteria patógena que coloniza el tracto intestinal produciendo una enterotoxina la cuál es muy potente, interfiriendo en el metabolismo de las células epiteliales del intestino, permitiendo la salida de agua y electrolitos a través del epitelio intestinal, interfiriendo con la capacidad de reabsorción del colon dando por resultado gran pérdida de agua del organismo, la cuál puede ser tan dramática que un paciente severamente afectado, puede perder hasta un litro de fluidos por hora, sobreviniendo la muerte por choque hipovolémico (24,36,65,81,82,117,118)

La toxina de *V. cholerae* la cuál recibe el nombre de coierageno, tiene un peso molecular de 84, 000 daltones. Posee 2 subunidades proteicas las cuáles se han demostrado por electroforésis. La primera se conoce como Subunidad A y tiene un peso molecular de 28, 000 daltones y la otra se conoce como Subunidad B con un peso molecular de 56, 000 daltones.

La subunidad B a su vez está formada por 5 proteínas de 11, 000 D y la subunidad A se puede dividir en dos proteínas, una de 23, 000 D y la otra de 5, 000 D, denominadas A_1 y A_2 respectivamente. Al parecer, la proteína A se sintetiza como una sola proteína y posteriormente se divide por acción proteolítica en lo que se conocen como fragmentos proteicos A_1 y A_2 . Los 5 polipéptidos de las

subunidades B están unidos por puentes de disulfuro dando una configuración terciaria en forma de pentámero la cuál es bastante resistente.

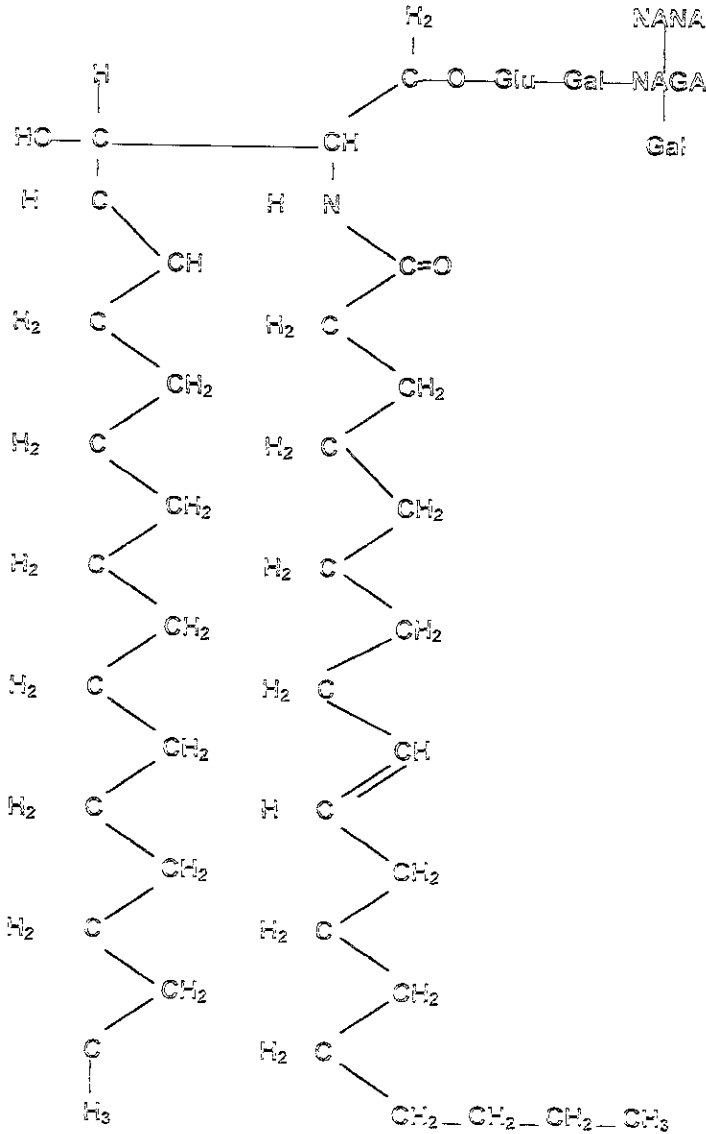
La unión entre las subunidades A y B está dada por enlaces no covalentes entre el fragmento A₂ y alguno de los cinco fragmentos de la subunidad B. Éste arreglo puede apreciarse en la Figura 1.



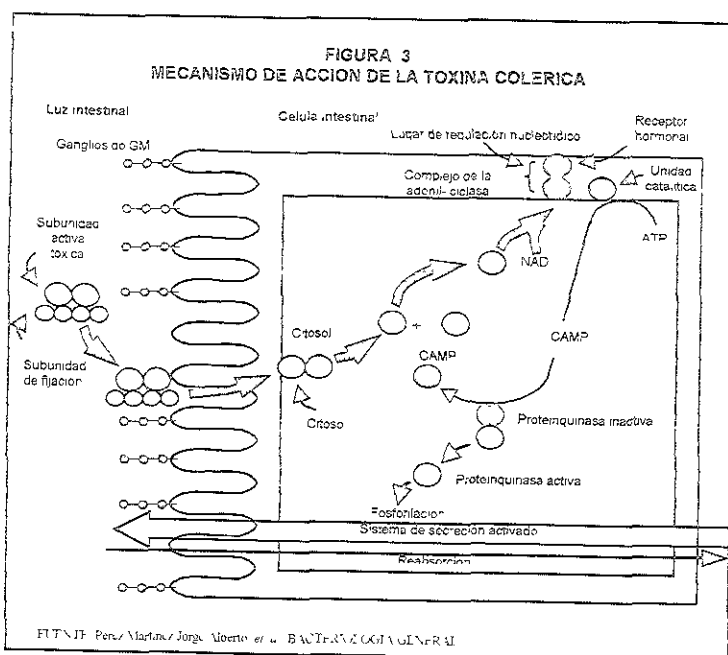
La subunidad B de la toxina no es tóxica, sin embargo es fundamental para la unión a la célula y su posterior entrada. La subunidad B se une a un gangliosido en la membrana celular de las microvellosidades del intestino delgado, específicamente al monogangliosido GM1 de las células (ver figura 2)

Una vez fijadas las subunidades, las fracciones A₁ y A₂ penetran a la célula. Estas se separan y se activan por acción del citosol. La presencia del fragmento A₁, del citosol y del NAD⁺, estimulan la producción de la adenilciclase, esto posiblemente por la activación de ADP en algún componente del complejo adenilciclase. Una vez estimulada la producción de adenilciclase se induce la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMP_c) aumentando drásticamente su concentración. Como consecuencia del incremento de AMP_c se activa una quinasa, se ha propuesto a la timidinkinasa, la cuál fosforila a las proteínas de membrana formando canales iónicos, ocasionando la pérdida de electrolitos y por consecuencia salida de agua a la luz intestinal (ver figura 3). Como ya se mencionó, al parecer la única función del fragmento A₂ es la unión con la subunidad B (2,4,9,10,30,36)

Figura 2. Monogangliósido GM1.



Fuente: Pérez Martínez Jorge Alberto. *et al.* Bacteriología General



En los últimos años, se ha propuesto otra acción de la toxina colérica. Ésta consiste en la estimulación del sistema nervioso a nivel intestinal, lo que induce a las células, localizadas en las criptas de las vellosidades, a reproducirse. Esto también contribuye al aumento del AMP_c (2,4,9,10,30,36).

Este aumento en el ritmo de división celular, en las criptas del intestino al menos *in vitro*, aumenta la concentración de $NaCl$ en las criptas del intestino debido a que los niveles de Na^+ son bajos y que durante la síntesis de ADN se producen altas concentraciones de Cl^- siendo favorecida su secreción por la presencia de AMP_c .

3.1.4. Signos y síntomas

El cólera es una enfermedad aguda intestinal, grave, que se caracteriza por inicio brusco, diarrea acuosa profusa, vómitos ocasionales, deshidratación rápida, acidosis y colapso circulatorio. La muerte suele sobrevenir unas horas después de su aparición (24, 36, 65, 81, 82, 117, 118).

La mayor parte de las infecciones por *Vibrio cholerae* son asintomáticas, en especial en los niños. Solo una proporción de las personas infectadas cursa un cuadro clínico consistente en anorexia, malestar abdominal y diarrea líquida abundante (puede causar la pérdida del 10 al 15 % de líquidos del peso corporal), al principio, las evacuaciones son de color café, pero pronto adquieren un color gris pálido con discreto "olor a pescado", la presencia de moco en las heces imparte apariencia de "lavado de arroz"; a menudo se producen vómitos una vez iniciada la diarrea; el pulso periférico puede estar ausente y la presión arterial es no detectable; frecuentemente existe signología de acidosis; en ocasiones existe cianosis como consecuencia del aumento de la viscosidad de la sangre, ojos hundidos, la piel adquiere una consistencia pastosa, los pies y las manos presentan el signo característico de "manos de lavandera", el enfermo se encuentra inquieto y con sed, el estado mental es lúcido, pero puede tornarse obnubilado a consecuencia de la acidosis; suelen presentarse calambres musculares como consecuencia de la pérdida de sales, y la oliguria puede presentarse mientras no se corrija la deshidratación y el equilibrio electrolítico (24, 36, 65, 81, 82, 117, 118).

La severidad clínica del cólera varía entre epidemia y epidemia, lo mismo que de persona a persona. El coeficiente de mortalidad en casos no tratados, en algunas epidemias, ha alcanzado hasta un 70 %. Con restitución adecuada de fluidos y electrolitos la letalidad no debe sobrepasar el 10 %, y la mayoría de los pacientes deberá seguir un curso sin complicaciones y con recuperación completa (102, 117, 118)

Existen otras enfermedades que pueden ser confundidas con el cólera, por ejemplo: intoxicaciones por alimentos producidas por salmonelas ó enterotoxina estafilocócica, la disentería bacilar aguda y disentería amibiana presentan tenesmo, fiebre, sangre y pus en las evacuaciones, a diferencia del cólera; la gastroenteritis esporádica y su forma epidémica pueden simular también al cólera excepto en que éstas enfermedades poseen un período de incubación entre 24 a 48 horas, las diarreas infantiles provocadas por *E. coli* enteropatógena ó virales, a menudo se presentan con deshidratación profunda, choque y muerte, intoxicaciones alimentarias por compuestos organofosforados y metálicos agotamiento por el calor paludismo por falciparum, neoplasmas y obstrucción intestinal mecánica (24, 81).

3.1.5. Epidemiología.

3.1.5.1 Mecanismo de transmisión

El reservorio natural de la bacteria es el hombre, aunque no se descarta la presencia de reservorios ambientales acuáticos (24, 36, 65, 81, 82, 117, 118)

El cólera se mantiene siguiendo un ciclo de transmisión hombre- medio ambiente- hombre; se desconoce aún la forma en que el microorganismo sobrevive durante los períodos inter- epidémicos (2,3,5,6,7,12,24,25,36,117,118).

La transmisión se realiza, normalmente, mediante un ciclo que comprende portadores que excretan los vibriones y el medio ambiente, dentro del cuál las fuentes de abastecimiento de agua juegan el papel más importante, asimismo, el consumo de alimentos contaminados con vómito ó heces de pacientes ó portadores asintomáticos juega un papel muy importante (2,3,5,6,7,12,24,39,44,51).

El cólera no puede transmitirse por vía respiratoria, ni por contacto casual como saludos, besos, abrazos, etc. Y su propagación de una persona a otra por contacto directo es de menor importancia (25,117,118).

El período de transmisibilidad se encuentra en función de la sobrevivencia del microorganismo en el medio ambiente, así como del tiempo que dure el estado de portador de heces positivas, que generalmente es de sólo unos días después del restablecimiento; sin embargo, suele durar varios meses (118).

En la Tabla 3 se presenta el tiempo de sobrevivencia de *V. cholerae* 01 en agua y diversos alimentos contaminados.

Tabla 3. Sobrevivencia de *Vibrio cholerae* en alimentos contaminados (días)

Medio	Temperatura	
	5.0 a 10.0 °C días	30.0 a 32.0 °C días
Agua de mar	60	De 10 a 13
Agua de sistema	18	De 7 a 13
Leche y lácteos	Más de 14	De 1 a 14
Mariscos frescos	De 7 a 14	De 2 a 5
Vegetales y frutas	De 7 a 10	De 1 a 7

Fuente: (118).

Dadas las características del microorganismo, la propagación de la enfermedad es favorecida por las condiciones deficientes de saneamiento básico, en especial por la carencia de agua potable, utilización de aguas residuales para el riego de hortalizas, sistemas deficientes de manejo de evacuación de aguas negras, escasa cultura y poca ó nula información sobre la enfermedad y de los medios para prevenirla (25,65,67,81,117,118).

El cólera se puede presentar en las formas siguientes: casos importados, casos aislados, epidemia explosiva y epidemia de evolución lenta. En los casos importados y aislados, es fácil realizar las medidas apropiadas de control siempre y cuando sean aplicadas en el momento oportuno. Las epidemias explosivas generalmente son causadas por una fuente común y son reconocidas con facilidad, por lo general se caracteriza por la aparición de una gran cantidad de casos en un lapso corto, y se debe al agua ó a alimentos contaminados; si se descubre oportunamente la fuente común del contagio, la enfermedad se puede controlar. Las epidemias de evolución lenta se caracterizan por la aparición de pocos casos diarios, a veces semanales o con intervalos mayores; en estos casos, no siempre se puede establecer la fuente de transmisión, generalmente se atribuye a agua contaminada, la cuál expone a una comunidad a dosis relativamente bajas del microorganismo, afectando solo a las personas más susceptibles (25,117,118)

Numerosos casos han sido revisados en los que la transmisión de la enfermedad se debe al consumo de agua contaminada (25,65,81,117,118)

La sobrevivencia de *V. cholerae* en agua de mar se encuentra en función de varios factores como temperatura, concentración de material orgánico y salinidad. Se establece que a temperatura entre 5-10 °C el tiempo de sobrevivencia es de 60 días

(118), es por ello que su presencia en agua de mar implica un gran riesgo de contaminación en animales acuáticos sobre todo en aquellos que son colectados próximos a la costa, tales como: ostiones, almejas, camarón, cangrejo y pescado. Numerosas revisiones indican que la transmisión de la bacteria por ingestión de mariscos frescos ocupa el segundo lugar (24,36,65,81,82,117,118).

Después de los mariscos, las frutas y verduras crudas son las fuentes de infección más frecuentes. La contaminación de éstos alimentos se produce generalmente por el agua que se utiliza para regarlos, limpiarlos ó prepararlos (33,48,61,64,67,72,77,79).

La sobrevivencia de *V. cholerae* en los vegetales crudos, sobre todo en los de superficie rugosa, es de 1 a 10 días a temperatura ambiente, pero no más de dos semanas en congelación (33,41,44). Estos datos se representan en la Tabla 4

En la mayoría de los casos reportados (33,48,61,64,67,72,77,79), la contaminación de vegetales y frutas se debe al uso de aguas contaminadas generalmente aguas negras, para su riego, esto es básicamente debido a la falta de sistemas apropiados para el tratamiento de aguas residuales en las comunidades agrícolas

Se sabe, además, que el nivel de sobrevivencia de los vibriones del cólera depende de la composición de carbohidratos de las frutas ó verduras, de la superficie y de la presencia de otro tipo de flora bacteriana. Se ha descrito que las verduras regadas con aguas no tratadas son un serio peligro de salud pública ya que éstas normalmente se consumen en forma cruda y no siempre se practican métodos de desinfección para eliminar microorganismos patógenos.

Tabla 4. Tiempo de sobrevivencia de *Vibrio cholerae* Biotipo El Tor en alimentos (días).

ALIMENTO	Temperatura	
	a 40 °C	a 25 0 °C
DÍAS		
Vegetales crudos	1 a 23	1 a 15
Vegetales cocinados	3 a 28	1 a 17
Frutas	1 a 14	1 a 7
Granos	-----	2 a 3
Fruta seca	-----	2 a 8
Nueces	-----	3
Café / Té	1 a 3	1 a 2
Pescado y mariscos	4 a 16	2 a 4
Carne cruda	5 a 7	1 a 2
Carne cocida	7 a 14	3 a 7
Bebidas carbonatadas	1 a 2	-----

Fuente: (65)

Las hortalizas frescas más comunes, con riesgo de provocar infecciones por *V. cholerae* son: tomates, cebollas, berenjenas, chicharos, apio, ejotes, brotes de leguminosas, calabazas, papa, col, pepinos, melones, lechuga, pimientos, perejil, calabacitas, maíz y berro (65).

3.1.5.2 Prevención y control del cólera

Las acciones de control implementadas por la Secretaría de Salud, en coordinación con el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE), para el control del cólera son las siguientes (81, 117, 118)

1. Vigilancia epidemiológica
2. Atención médica oportuna de los casos.
3. Reforzamiento de los laboratorios de diagnóstico

4. Estudio y control de brotes.
5. Fomento de la salud
6. Control sanitario de posibles fuentes de infección.
7. Educación sobre prácticas de higiene en la población.
8. Instalación de laboratorios locales para el diagnóstico
9. Restricción del uso de aguas negras en el riego de hortalizas
10. Instalación de sistemas de clorinación de agua

3.2. La contaminación del agua.

El principal vehículo de organismos patógenos, entre ellos *V. Cholerae*, es el agua residual de origen doméstico. En la Tabla 5 se muestran los microorganismos más comunes en éstas corrientes

Tabla 5. Microorganismos más comunes en las aguas negras

ORGANISMO	ENFERMEDAD
<i>Ascaris spp., Enterobius spp.</i>	Ascariasis, oxiuriasis
<i>Bacillus anthracis</i>	Antrax
<i>Brucella spp.</i>	Brucelosis, fiebre de Malta
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería amibiana
<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i>	Leptospirosis
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis
<i>Salmonella paratyphi</i>	Fiebre paratifoidea
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea
<i>Salmonella spp.</i>	Intoxicación por alimentos contaminados
<i>Schistosoma spp.</i>	Esquistosomiasis
<i>Shigella spp.</i>	Disentería bacilar
<i>Taenia spp.</i>	Teniasis
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
Virus	Poliomielitis, hepatitis

Fuente: (74).

El deterioro de la calidad de los diferentes cuerpos de agua es consecuencia directa de la deposición, sin tratamiento previo, de las aguas residuales municipales, agrícolas e industriales, las cuáles contienen grandes cantidades de sustancias contaminantes; la naturaleza de éstos así como su concentración influyen notablemente en la calidad de los cuerpos receptores. A continuación se analizan las fuentes de contaminación del agua (70, 71, 72, 73, 74)

Las principales fuentes de contaminación del agua se clasifican en cuatro grupos de éstos. las fuentes de contaminación urbanas son a las que nos referiremos (70, 71, 72, 73, 74).

Las concentraciones urbanas de población, constituyen una de las principales fuentes de contaminación debido a los grandes volúmenes de aguas residuales domésticas producidas las cuáles son recolectadas en los sistemas de drenaje y alcantarillado y posteriormente deberían ser tratadas, para finalmente ser depuestas en las corrientes de agua naturales, sin embargo, esto no ocurre en la mayoría de nuestras poblaciones y comunidades, por el contrario, las aguas residuales crudas son vertidas en los cuerpos de agua naturales, ocasionando con ello que dicha agua no pueda ser utilizada en actividades agrícolas como lo es por ejemplo para el riego de cultivos

Los diferentes tipos de sustancias contaminantes que se encuentran en las aguas residuales se pueden clasificar en Compuestos orgánicos, Sustancias radiactivas, Compuestos orgánicos, Contaminación térmica y Microorganismos (70 - 74).

Los principales compuestos orgánicos que se encuentran en las aguas residuales son las proteínas, carbohidratos y grasas. Estos son susceptibles de ser

degradadas por poblaciones heterogéneas de microorganismos ó por oxidación natural en los cuerpos de agua, su descomposición se caracteriza por producir compuestos tales como ácido sulfhídrico, metano, mercaptanos, indoles y fenoles, todos ellos despiden olores desagradables.

Las Sustancias radioactivas se encuentran en las aguas residuales de algunas plantas industriales, centros de investigación y hospitales que manejan éstas sustancias. Afortunadamente, esta clase de desechos, al menos aparentemente, tiene una deposición controlada por la reglamentación federal.

Los compuestos inorgánicos presentes en las aguas residuales provenientes de todas las fuentes de contaminación, se encuentran en forma soluble, coloidal y como sales insolubles, la mayor parte de éstas son sales del tipo cloruros, fosfatos, silicatos y óxidos metálicos, las cuales son altamente estables y no se encuentran sujetos a procesos de biodegradación, por lo que el grado de autodepuración que presentan los cuerpos de agua, con respecto a éstos contaminantes, estará en función de su poder de disolución y de la sedimentación de los compuestos.

La contaminación térmica de los cuerpos receptores es debida a la descarga de aguas residuales con temperaturas mayores a las que se presentan en condiciones naturales. Los principales procesos en los que se desechan aguas a temperatura elevada son aquellos en los que el agua es usada como medio de transmisión de calor, por ejemplo, las plantas generadoras de electricidad.

Los microorganismos presentes en las aguas residuales provienen en su mayoría de las excretas humanas. Asimismo, la contaminación con microorganismos es importante por su repercusión en la salud del hombre. El presente trabajo se enfoca al estudio de éste tipo de contaminación.

La mayoría de los cuerpos de agua que sirven como fuentes de abastecimiento de agua potable, contienen cantidades variables de aguas residuales; además, la demanda de agua, siempre en aumento, hace inevitable el reuso de las aguas de desecho. La agricultura y la recarga de acuíferos son las demandas más importantes de agua.

Las aguas residuales evacuadas sin tratamiento adecuado pueden ocasionar los siguientes daños (70 - 74):

1. Diseminación de enfermedades.
2. Contaminación de las diversas formas de vida acuática, que las hace peligrosas para el consumo humano
3. Devaluación de los lugares destinados a la recreación.
4. Exterminio de la vida acuática por agotamiento del oxígeno disuelto en el agua por acción del material orgánico presente.
5. Devaluación de la propiedad por causa de los malos olores y por la acumulación de residuos.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1976), el agua contaminada con *V. cholerae* puede causar problemas de salud por dos vías principales.

- Directa. A través de la ingestión de aguas cuya calidad microbiológica se deterioró por el contacto con excretas y/o aguas residuales, ó con aguas de escurrimiento pluvial, así como contaminación durante el recorrido hasta el usuario.

- **Indirecta:** A través de la ingestión de alimentos que fueron preparados con aguas contaminadas, por la contaminación de fuentes de abastecimiento debido a las prácticas de deposición de aguas residuales, a través de la ingestión de alimentos que fueron irrigados con aguas residuales crudas ó de calidad microbiológica deficiente.

3.2.1. La restricción de cultivos por la contaminación del agua.

La Secretaría de Desarrollo Social y Ecología, en coordinación con la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos y la Secretaría de Salud, establecieron en la propuesta de la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, que el Congreso de la Unión aprobó, que las aguas residuales provenientes de los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal podrán utilizarse en la actividad de la agricultura si cumplen con las Normas Ecológicas correspondientes (NTE – CCA – 032 / 91 y la NTE – CCA - 033 / 91) Esto ha sido establecido con el propósito de prevenir el deterioro ecológico y para asegurar una calidad de agua satisfactoria

Para el bienestar de la población es necesario el control de parámetros físicos y químicos así como bacteriológicos de las aguas de origen urbano o municipal ó bien, de la mezcla de éstas con la de los cuerpos de agua que se utilizan en el riego agrícola.

Los parámetros bacteriológicos máximos permitidos (contenido de microorganismos coliformes fecales) dependen del tipo de cultivo, el tipo de riego y el intervalo de tiempo entre el último riego y la cosecha

Las aguas residuales de origen urbano o municipal o la mezcla de éstas con los cuerpos de aguas que se usan en el riego de hortalizas de consumo crudo, en lo relativo a parámetros bacteriológicos se clasifican en los siguientes tipos (70 - 74):

- ◇ TIPO I. La que contenga menos de 1, 000 coliformes totales por cada 100 ml y ningún huevo de helminto viable por litro de agua.
- ◇ TIPO II. La que contiene de 1 a 1, 000 coliformes fecales por cada 100 ml ó cuando más 1 huevo viable de helminto por litro de agua
- ◇ TIPO III. La que contiene de 1, 001 a 100, 000 coliformes fecales por cada 100 ml de agua.
- ◇ TIPO IV. La que contiene más de 100, 000 coliformes fecales por cada 100 ml de agua

Esta clasificación sirve para determinar la clase de cultivos con restricción. en la Tabla 6 se resumen los tipos de cultivo no permitidos considerando diferentes características del agua.

Tabla 6. Cultivos prohibidos de acuerdo al tipo de agua utilizada para su riego.

Tipo de riego	Tipo de agua	Intervalo mínimo entre el último riego y cosecha	Cultivos no permitidos
INUNDACIÓN	I	20 días	Los señalados abajo**, excepto ajo, pepino, melón y sandía
	II	20 días	Los señalados abajo**, excepto melón y sandía
	III	20 días	Los señalados abajo**.
	IV	20 días	Los señalados abajo**, excepto ajo, pepino, jícama, melón, tomate verde ó de cáscara
SURCO	I	15 días	Cultivo Libre
	II	20 días	Los señalados abajo**, excepto ajo, pepino, jícama, melón y sandía, así como tomate verde.
	III	20 días	Los señalados abajo**, excepto melón y sandía
	IV	20 días	Los señalados abajo**.
ASPERSIÓN	I	20 días	Los señalados abajo**, excepto ajo, pepino, jícama, melón y sandía.
	II	20 días	Los señalados abajo**.
	III	20 días	Los señalados abajo**.
	IV	20 días	Los señalados abajo**.

Fuente: Norma Técnica Ecológica - CCA -033/91

Los cultivos** que han sido restringidos son acelga, ajo, apio, berro, betabel, brócoli, cebolla, cilantro, col, coliflor, epazote, espinaca, hongo, lechuga, pápalo, perejil, quelite, quintonil, rábano, yerbabuena, zanahoria, pepino, calabacita, jitomate, tomatillo y tomate verde ó de cáscara, con excepción de las últimas cinco cuando se siembren en espaldera. Se equiparan a las hortalizas las siguientes frutas: fresas, jícama, melón, sandía y zarzamora

3.2.2. Parámetros fisicoquímicos del agua

Como se comentó anteriormente, el agua utilizada para el riego agrícola, además de cumplir con los parámetros microbiológicos, es necesario que posea una serie de características fisicoquímicas establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM – 002 – ECOL – 1996.

Los límites máximos permitidos fueron establecidos en los laboratorios de la Comisión Nacional del Agua, en donde estudiaron las posibilidades técnicas de remoción de contaminantes que generan las aguas residuales de origen urbano ó municipal de acuerdo con las experiencias nacionales e internacionales

Los parámetros fisicoquímicos que son importantes determinar para establecer el uso del agua son los siguientes pH, temperatura, conductividad eléctrica, Demanda Química de Oxígeno (DQO), metales pesados: arsénico, fierro, selenio, aluminio, cadmio, antimonio, fluor, cobre y níquel (70 - 74).

3.2.2.1. pH. Este parámetro constituye una característica muy importante de las aguas residuales, ya que un efluente con concentraciones extremas de iones H^+ es muy difícil de tratar utilizando sistemas biológicos.

3.2.2.2. **Temperatura.** Esta propiedad termodinámica influye notablemente en las características físicas, químicas y microbiológicas de los cuerpos de agua. Por ello, es importante su determinación en cualquier intento por evaluar la calidad de las aguas. Su impacto se puede resumir en lo siguiente.

- a) La temperatura del agua es importante para la conservación de la vida acuática
- b) Es un factor que influye en el ciclo hidrobiológico, afectando directamente los procesos de evaporación, transpiración y condensación.
- c) La temperatura de los cuerpos de agua modifica directamente los procesos de autodepuración. Esto es, afecta simultáneamente la estabilización de la materia orgánica, el nivel de saturación del oxígeno disuelto así como la aereación.
- d) Parámetros físicos y químicos de importancia sanitaria tales como la densidad, conductividad y pH, se ven afectados por variaciones de temperatura
- e) De acuerdo a la temperatura que presenten los cuerpos de agua, existirán en ella los microorganismos adaptados a dicha temperatura.

3.2.2.3. **Conductividad eléctrica.** La conductividad eléctrica es un parámetro utilizado para evaluar la pureza del agua en ríos y corrientes, encontrándose dentro de un rango de 150 a 500 micromhos/cm. Para aguas de riego los rangos permitidos se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Calidad del agua de acuerdo a su conductividad eléctrica
(en micromhos/cm a 25 °C en aguas de riego)

Calidad del Agua	Conductividad
Excelente	< 250
Buena	250 a 750
Permisible	750 a 2000
Dudosa	2000 a 3000
Inservible	> 3000

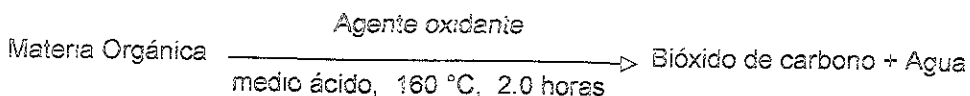
Fuente: (70)

3.2.2.4. Metales pesados. Es común encontrar en la mayoría de las aguas, trazas de elementos tales como el mercurio, cadmio, plomo, cromo, cobre, fierro, etc., algunos de los cuáles son limitantes del crecimiento de microorganismos. Sin embargo, cuando se encuentran presentes en cantidades excesivas, pueden resultar altamente agresivos y tóxicos. Generalmente provienen de las descargas industriales.

3.2.2.5. Oxígeno disuelto. Todo organismo vivo requiere de oxígeno disuelto en una u otra forma para mantener sus procesos metabólicos, del cuál obtiene la energía necesaria para su crecimiento y reproducción. En los desechos líquidos, el oxígeno disuelto es un factor que determina el tipo de transformación biológica que tiene lugar en su seno, efectuado ya sea por organismos aerobios ó anaerobios. Los primeros

utilizan el oxígeno disuelto para la oxidación de la materia orgánica e inorgánica, produciendo sustancias finales inofensivas tales como el bióxido de carbono y agua, en cambio, los organismos anaerobios efectúan la oxidación utilizando el oxígeno de ciertas sales inorgánicas tales como los sulfatos, produciéndose sustancias altamente tóxicas, por lo tanto, es muy importante mantener las condiciones favorables para el desarrollo de organismos aerobios.

3.2.2.6. Demanda Química de Oxígeno. El método de determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) consiste en determinar la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica presente en el agua, esto, bajo condiciones específicas de un agente oxidante, condiciones ácidas y temperatura, transformándose en bióxido de carbono y agua, de acuerdo a la siguiente ecuación:



La prueba de la DQO tiene una limitación, oxida la materia orgánica presente, sin importar su degradabilidad biológica, además, no oxida a materiales tales como la pindina, benceno y amoníaco, por lo que para muchos compuestos orgánicos se ha reportado una oxidación de 95 al 100 % del valor teórico.

La prueba de DQO presenta las siguientes ventajas.

- Bajo costo de equipo y reactivos.
- Tiempo de prueba reducido
- El método es aplicable a una gran cantidad de compuestos.

3.2.2.7. **Arsénico.** La presencia de arsénico en las aguas naturales se debe a su contacto con el suelo que lo contiene, así como por contaminación por desechos de las industrias metalúrgicas y de las descargas agrícolas. El empleo de éste elemento en la preparación de agentes germicidas, insecticidas, fertilizantes, detergentes, preservativos de la madera, aditivo para alimentos para animales, fabricación de pinturas y anilinas, ha provocado alteraciones en la calidad natural de los cuerpos de agua y suelo de muchas zonas del país.

El arsénico es, generalmente, insoluble en agua, pero muchos de sus compuestos son muy solubles, tal es el caso de los arsenatos, arsenitos y sus formas ácidas. La forma predominante depende del pH del agua, así como de la presencia de un oxidante. El arsenito es la forma más tóxica, tiene la característica de acumularse en el organismo de los animales y humanos.

La evaluación de los diferentes parámetros físicos y químicos, nos ofrece una idea de lo importante que resulta el hecho de que las aguas residuales de origen urbano, municipal ó industrial cumplan con la norma establecida para ellas, al mismo tiempo nos obliga a la búsqueda de alternativas de solución que permita a los agricultores mitigar el impacto provocado por la prohibición del cultivo de hortalizas.

En la Tabla 8 se presentan los niveles máximos permisibles de los parámetros mencionados

Tabla 8. Valores máximos permisibles de parámetros físicoquímicos.

Parámetro	Nivel Máximo Permisible
pH	6.5 a 8.5
Conductividad	2000 mmhos/cm
Oxígeno Disuelto	
Metales	mg/ml
As	0.10
Fe	5.00
Cr	0.01
Ni	0.05
CN	0.02
Al	0.20
Zn	2.00
Cu	0.20

Fuente. Norma Oficial Mexicana NOM – 002 – ECOL – 1996.

3.3. Impacto económico y social del cólera

En sus diferentes períodos, cada pandemia ha provocado serios problemas de salud, económicos y sociales. El número de decesos por la enfermedad ha sido considerable, los recursos económicos que se han destinado para combatir a la enfermedad son cuantiosos y el daño social, al impactar en la población económicamente activa, es invaluable. Se ha establecido que el cólera es una enfermedad del tercer mundo, sin embargo, no es privativo de éste, también ha afectado a países desarrollados, aunque no en la misma magnitud (15, 17, 19, 25, 43).

Desde la aparición del cólera en el mundo, los gobiernos de los diferentes países que han resultado afectados, han destinado cuantiosos presupuestos

enfocados sobre todo a combatir la enfermedad. integración de comités, congresos, investigación, hospitales, movilización de personal de salud pública, movilización de tropas establecimiento de cordones sanitarios, distribución de comunicados, propaganda, etc. que sin duda repercuten económicamente en el desarrollo de las naciones aunque finalmente la población más desprotegida es quien resiente con mayor impacto los efectos del cólera.

El cólera es causa de mortalidad, afectando con ello el ingreso familiar, dejando niños en la orfandad y con pocas oportunidades de elevar su nivel socioeconómico

La notificación de *Vibrio cholerae* ha impactado en la restricción de cultivos cuya cosecha y venta representan el principal sustento de numerosas familias asentadas en las comunidades rurales

Entre muchos es el caso del Estado de Morelos, México, el cuál se caracteriza por ser un importante productor de hortalizas y que por su cercanía con el Distrito Federal es uno de sus más importantes proveedores. a partir del 29 de mayo de 1992, la Comisión Nacional del Agua (CNA) notificó a los comisariados ejidales y productores hortícolas las condiciones para el uso de aguas residuales de origen urbano y municipal o la mezcla de éstos cuerpos de agua en el riego agrícola

Dichas condiciones se tienen establecidas en la Norma Técnica Ecológica NTE – CCA – 003/ 91 publicada en el Diario Oficial de la Federación el 04 de octubre de 1991 (69)

Con el propósito de dar seguimiento a las Acciones de Control y Vigilancia que se mencionan en la norma, la CNA realizó el recuento de microorganismos coliformes fecales al agua de los diferentes canales de riego pertenecientes al Ejido

de Cuautla en los que se encontró un alto contenido de éstos microorganismos (100, 000 bacterias coliformes fecales por 100 ml de agua), con lo que el riesgo de encontrar *Vibrio cholerae* es alto (Anexo)

Tomando como base éstos resultados, la CNA prohibió el cultivo de 22 diferentes hortalizas, ésta determinación sin duda alguna, contribuyó a evitar que enfermedades gastrointestinales (entre ellas el cólera) puedan ser diseminadas por el consumo de hortalizas, aunque con ello ha afectado el modo de subsistencia de cientos de familias que se dedican a ésta actividad agrícola (69).

El caso de estudio, el Estado de Morelos Entidad Federativa localizada al sur del Distrito Federal, se ha caracterizado por ser un Estado productor de hortalizas, sus principales mercados son el mismo Estado de Morelos, el Distrito Federal y los Estados Unidos de Norteamérica esto es, gran parte de su población se dedica a la actividad de la agricultura como la principal fuente de ingresos económicos, Las hortalizas más importantes que se cultivan en el Estado son el berro, pepino, acelga, lechuga, coliflor, cilantro, cebolla, calabacitas y jitomate.

De acuerdo a lo anterior, se establece que el impacto económico y social del cólera sobre la restricción de cultivos a afectado, en el caso particular, a 310 hectáreas cultivables, pertenecientes a 180 familias, la influencia de riego es el Río Cuautla, en el Municipio de Cuautla, Estado de Morelos (datos de archivo, Ejido Cuautla).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

Establecer si las hortalizas y agua de riego son fuentes de infección de *Vibrio cholerae* en diferentes zonas de cultivo del Ejido Cuautla. Asimismo diseñar clonadores como una alternativa para disminuir la incidencia de *Vibrio cholerae* y microorganismos coliformes fecales

4.2. Objetivos específicos:

1. Determinar el contenido de microorganismos coliformes fecales en el agua del Canal "El Zapote", en diferentes sitios de muestreo y en diferentes meses del año.
2. Efectuar el recuento de microorganismos coliformes fecales en hortalizas.
3. Evaluar el efecto del pH y temperatura sobre la incidencia de organismos coliformes fecales y *Vibrio cholerae*, en el agua utilizada para el riego de hortalizas, en diferentes meses del año
4. Detectar, aislar e identificar *Vibrio cholerae* en hortalizas y en el agua que se utiliza para su riego.
5. Determinar el efecto de la densidad de población sobre la frecuencia de *Vibrio cholerae*
6. Realizar análisis físicoquímicos en el agua de riego
7. Diseñar un clonador como una alternativa de solución a la restricción de cultivos

5. METODOLOGÍA

La Metodología se encuentra expresada por medio de un diagrama de bloques, ver Diagramas 1 y 2.

5.1 Zona de estudio.

Las tierras de cultivo pertenecientes al Ejido de Cuautla, se encuentran irrigadas por el agua de tres canales que reciben el nombre de. "El Zapote", "Xochitengo" y "Santa Rosa" La fuente de agua de éstos es el Río Cuautla, el cuál atraviesa zonas urbanas e industriales, recibiendo diversos tipos de efluentes.

El estudio se realizó en el canal "El Zapote", ya que de los tres canales mencionados, éste es el que por sus características tiene mayor probabilidad de encontrar en sus aguas al microorganismo de estudio, esto es, por su ubicación recibe más descargas tanto de drenajes domésticos como de granjas de cría de animales, para posteriormente utilizar sus aguas para el riego de hortalizas

El canal "El Zapote" tiene influencia de riego en aproximadamente 310 Ha en las cuáles se cultivan gran cantidad de hortalizas y que forma la actividad agrícola de aproximadamente 189 familias En la Tabla 9 se representan éstos datos

Tabla No. 9. Área de influencia de el canal "El Zapote".

Campo	Área Cultivable	No. De Ejidatarios
Campo "1° de Puxtla"	63.0	47
Campo "2° de Puxtla"	56.0	35
Campo "3° de Puxtla"	50.0	29
Campo "Jicamán"	73.0	49
Campo "Sifón"	58.0	28
Total	310.0 Ha	189 ejidatarios

5.1.1. Diseño de muestreo del agua de riego para análisis microbiológico.

Se realizó un muestreo estratificado, eligiéndose 5 puntos a lo largo del canal, el cuál tiene las siguientes dimensiones

Longitud	5.0 a 6.0 Km
Ancho	1.5 a 2.5 m
Profundidad	20 a 80 cm

La ubicación de los sitios de muestreo seleccionados a lo largo del canal se muestran en el Mapa 1; las características de cada sitio se describen en la Tabla 10

Tabla 10. Características de los sitios de muestreo seleccionados.

Sitio	Características
1	Nacimiento del canal, agua netamente proveniente del Río Cuautla.
2	Localizado a 2.5 Km del inicio del canal, atraviesa la zona urbana.
3	Ubicado a 3.0 Km del nacimiento del canal, abarca zona de riego conurbada.
4	Sitio netamente agrícola, se localiza a 5.0 Km del punto inicial, existen asentamientos humanos
5	Dentro de un área totalmente agrícola, situada a 6.0 Km del punto inicial

En cada sitio de muestreo se tomaron 2 muestras, una de agua (100 ml) y otra por medio de un hisopo de Moore (el cuál fue colocado durante 24 horas dentro de la corriente de agua), los hisopos recolectados se transportaron dentro de frascos contenían agua peptonada alcalina, éste muestreo se realizó durante siete meses del año a intervalos de 15 días, haciendo un total de 140 muestras, a 70 de éstas muestras se les determinó el contenido de organismos coliformes fecales, el resto de las muestras se utilizaron para la identificación de *Vibrio cholerae*.

$$\text{Total de muestras analizadas} = A \times B \times C \times D$$

Donde: A = número de muestreos por mes = 2

B = meses del año en los que realizó el muestreo = 7

C = número de sitios muestreados = 5

D = Número de muestras recolectadas en cada sitio de muestreo = 2

$$\text{Total de muestras analizadas} = 2 \times 7 \times 5 \times 2 = 140 \text{ muestras}$$

Muestras para aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* = 70

Muestras para la determinación de organismos coliformes fecales = 70

Para el cálculo de los parámetros estadísticos y para el análisis de variancia se utilizó el programa Estadística.

Mediante la Prueba de Tukey se evaluaron las diferencias de los promedios de las variables en los diferentes sitios de muestreo. Se consideró una diferencia significativa si $p < 0.05$.

Diagrama No. 1. Metodología para la toma de muestra de agua de riego expresada mediante un diagrama de bloques.

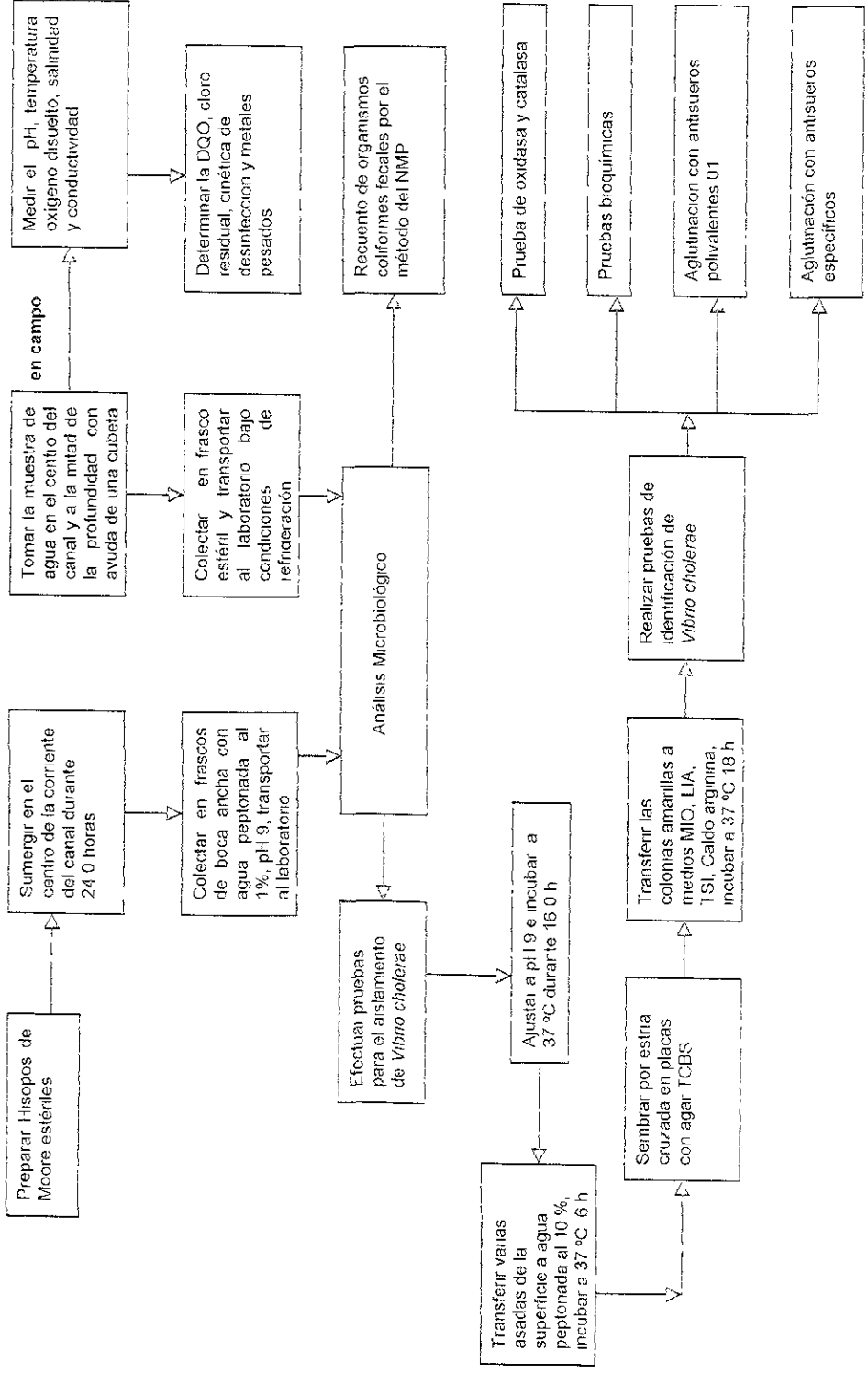
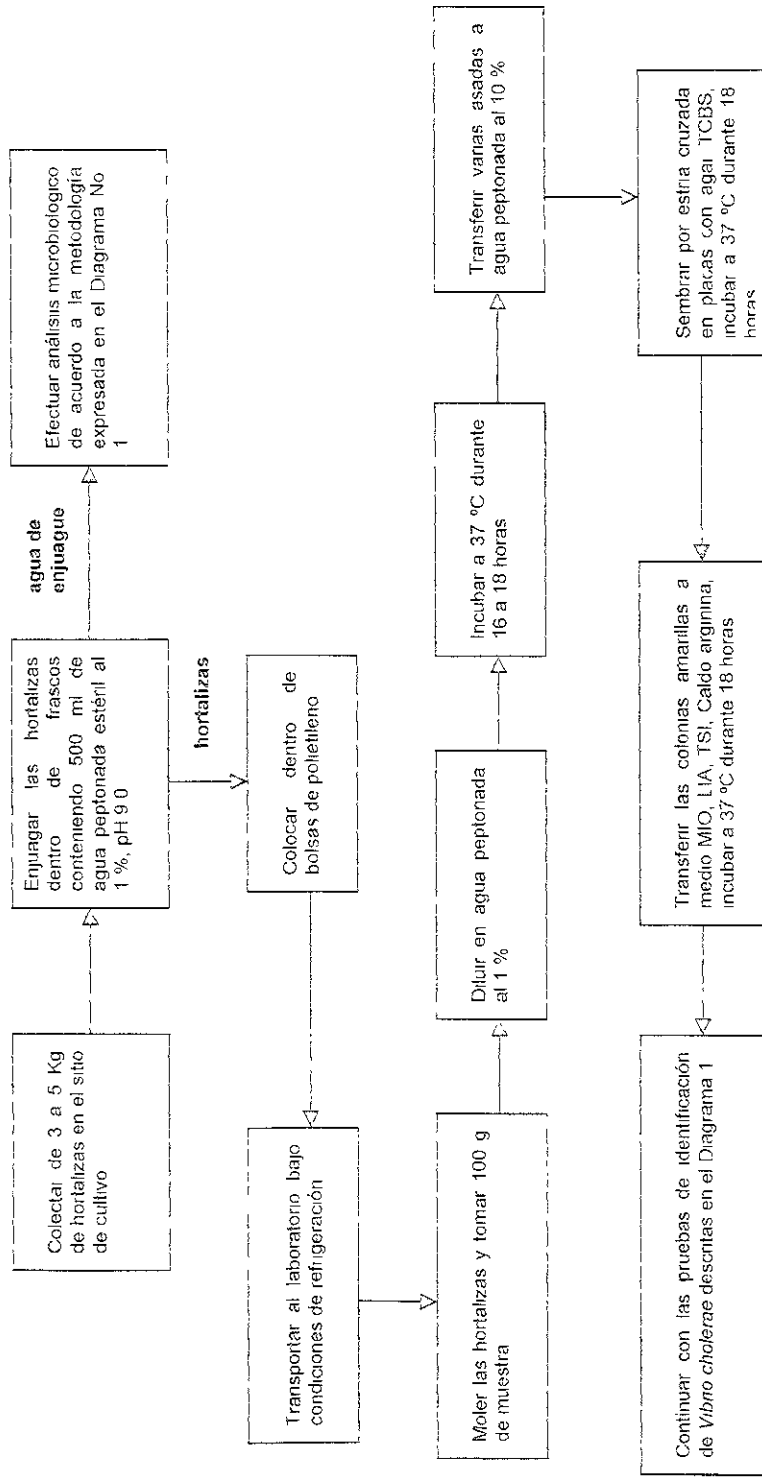


Diagrama No. 2. Metodología para la toma de muestra de hortalizas mediante un diagrama de bloques.



3.2. Diseño del muestreo de hortalizas.

Se consideraron los siguientes tipos de hortalizas

- 1 Tipo de cultivo de acuerdo a la parte comestible, en raíces, tallos, hojas, flores y frutos
- 2 Distancia del canal, se consideraron tres
 - Cerca, a 1.0 m del canal
 - En medio, a una distancia de 2.0 m del canal.
 - Lejos, a 3.0 m del canal

Las muestras analizadas consistieron de la mezcla de las hortalizas colectadas en las tres diferentes distancias del canal.

- 3 Época de la cosecha, se muestrearon 2 etapas.
 - 1ª Etapa La primera muestra se tomó un día después del último riego antes de la cosecha.
 - 2ª Etapa La última muestra se colectó el día de la cosecha

La ubicación de las diferentes hortalizas en cada sitio se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Ubicación de hortalizas por sitio de muestreo.

Hortaliza	Sitio
Berro	1
Lechuga, rábano, epazote, cilantro, yerbabuena, pápalo, aceitilla	2
	3
Pepino y calabacita	4
	5

Nótese que en los sitios 3 y 5 no se tienen cultivos de hortalizas, esto es debido a que los agricultores decidieron cultivar productos sin restricción.

5.3. Muestreo de agua de riego para análisis físicos y químicos.

Las muestras de agua fueron tomadas del punto medio de la profundidad y del ancho de la corriente del canal, utilizando un recipiente previamente lavado y enjuagado con el agua del mismo canal, y sujeta por medio de un cordel para poder llegar a la profundidad establecida, posteriormente fueron transportadas al laboratorio en ánforas de 6.0 litros bajo condiciones de refrigeración, para la determinación de la DQO, metales pesados y para el estudio de cinética de desinfección (70).

En el sitio de muestreo se determinó la temperatura con un termómetro de mercurio, el pH se determinó con un potenciómetro de campo marca conductroni PC18. oxígeno disuelto, la salinidad y la conductividad eléctrica se midió por el método electrométrico asimismo, se midió el aforo de la corriente superficial (medición de la sección transversal y medición de la velocidad de la corriente) para posteriormente calcular el gasto volumétrico de la corriente y el dimensionamiento de los clorinadores.

Con el agua del canal muestreada se determinó la DQO por el método del dicromato de potasio (ver apéndice 8.17) así como también se determinó la concentración de metales pesados mediante el uso de kits comerciales marca Merck siguiendo las instrucciones del fabricante.

El perfil de la sección transversal del cauce en el sitio del aforo se determinó por sondeo (ver el apéndice); la velocidad de la corriente en la sección transversal seleccionada se determinó por flotadores (ver el apéndice).

Para el diseño de los clorinadores se utilizaron los valores de las diferentes características de la corriente, tales como velocidad, sección del área transversal, la

profundidad, gasto volumétrico, tiempo de residencia del desinfectante, etc., la metodología aparece en el apéndice

5.4. Muestreo de agua de riego para análisis microbiológico.

5.4.1 Muestreo de agua de riego para la determinación de organismos coliformes fecales.

Las muestras de agua se tomaron en el punto medio de la profundidad y de la corriente del canal por medio de una cubeta limpia y enjuagada varias veces con el agua del mismo canal; en el sitio se midió el pH y la temperatura, se colectaron de 500 a 1000 ml de agua en frascos de boca ancha previamente esterilizados. Las muestras colectadas se transportaron al laboratorio bajo condiciones de refrigeración para la determinación de organismos coliformes fecales por el método del número más probable (NMP)

5.4.1.1 Determinación de organismos coliformes fecales por el método del número más probable (NMP).

- 1 Con las muestras de agua se realizaron diluciones decimales desde 10^{-1} hasta 10^{-3} .

Prueba presuntiva

- 2 Se inoculó 1.0 ml de cada dilución a cada uno de 3 tubos conteniendo 10 ml de caldo laurii sulfato triptosa.
3. Se incubaron los tubos a $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $4.8 \text{ h} \pm 2.0 \text{ h}$ horas

- 4 Se examinaron los tubos a las 24 ± 2.0 horas y se observó la acumulación de gas en la campana de fermentación, si no existe la presencia de gas los tubos se dejan incubando hasta 48 ± 2.0 horas
- 5 La presencia de gas en cualquier cantidad, dentro del tiempo de incubación se considera como prueba positiva.
- 6 Se agitaron suavemente los tubos que resultaron positivos
- 7 Se transfirieron de 2 a 3 asadas de cada tubo a tubos con caldo E C
- 8 Se incubaron los tubos a 44.5 ± 0.2 °C en baño de agua y se observó la producción de gas a las 24 ó 48 horas
- 9 La presencia de gas en cualquier cantidad hizo la prueba positiva

5.4.2. Muestreo de agua de riego para la determinación de *Vibrio cholerae*.

Se construyeron hisopos de Moore con gasas de algodón (20 cm de ancho, 80 cm de largo), la gasa se dobió varias veces en forma longitudinal hasta formar cilindros compactos atando el centro firmemente con un alambre: éstos se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in^2 durante 15 minutos. Al momento de tomar la muestra, al extremo del alambre se le ató otro para sujetarse en una parte fija del canal, y lograr con ello que el hisopo se mantuviera sumergido a la mitad de la corriente de agua, permaneciendo allí durante 24 horas, después el hisopo se extrajo del agua, se le eliminaron los extremos de alambre e inmediatamente se introdujeron en frascos de boca ancha conteniendo 500 ml de agua peptonada alcalina al 1.0 %. Los frascos conteniendo los hisopos se transportaron al laboratorio dentro de recipientes térmicos a temperatura de 3.0 °C

3.4.2.1 Determinación de *Vibrio cholerae* en agua de riego.

Una vez en el laboratorio, la solución, conteniendo los hisopos se ajustó a pH 9.0 y se incubó a 37.0 °C durante 16 a 18 horas, al cabo de éste tiempo, con ayuda de una asa estéril se tomó una muestra de la superficie de la solución y se sembró en placas con medio TCBS (agar tiosulfato citrato bilis sacarosa) incubándose a 37.0 °C durante 24.0 horas (36, 70)

Las colonias aisladas en el medio TCBS, amarillas, planas, ligeramente convexas y con diámetro aproximado de 2.0 mm son típicas de *V. cholerae*, a estas colonias se les practicaron las pruebas bioquímicas siguientes (36):

- Prueba de oxidasa
- Prueba de catalasa
- Medio MIO
- Descarboxilación de lisina
- Descarboxilación arginina
- Fermentación de carbohidratos
- Prueba de oxidación- fermentación
- Prueba de licuefacción de gelatina
- Reducción de nitratos
- Prueba de citrato
- Reacción de Voges Proskauer
- Prueba de fenilalanina desaminasa
- Reacción de la ureasa
- Prueba de aglutinación en placa con antisueros polivalentes O1

5.5. Serotipificación de *Vibrio cholerae*.

De un cultivo joven (de 18 a 24.0 h) de *V cholerae*, identificado mediante pruebas bioquímicas, se hizo una suspensión en solución salina al 0.99 %, de la cuál se toma una gota y se mezcló en un portaobjetos con una gota de suero polivalente y una gota de cada uno de los dos sueros monovalentes (Ogawa e Inaba), se observó si existe o no aglutinación en cada uno de ellos. La presencia de aglutinación se considera como prueba positiva.

5.6. Muestreo de hortalizas para análisis microbiológico.

Tal como se mencionó en el diseño experimental, las hortalizas se muestrearon en dos etapas. último riego antes de la cosecha y el día de la cosecha, en ambos casos se determinó el contenido de organismos coliformes fecales y se trató de aislar al organismo *V. cholerae*

5.6.1. Muestreo de hortalizas en el último riego antes de la cosecha.

Para el muestreo se fijaron tres puntos en cada parcela: cerca, en medio y lejos del canal, coleccionándose entre 60 a 100 muestras de hortalizas (de acuerdo con la extensión del cultivo), las cuáles se analizaron en forma de muestra compuesta, una parte de éstas se enjuagaron en solución de agua peptonada alcalina estéril al 1.0 %, las otras muestras colectadas se transportaron al laboratorio dentro de bolsas de polietileno para posterior análisis. El agua peptonada se utilizó para la detección de *Vibrio cholerae* y las hortalizas para la determinación de organismos coliformes Fecales

5.6.2. Muestreo de hortalizas el día de la cosecha.

Al momento en que se cosechan las hortalizas, los agricultores someten a éstas a una operación de enjuague la cuál tiene como objetivo remover polvo, tierra, lodo ó residuos químicos (fertilizantes), ésta operación consiste en sumergir y frotar manualmente las hortalizas dentro de tinas con agua proveniente del mismo canal, por lo que dicha "agua de enjuague" se muestreó junto con las hortalizas cosechadas. Agua y hortalizas se transportaron al laboratorio para su posterior análisis

5.6.3. Determinación de organismos coliformes fecales en hortalizas.

Las muestras que se colectaron completas se molieron con ayuda de una picadora marca Moulinex previamente lavada y desinfectada. Se pesaron 100 g de cada hortaliza molida y se efectuaron diluciones, con solución salina estéril al 0.99%, desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , posteriormente se determinó el contenido de organismos coliformes fecales por el método del nmp. de acuerdo a la técnica descrita en la página 56

5.6.4. Determinación de *Vibrio cholerae*.

En cuanto los frascos conteniendo el agua peptonada alcalina se transportaron al laboratorio, se incubaron a 37 ± 1.0 °C durante 16 a 18 horas. Al cabo de este tiempo, se tomaron varias asadas de la superficie de la solución y se inocularon en tubos conteniendo 9.0 ml de agua peptonada alcalina al 10 % se

incubaron a 37 ± 1.0 °C durante 6.0 horas, transcurrido este tiempo, se tomó una asada de la superficie de cada tubo y se sembró en placas con Medio TCBS, se incubaron a 37 ± 1.0 °C durante 24.0 horas

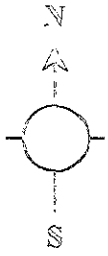
Las colonias aisladas en las placas amarillas, planas, ligeramente convexas y con diámetro aproximado de 2.0 mm, se sembraron en placas con medio 3H1 (agar infusión cerebro corazón) y se incubaron a 37 ± 1.0 °C durante 24.0 horas, a las colonias crecidas en éste medio se les practicaron las pruebas bioquímicas y serológicas descritas en las páginas 58 – 59

5.7. Cinética de desinfección.

El propósito de haber llevado a cabo esta determinación, fue la de obtener algunos de los datos que necesitamos conocer para poder hacer el diseño del clorinador. Para la cinética de desinfección se requieren conocer tres parámetros, pH óptimo en el que se obtiene la máxima acumulación de cloro residual, concentración óptima de cloro en la cuál se obtiene el punto de quiebre y tiempo de contacto óptimo en donde se produzca la muerte de todos los microorganismos presentes. La metodología llevada a cabo se presenta en el apéndice

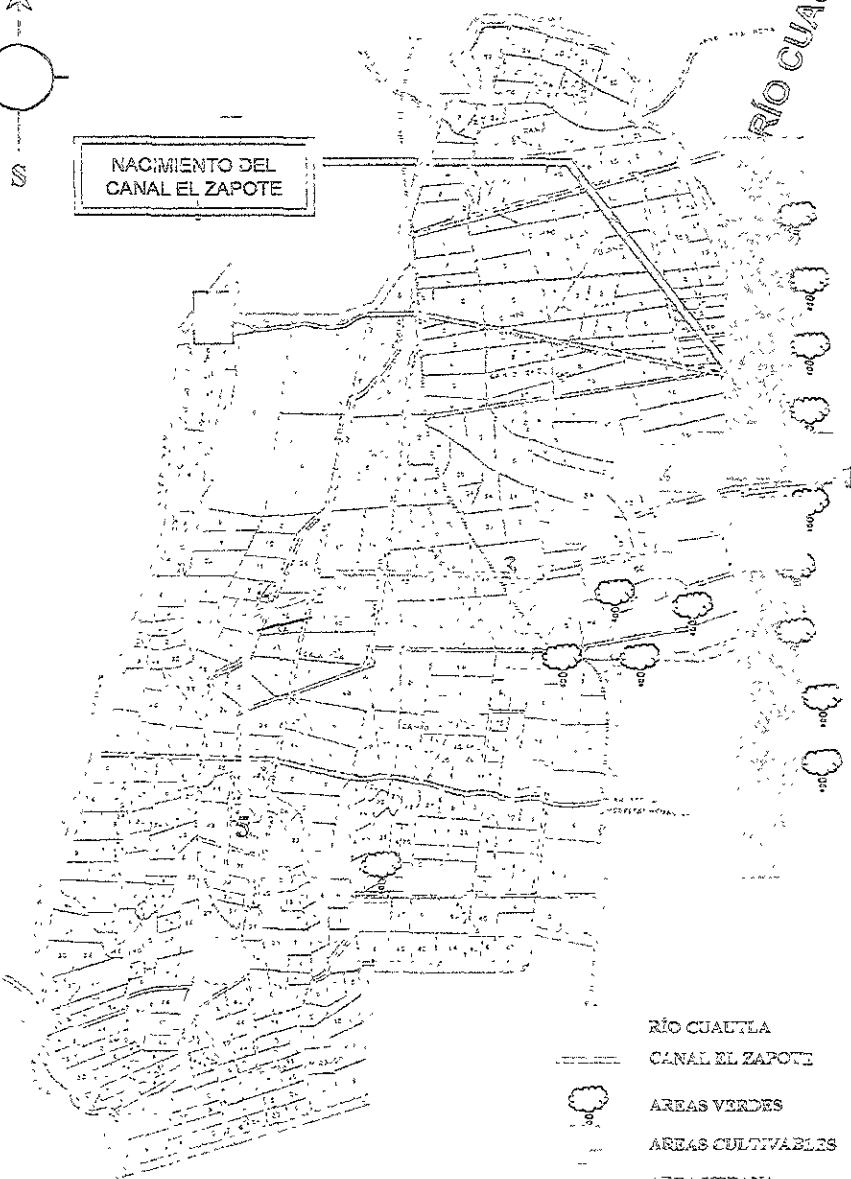
MAPA 1

ÁREA DE ESTUDIO



NACIMIENTO DEL
CANAL EL ZAPOTE

RÍO CUAUTLA



- RÍO CUAUTLA
- CANAL EL ZAPOTE
- ☁ AREAS VERDES
- - - AREAS CULTIVABLES
- AREA URBANA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

1.1 Valoración microbiológica del agua de riego.

Los resultados se expresaron de acuerdo a los objetivos planteados en el trabajo.

La cantidad de coliformes fecales depende del sitio de muestreo; siendo los sitios más contaminados el 2, 3 y 4, y los menos contaminados el 1 y 5. En el Cuadro 1 se reportan los valores promedio de 35 muestreos realizados al agua de riego en un periodo de siete meses

Cuadro 1. Contenido promedio de organismos coliformes fecales y temperatura en los diferentes sitios de muestreo.

Sitio de muestreo	Temperatura (° C)	UFC coliformes fecales/ 100 ml	Aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i>
1	24.4	5375	Negativo
2	24.6	20×10^5	Negativo
3	24.8	54×10^5	Positivo
4	26.5	60×10^5	Positivo
5	27.1	14×10^4	Negativo

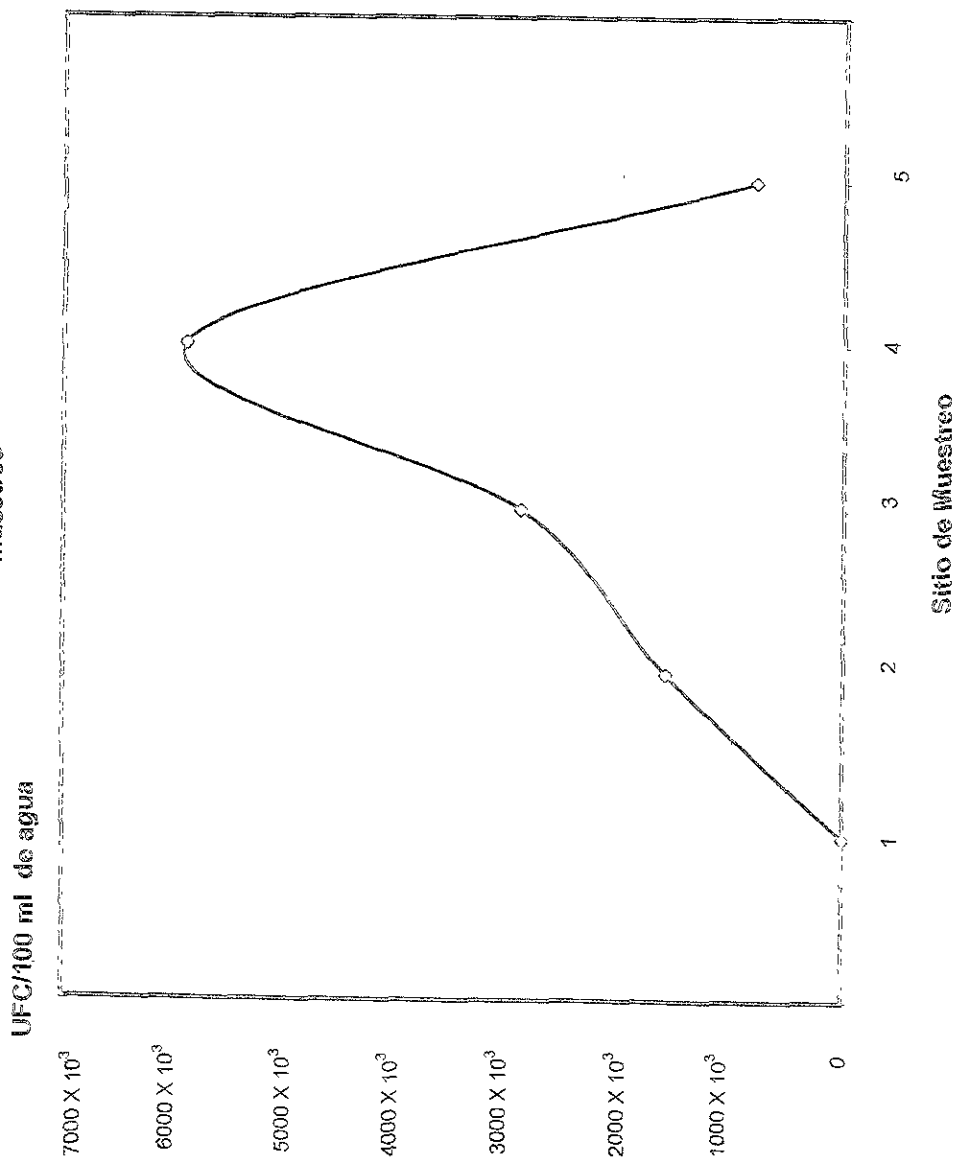
Temperatura de incubación 37 ± 2 °C
Tiempo de incubación 24 h

La determinación de organismos coliformes fecales se expresó en UFC/100 ml de agua. Nótese que en los sitios 2, 3, y 4 se presenta la mayor carga microbiana, destacando el sitio 4, seguido del 3 y 2. Estos resultados están dentro de lo esperado ya que considerando lo mencionado en la zona de estudio, el sitio 4 se encuentra en una área poco poblada en donde la alta contaminación es el resultado de los desechos provenientes de las granjas que se encuentran a la orilla del canal y que carecen de drenaje. Mientras que en los sitios 2 y 3 el canal pasa por áreas conurbadas en donde algunas de las viviendas que se encuentran ubicadas a lo largo del canal carecen de drenaje y sus sanitarios se encuentran instalados sobre él.

Es lógico que los sitios 1 y 5 sean los menos contaminados, no hay que olvidar que el sitio 1 se fijó unos cuantos metros después del nacimiento del río Cuautla y el sitio 5 es donde prácticamente termina el canal (ver Mapa 1).

El comportamiento gráfico de los valores promedio de UFC de coliformes fecales/100 ml agua, en función del sitio de muestreo se presentan en la Gráfica 1, en donde se aprecia con mayor claridad el grado de contaminación en cada sitio analizado.

Gráfica 1. Valores promedio UFC de organismos coliformes fecales en los diferentes sitios de muestreo



6.2. Análisis estadístico.

Para confirmar si efectivamente existen diferencias entre el contenido de microorganismos coliformes fécales y el sitio de muestreo, se utilizó un programa estadístico para el cálculo de parámetros estadísticos así como se realizó un análisis de variancia con todas las determinaciones de UFC/100 ml de agua practicados en los diferentes sitios de muestreo con un nivel de significancia de 0.05

Los resultados presentados en el apéndice 8.26 nos indican que efectivamente existen diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de UFC coliformes fécales/100 ml de agua en los diferentes sitios de muestreo

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de los 8 muestreos tomados durante siete meses del año, de enero a julio, en donde se aprecia que existen variaciones tanto en los diferentes sitios como en los diferentes meses estudiados, al mismo tiempo se confirma que los sitios más contaminados son el 3 y 4, aunque en el muestreo realizado en el mes de mayo, el sitio 5 es el que presenta la mayor carga microbiana (11×10^6 UFC coliformes fécales /100ml de agua). Esto parece contradictorio con lo comentado anteriormente, sin embargo es importante enfatizar que en las condiciones ambientales bajo las cuáles se llevaron a cabo los muestreos, existen múltiples factores que pueden influir en los resultados registrados, tales como que al momento de la toma de muestra el canal recibiera descargas fecales humanas y/o animales, o que el agua fuera contaminada con basura ó materia orgánica provenientes del lavado de alguna de las granjas que se encuentran a la orilla del río, etc De hecho se ha reportado que la variación en el contenido de UFC de coliformes fécales puede ser el reflejo de cambios en la

Cuadro 2. Determinación de UFC fecales/100 ml de agua, durante 7 meses del año, en diferentes sitios de muestreo.

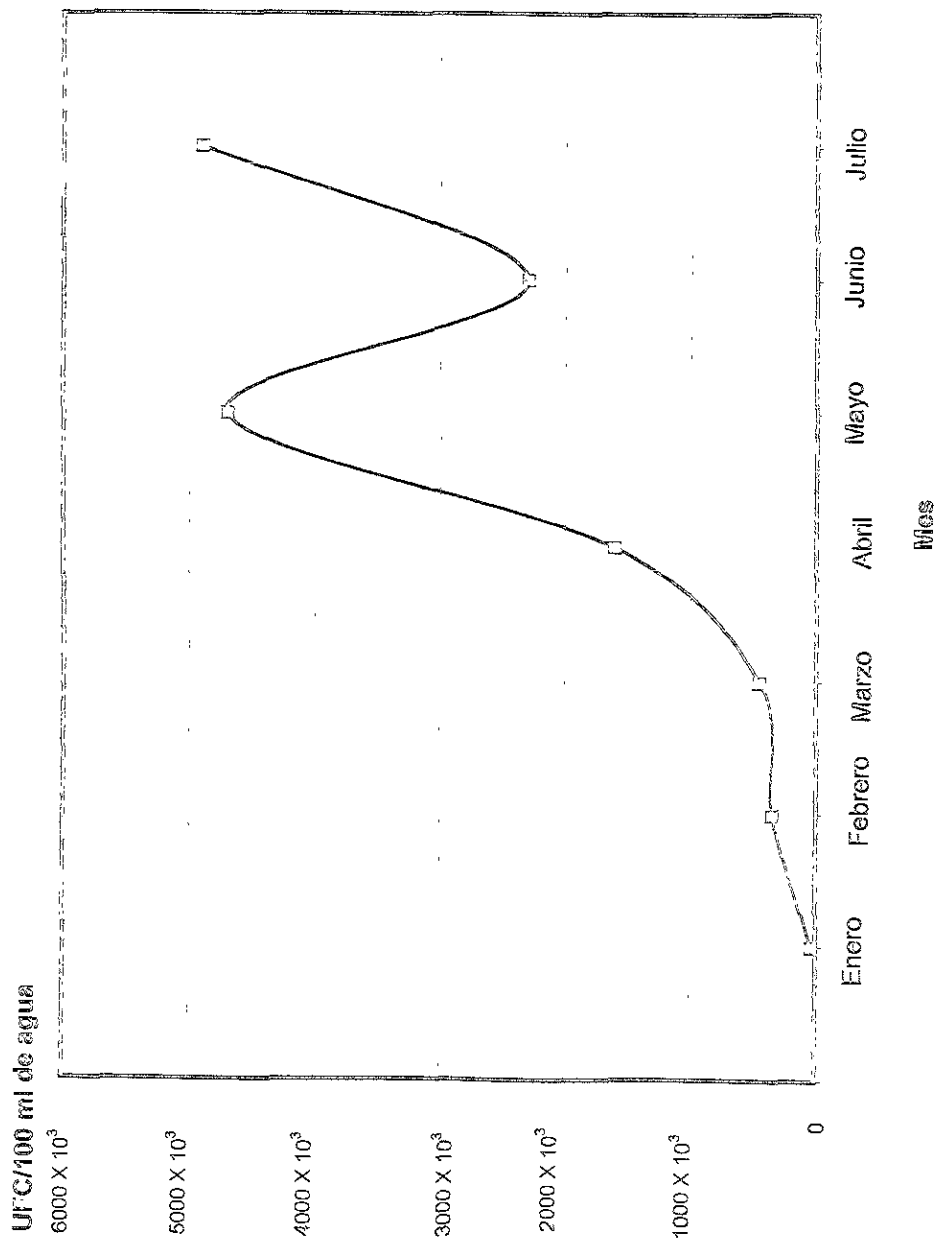
Sitio	UFC/100 ml de agua	pH	Temperatura (°C)	Mes
1	5×10^3	8.0	23.0	ENERO
2	14×10^3	8.0	23.0	
3	20×10^3	8.0	24.0	
4	12×10^4	8.0	24.0	
5	23×10^3	8.0	24.0	
1	7×10^3	8.0	22.0	FEBRERO
2	15×10^4	8.0	24.0	
3	7×10^5	8.0	23.0	
4	9×10^5	8.0	23.0	
5	4×10^3	8.0	24.0	
1	7×10^3	8.0	23.0	MARZO
2	4×10^4	8.0	23.0	
3	15×10^5	8.0	23.0	
4	7×10^5	8.0	27.0	
5	4×10^4	8.0	31.0	
1	3×10^3	8.0	24.0	ABRIL
2	11×10^4	7.0	23.0	
3	39×10^5	8.0	23.0	
4	43×10^5	7.0	27.0	
5	7×10^4	8.0	25.0	
1	4×10^3	8.0	24.0	MAYO
2	93×10^4	7.0	25.0	
3	23×10^5	8.0	26.0	
4	93×10^5	7.0	30.0	
5	11×10^6	7.0	29.0	
1	4×10^3	8.0	26.0	JUNIO
2	46×10^4	8.0	26.0	
3	21×10^5	7.0	28.0	
4	93×10^5	7.0	25.0	
5	4×10^3	7.0	29.0	
1	4×10^3	8.0	26.0	JULIO
2	100×10^5	7.0	26.0	
3	100×10^5	7.0	28.0	
4	43×10^5	7.0	27.0	
5	43×10^4	7.0	28.0	

concentración del efluente así como de la cantidad y de la distancia de descarga de la materia orgánica (17)

Con respecto a los diferentes meses del año, en el Cuadro 3 se presentan los valores promedio de organismos coliformes fecales, y temperatura en los diferentes meses del año estos valores son el resultado de los promedios del Cuadro 2. En los meses de enero, febrero y marzo, no se registraron cambios significativos en el contenido de microorganismos, el incremento microbiano se observa a partir del mes de abril, mientras que en mayo, junio y julio, se encontró el más alto contenido de microorganismos coliformes fecales, esto se aprecia mejor en la Gráfica No. 2 en el cuál destaca el mes de julio como el más contaminado

Analizando el Cuadro 3 en el que se representan los valores promedio de UFC coliformes fecales/100ml de agua y el promedio de la temperatura registrados en cada muestreo a lo largo del año se aprecia de manera más clara lo comentado anteriormente, que fueron los meses de mayo junio y julio en los que se presentó el contenido microbiano más elevado, asimismo pudieran las condiciones climatológicas presentadas a lo largo del año afectar el contenido de microorganismos ya que según el mes del que se trate serán las características del canal, por ejemplo enero febrero y marzo son meses secos y con un bajo nivel de agua es decir, el volumen de agua en el canal disminuye de un 5 a un 8%, por falta de lluvias, mientras que en abril, que es época de estiaje, se presenta el periodo de sequía, consecuentemente, la disminución de agua en el canal es hasta de un 15%, mientras que en mayo, junio y julio el volumen de agua se incrementa hasta en 40%, esto se debe a que caen las primeras lluvias del año en las zonas altas del

Gráfica 2. Promedio de UFC coliformes fecales en agua de riego en diferentes meses del año.



Estado de Morelos, de tal manera que para julio prácticamente todos los días llueve

De acuerdo a lo anterior, hipotéticamente se tendrían los más altos grados de contaminación en los meses de enero, febrero, y marzo y que fuera disminuyendo gradualmente en los meses de abril, mayo, junio y julio, sin embargo, al observar el Cuadro 3 tal situación no se presentó la explicación a los resultados obtenidos es la falta de lluvias ó bien que éstas fueron esporádicas.

El hecho de no haber podido probar estadísticamente los cambios en la concentración de coliformes fecales respecto al mes se debió a falta de repeticiones ya que las llevadas a cabo no fueron suficientes aún cuando en forma general en el Cuadro 3 se puedan apreciar estas diferencias, el análisis estadístico dice lo contrario.

Los microorganismos coliformes fecales cuantificados, Cuadro 2, pudieran no estar asociados a problemas del tracto gastrointestinal, sin embargo dentro de este grupo puede haber bacterias que alteren el balance ecológico y patógenos que causen daños a la salud como *V. cholerae* u otros, que en este caso, es el que interesa aislar e identificar para dar cumplimiento al objetivo # 4.

Cuadro 3. Promedio de organismos coliformes fecales y temperatura en los diferentes muestreos realizados durante 7 meses del año.

Temperatura (°C)	Organismos Coliformes (UFC/100 ml H ₂ O)	Mes
23.4	35 X 10 ³	Enero
23.2	35 X 10 ⁴	Febrero
25.4	45 X 10 ⁴	Marzo
24.4	16 X 10 ⁵	Abril
26.8	47 X 10 ⁵	Mayo
26.8	69 X 10 ⁵	Junio
27.0	49 X 10 ⁵	Julio

Temperatura de incubación $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Tiempo de incubación 24 h.

El hecho de que en el agua de riego se detecten cantidades apreciables de organismos coliformes como indicadores de contaminación fecal significa que existe la posibilidad de que el agua del canal sea un vehículo para la transmisión del cólera, y es precisamente este gran número de microorganismos coliformes fecales los

que resultan de interés en el estudio ya que es donde existe la posibilidad de aislar e identificar a la bacteria

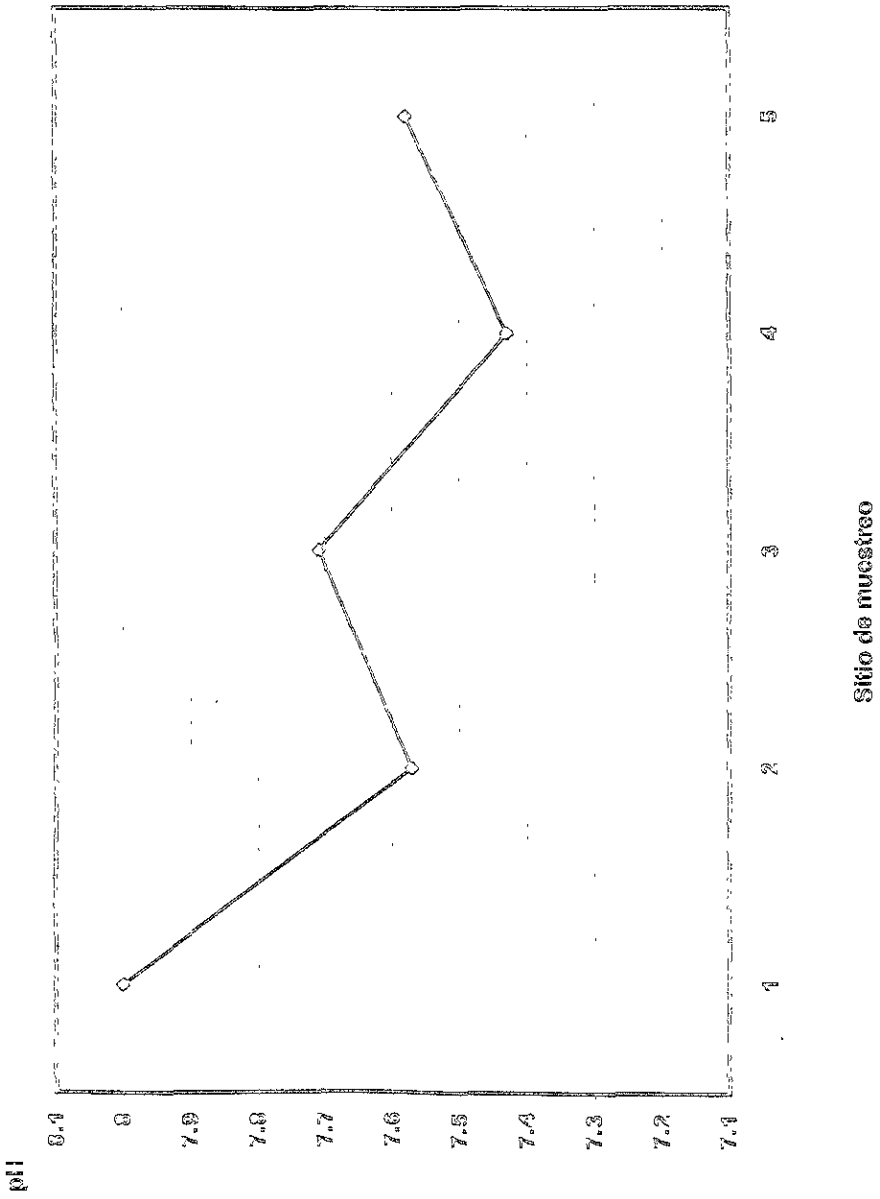
El estado fisiológico de *Vibrio cholerae* puede ser afectado por múltiples condiciones ambientales (tales como son la luz solar, temperatura, salinidad, la concentración de nutrientes orgánicos, la concentración de oxígeno disuelto, pH, características propias del canal tales como la profundidad, el volumen, etc (10,49,53,80,81,86)

Respecto a las temperaturas y pH registradas en los diferentes sitios, Gráficas 3 y 4, estos a pesar de no encontrarse dentro de los valores óptimos de crecimiento para *V. cholerae* (pH 8 –9 y T = 25°C) son condiciones favorables aún para el crecimiento de la bacteria (temperatura de 20 a 35 °C y pH de 6 a 8) por lo que sólo bastan pequeñas concentraciones de materia orgánica fecal contaminada con este microorganismo para su desarrollo (46). Así mismo, se puede apreciar en la Gráfica 5, que las más altas temperaturas se registraron en las estaciones de primavera-verano, y en los sitios 3,4, y 5 Gráfica 4, esto coincide con los incrementos en el contenido de microorganismos fecales.

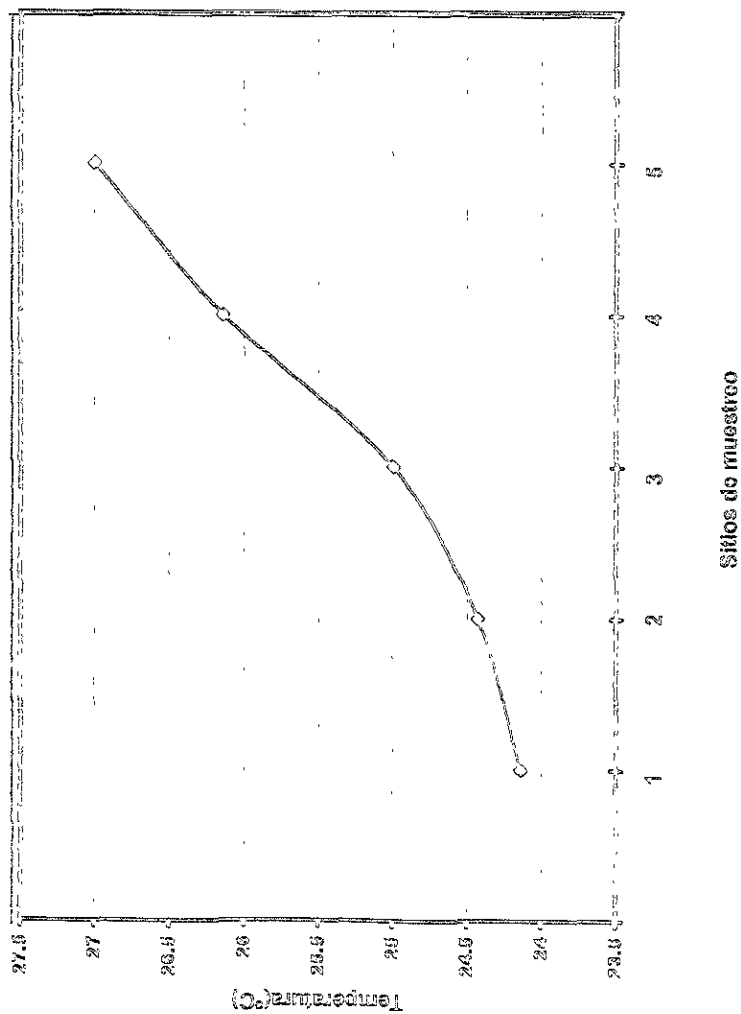
6.3. Valoración fisicoquímica del agua de riego.

Cabe destacar lo reportado por Xu y Col (132), en donde establece que a pesar de ser muchos los factores que afectan el crecimiento de la bacteria la temperatura del agua es quizás el principal factor que determina la sobrevivencia de *V. cholerae* en agua de ríos y mares.

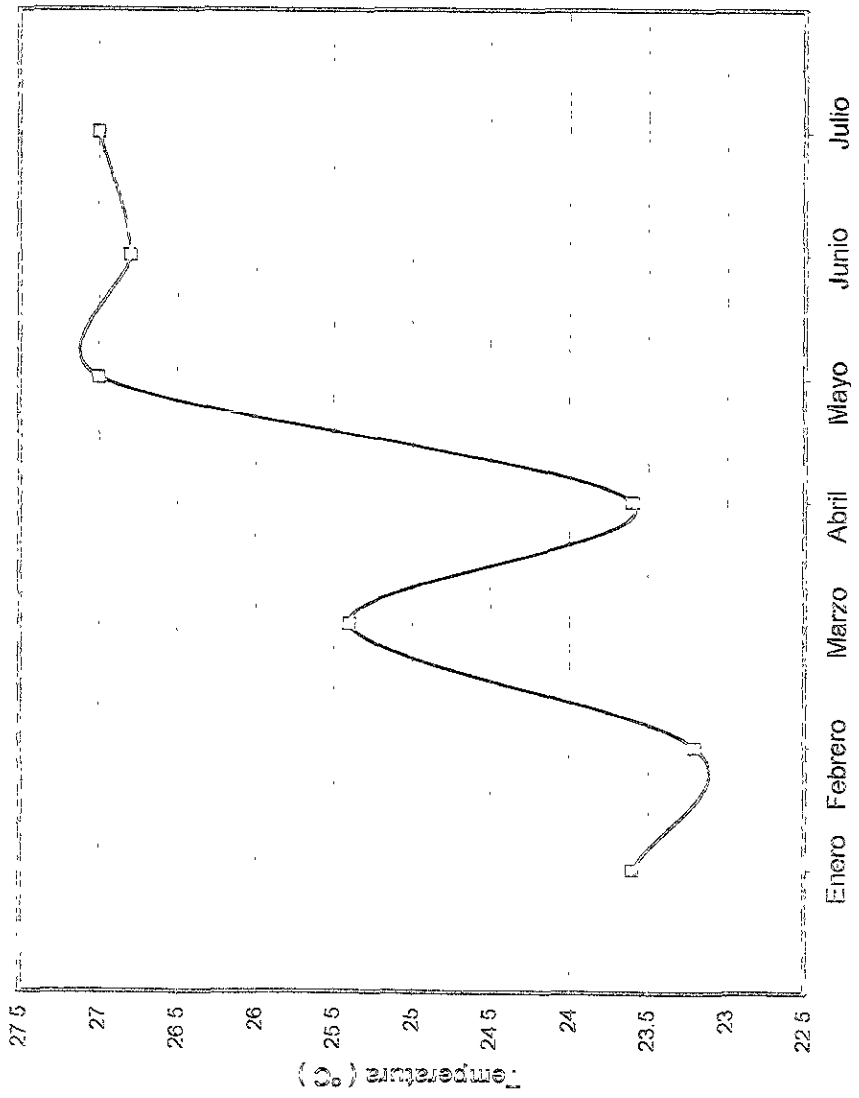
Gráfica 3. Valores promedio de pH del agua de riego en los diferentes sitios de muestreo



Gráfica 4. Valores promedio de la temperatura del agua utilizada en el riego de hortalizas en los diferentes sitios de muestreo.



Gráfica 5 Valores promedio de temperatura del agua de riego en diferentes meses del año.



En cuanto al pH, se encuentra en un rango de 7.0 a 8.0 en los diferentes sitios de muestreo, Cuadro 2, Gráfica 3, por lo que el impacto causado por cambios en este parámetro son mínimos, otras variables que alteran la sobrevivencia de la bacteria son la profundidad y el área del canal; Roberts (65) define que estos parámetros influyen en el contenido de bacterias entéricas, y que a mayor profundidad mayor contenido de microorganismos, hecho que en la investigación no se pudo confirmar debido a que el Canal el Zapote, es no estratificado, lo cual se discutirá posteriormente, es decir, no tiene zonas de remanso ó zonas lénticas en las cuáles se acumulen diferentes cantidades de sólidos sedimentables en un mismo sitio, en el Cuadro 4 se pueden ver las diferencias en área y profundidad en cada sitio, así como también el contenido de coliformes fecales. los datos registrados en el contenido de microorganismos no son atribuibles a las diferencias en los valores de estos parámetros sino a los ya comentados como son: el sitio de muestreo, el pH, la temperatura, las condiciones climatológicas; si el contenido microbiano se hubiese visto afectado por la profundidad, se esperaría tener una mayor carga microbiana en los sitios 1, 3 y 4 que son los que tienen mayor profundidad y la menor en el sitio 2, hecho que no fue así por no ser un canal estratificado.

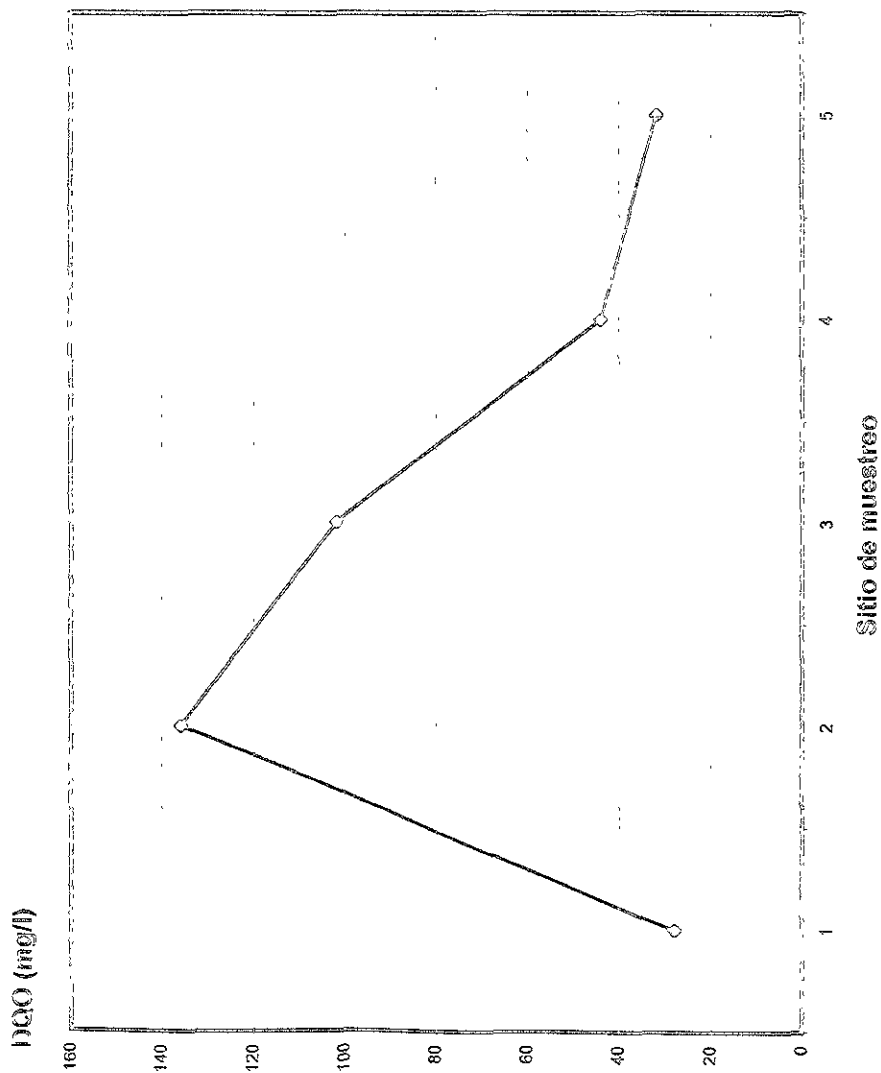
Cuadro 4. Efecto del área y profundidad del canal sobre el crecimiento de organismos coliformes fecales en diferentes sitios.

Sitio	Ancho (m)	Profundidad (m)	UFC Coliformes Fecales /100 ml. de agua
1	1.48	0.41	5375
2	1.60	0.20	20×10^5
3	0.85	0.80	54×10^5
4	1.40	0.32	60×10^5
5	1.55	0.25	14×10^4

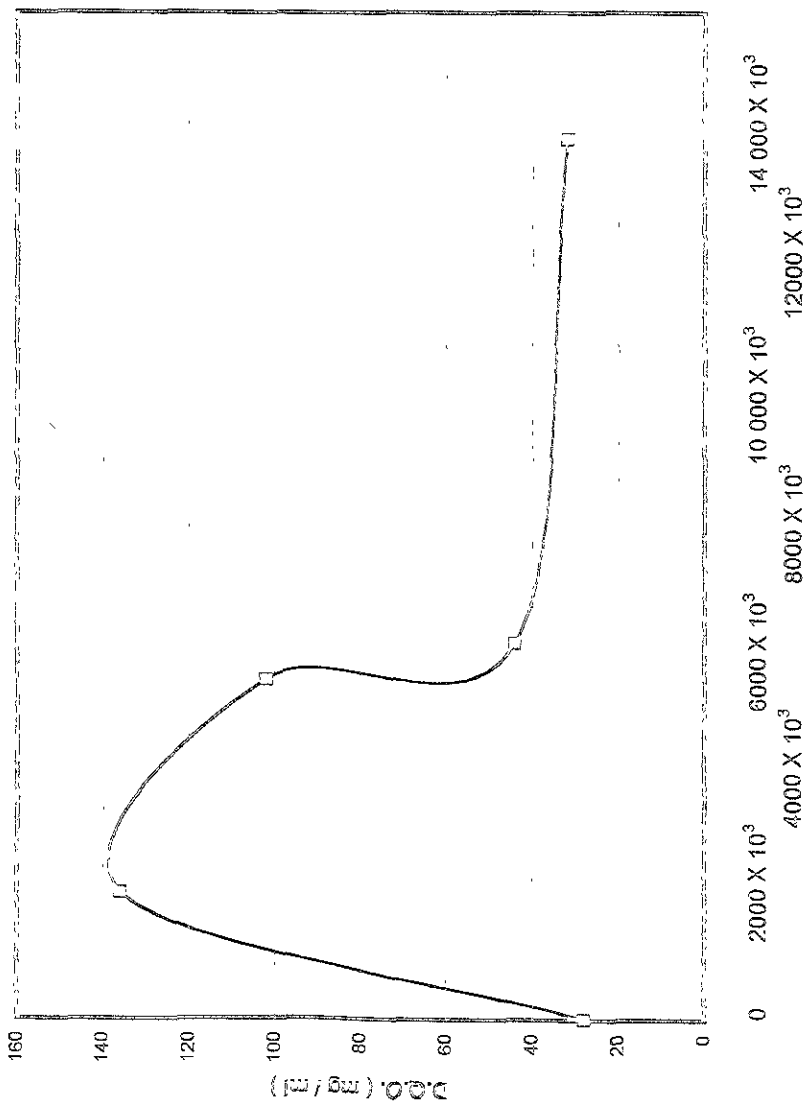
Los resultados de la DQO, se muestran en el Cuadro 5. Es evidente que la mayor concentración de materia orgánica se presenta en los sitios 2, 3 y 4 seguidos del 5 y por último el 1, con estos resultados se esperaría tener la mayor contaminación siguiendo la secuencia establecida de acuerdo a la literatura a mayor DQO mayor carga microbiana (73,74), según lo anotado en el Cuadro 1 los puntos más contaminados fueron 3 y 4 siguiendo el 2, 5 y por último el 1, la interpretación a estos resultados es que son múltiples los factores que interactúan en la concentración de microorganismos presentes y estos se deben analizar e interpretar en conjunto, de esta forma, se puede decir que se confirma que los sitios 2, 3 y 4 son los más contaminados seguidos por el 5 y 1, Gráficas 6 y 7. Los resultados, además de permitir relacionar la cantidad de materia orgánica con el contenido microbiano en los diferentes sitios de muestreo, ayudan a confirmar que efectivamente, la zona de estudio es no estratificada ya que los valores de DQO no cambian bruscamente de un sitio a otro a diferencia de cuando se trata de zonas estratificadas el parámetro que se ve más afectado es precisamente la Demanda Química de Oxígeno (69,70).

Cuadro 5. Demanda Química de Oxígeno en el agua proveniente de los Diferentes sitios de muestreo.

Sitio de Muestreo	Demanda Química de Oxígeno (DQO) mg/lml
1	28
2	136
3	102
4	44
5	32



Gráfica 7. Relación de la demanda química de oxígeno y UFC de coliformes fecales.



UFC coliformes fecales/100 ml de agua

3.4. Valoración microbiológica en hortalizas

Ctro de los análisis realizados en este trabajo y que fue planteado como objetivo # 2 es el recuento de organismos coliformes fecales en hortalizas en las diferentes etapas de cultivo, es decir primera (último riego antes de la cosecha) y segunda etapa (al momento de la cosecha), así como también se presentan los meses en que fueron analizadas las diferentes hortalizas y el sitio en el que se encontraban cada una de éstas, (Cuadro 6), en los sitios 1 y 5 no se pudo evaluar el contenido de UFC de coliformes fecales por tener cultivos diferentes a los de interés para nuestro estudio como son. caña, arroz, frijol, maíz, etc y realmente no existe ninguna restricción en su cultivo.

Es importante mencionar que todos los cultivos estudiados se riegan por surco; a excepción del berro que es por inundación; las hortalizas que presentan la mayor carga microbiana antes de la cosecha en el sitio 2, son: epazote con 2800 UFC/ g; cilantro, 3900 UFC/ g; pápalo y acelgas 4300 UFC/ g; lechuga, 5800 UFC/ g, rábano 7500 UFC/ g; y el de menor carga fue la yerbabuena con 2100 UFC/ g, dentro de los factores que afectan el contenido de microorganismos se encuentran la concentración de materia orgánica, temperatura, la actividad de agua, el tipo de piel y forma de la hortaliza. Por ejemplo la lechuga, ya que se trata de hojas, tiene una mayor actividad acuosa y conserva una mayor temperatura que otras hortalizas cultivadas en el mismo sitio, por esta razón a pesar de haberse cultivado en abril mes en el que se registró una menor carga microbiana comparado con mayo, junio y julio el número microorganismos cuantificados fue mayor, que en las acelgas, la

yerbabuena, el epazote, etc., a excepción del rábano que presentó la mas alta contaminación debido al tipo de cultivo ya que éste crece bajo la tierra.

Cuadro 6 Determinación de organismos coliformes fecales en hortalizas en diferentes etapas de cultivo.

Hortaliza	Sitio	Último riego (mes)	1ª Etapa (UFC/g hortaliza)	2ª Etapa (UFC/g hortaliza)	Día de corte
Berro	1	Febrero	1500	2100	Todo el tiempo
Epazote	2	Junio	2800	3900	3 días después
Pápalo	2	Mayo	4300	6400	38 días después
Cilantro	2	Julio	3900	6400	10 días después
Aceiga	2	Julio	4300	7500	10 días después
Yerbabuena	2	Enero	2100	3900	3 días después
Rábano	2	Mayo	5800	9300	12 días después
Lechuga	2	Abril	2800	4300	10 días después
Calabaza	4	Enero	1100	2000	8 días después
Pepino	4	Marzo	6400	2100	15 días después

Temperatura de incubación $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Tiempo de incubación 24 h.

Como se puede observar en el Cuadro 6, los meses en los que se encontraron las hortalizas más contaminadas fueron mayo, junio y julio, mientras que en enero y febrero es menor. sobre éstos resultados influyeron dos parámetros, el primero es la característica del sitio de muestreo y el tipo de hortaliza, por ejemplo en el sitio 1 las tierras de cultivo estaban sembradas con berro y estos a pesar de regarse por inundación tienen una carga microbiana menor (1500 UFC coliformes fecales/g hortaliza) que los cultivos regados por surco, estos resultados parecerían contradictorios si consideramos que el berro se encuentra durante todo su cultivo en contacto directo con el agua a diferencia de las otras hortalizas muestreadas que se riegan por surco, de esto se deduce que las características de la zona donde se

encuentren ubicadas las hortalizas. determina el grado de contaminación, y es precisamente en el sitio 1 en donde el agua se encuentra mas limpia, mientras que las hortalizas cultivadas en el sitio 4. en donde el pepino es el que presenta la mayor carga microbiana comparadas con la calabaza y es porque durante su crecimiento tiene contacto directo con el suelo y que a diferencia de la calabaza esta se cultiva mediante el uso de espalderas es decir no está en contacto con el suelo.

Al comparar el contenido de microorganismos en la segunda etapa de la cosecha, el muestreo realizado el día del corte, con una diferencia en el último riego de 3 a 38 días según el tipo de cultivo del que estemos hablando, Cuadro 6, es evidente que las UFC coliformes fecales/g de hortaliza se incrementa considerablemente en todos los cultivos, esto es resultado de las malas practicas de lavado que realizan los agricultores el día de la cosecha, ya que para eliminar la tierra de los diferentes productos, éstas se enjuagan sumergiéndolas en tinas de agua tomada del mismo canal, ya que ésta no se cambia, frecuentemente el agua de las tinas llega a estar mas sucia que el agua del mismo canal, siendo esta la causa por el que el contenido de microorganismos sea más alto en la segunda que en la primera etapa de la cosecha; en cuanto al berro, la carga microbiana es mayor ya que se cultiva bajo inundación, y al momento de cortarlo, el agua se agita revolviéndose y levantando lodo; en el caso del pepino se encuentra más contaminado en la primera etapa (6400 UFC coliformes fecales/g) que en la segunda (2100 UFC coliformes fecales/g); la disminución en el contenido de microorganismos es fácil de entender ya que precisamente con el lavado le quitan una gran cantidad de tierra proveniente del contacto con el suelo.

De acuerdo a lo registrado en nuestros resultados hasta el momento el grado de contaminación cuantificado tanto en el agua de riego como en las hortalizas es muy alto, mayor de 100 000 UFC coliformes fecales/100 ml de agua, que es lo establecido en la norma. De este grupo de microorganismos el de mayor importancia en nuestro estudio es *V. cholerae* ya que de acuerdo a la bibliografía, esta bacteria es un organismo nativo del ambiente acuático por lo que el agua de pozos, lagunas y ríos que sirven como fuentes de agua para beber o en el riego agrícola pueden ser fuentes de infección y transmisión (7, 111), y por ende todo lo que se riega con ellas también se va a contaminar, siempre y cuando cumpla con ciertas condiciones para el crecimiento y desarrollo, del microorganismo.

Al mismo tiempo que se cuantificó el contenido microbiano en agua y hortalizas, se realizaron pruebas para el aislamiento de *V. cholerae*, las cuales se mencionan en el Diagrama 1, logrando con esto cubrir parte del objetivo #. 4, ya que pudimos aislarlo e identificarlo en el agua de riego no así en las hortalizas. El aislamiento de *Vibrio cholerae* realizado en el mes de junio en los sitios 3 y 4 Cuadro 7, los cuales como ya mencionamos fueron las zonas más contaminadas registradas en ese muestreo (21×10^5 y 93×10^5 UFC coliformes fecales/100 ml agua), las condiciones del agua en ese ambiente fueron temperatura, 28 °C, para el sitio 3 y 25°C para el sitio 4, y pH de 7 para ambos sitios.

Cuadro 7. Sitios de aislamiento de *Vibrio cholerae* en diferentes meses del año.

Sitio de muestreo	Aislamiento de <i>V. cholerae</i>	Mes
1	Negativo	-----
2	Negativo	-----
3	Positivo	Junio
4	Positivo	Junio
5	Negativo	-----

El microorganismo aislado e identificado fue *Vibrio cholerae* El Tor serotipo O1 biotipo Ogawa. La detección de la bacteria coincidió con los brotes de cólera registrados en la comunidad y que fueron reportados por el INDRE (75,76).

La presencia de *V. cholerae* junto con el alto contenido de microorganismos coliformes fecales puede alterar el balance ecológico de cualquier cuerpo de agua (47), así como también causar daños a la salud o como en el caso de estudio, afectar socioeconómicamente a cientos de familias de agricultores cuyos ingresos dependen precisamente de la actividad hortícola, si de hecho por el tipo de agua presente en cada uno de los sitios de muestreo: sitio 1 tipo 3, sitio 2,3,4 y 5, tipo 4 (Tabla 4) está totalmente justificado la prohibición de los cultivos de hortalizas, al detectar a la bacteria el problema se agrava aún más.

El hecho de no aislar a la bacteria en todos los sitios de muestreo ni en todos los meses del año, no descarta su presencia, ya que según los reportes, la sobrevivencia de *V. cholerae* O1 en ambientes acuáticos depende de un gran número de variables tales como salinidad, temperatura, pH, cantidad de materia

orgánica, luz solar concentración de sales, la concentración de oxígeno disuelto, competencia con la microflora, presencia de sustancia que absorben la luz solar como por ejemplo. ácido húmico que se encuentra presente en el agua, absorbiendo rayos UV y protegiendo a la célula de posibles daños en el DNA u otras variaciones naturales asociadas con la estación, clima, ó geografía (7, 14, 17, 47, 111, 112, 120) Cuando estas condiciones de crecimiento llegan a ser desfavorables, *V. cholerae* se encuentra en un estado viable pero no cultivable esto significa que no produce signos visibles de crecimiento que son los estamos acostumbrados a ver cuando se utilizan métodos tradicionales de aislamiento, identificación y recuento, que fueron los utilizados en nuestro estudio (6, 17,131). Todo parece indicar que este estado viable pero no cultivable es una estrategia de sobrevivencia adoptada no solo por *V. cholerae* sino también por otras especies Gram Negativas (139)

Respecto al aislamiento de *V. cholerae* en las diferentes hortalizas a pesar de que no fue aislada en ninguna de ellas, no se descarta su presencia ya que la habilidad de la bacteria para crecer en alimentos depende de su resitencia a numerosos factores tales como, pH de alimento, nivel de carbohidratos, presencia de materia orgánica humedad, actividad acuosa, el tipo de piel y forma del vegetal.

Aunque aparentemente no se detectó la presencia de la bacteria en ninguna de las hortalizas muestreadas, el riesgo de que los consumidores de éstas sufran de enfermedades gastrointestinales existe, debido al alto contenido de organismos coliformes fecales, de aquí la importancia de realizar una buena desinfección de

estas antes de consumirlas (ya que como podemos darnos cuenta, este tipo de hortalizas normalmente se consumen crudas y completas).

En el Cuadro 8 se presenta la morfología colonial utilizada en el aislamiento de *V. cholerae*, se separaron todas aquellas colonias que presentaban en TCBS la morfología colonial descrita, es decir colonias amarillentas, de 1.5 a 2.0 mm de diámetro, forma circular con bordes enteros, colonias brillantes de aspecto húmedo y de consistencia mucóide.

Las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de la bacteria se muestran en el Cuadro No 9; como podemos observar, se aislaron dos colonias sospechosas de cólera "A" y "B". Las pruebas necesarias para la identificación inicial fueron: catalasa, oxidasa, ornitina, MIO y LiA y las subsecuentes pruebas secundarias. Los resultados obtenidos se compararon con los registrados por Bergey's, en donde todo parece indicar que las colonias aisladas pertenecen a *V. cholerae* por lo que se realizaron pruebas serológicas las cuáles son más específicas en la confirmación ya que no quisimos pasar por alto los trabajos de Jawetz en el cuál comenta que las especies ambientales presentan ciertas dificultades para su identificación por su gran diversidad bioquímica ya que producen cambios constantemente en su taxonomía dando como resultado confusión en la identificación de cepas ambientales a diferencia de cepas aisladas de casos clínicos que presentan características más estándares.

Desde el punto de vista microbiológico, el agua no cumple con la Norma Técnica Ecológica establecida para aguas de riego agrícola; por lo que se realizaron análisis físicos y químicos y se compararon con los Acuerdos de Criterios Ecológicos de Calidad del Agua en la que se establecen los límites máximos permisibles de

parámetros físicos y químicos de las aguas residuales de origen urbano y municipal que se utilizan en el riego agrícola, Cuadro 10. Los valores de los diferentes parámetros analizados están por debajo de los establecidos, es decir la calidad del agua es bastante buena por lo que solo basta darle solución al problema microbiológico para que cumpla con la norma establecida.

Cuadro 8. Morfología colonial de las 2 cepas de *V. cholerae* durante los meses de mayo y junio en los sitios 3 y 4.

Característica	Morfología
Tamaño	De 1.5 a 2.00 mm de diámetro
Color	Amarillo
Forma	Circular
Elevación	Plana, ligeramente convexa
Aspecto	Húmedo
Bordes	Enteros
Luz Reflejada	Brillante
Consistencia	Mucosoide

Cuadro 9. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *Vibrio cholerae*.

Prueba	Cepa A	Cepa B	Datos de Bergey's
Morfología	Bacilo corto curvos	Bacilo corto Curvos	Bacilo corto curvos
Gram	Negativo	Negativo	Negativo
Motilidad	Positivo	Positivo	Positivo
Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo
Desc de Lisina	Positiva	Positiva	Positiva
Desc. de Ornitina	Positiva	Positiva	Positiva
Licuefacción de Gelatina	Positiva	Positiva	Positiva
TSI	Ácido- Ácido Sin Gas Sin H ₂ S	Ácido- Ácido Sin Gas Sin H ₂ S	Ácido- Ácido Sin Gas Sin H ₂ S
Oxidación / Fermentación	Positivo, sin gas	Positivo, sin gas	Positivo, sin gas
Lactosa	Positivo	Positivo	Positivo
Sacarosa	Positivo	Positivo	Positivo
Glucosa	Positivo	Positivo	Positivo
Manitol	Positivo	Positivo	Positivo
VP	Negativa	Negativa	Negativa
RM	Positivo	Positivo	Dudosa
Arginina	Negativa	Negativa	Negativa
Urea	Negativa	Negativa	Negativa
Fenilalanina	Negativa	Negativa	Negativa
Citrato	Positiva	Positiva	Dudosa

Fuente: Baumann P., Shubert R. H. W. Bergey's Manual of Systematics Bacteriology. Vol. I. Edited by N.R.Krieg, J.G. Holt Williams and Wilkins. Baltimore, 1984 PP. 516- 550.

Temperatura 37 ± 2 °C

Tiempo de incubación 24 h.

Cuadro 10. Resultados del análisis fisicoquímico practicado al agua procedente de los diferentes sitios de muestreo.

Parámetro	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4	Sitio 5	Valores Máximos Permisibles
Conductividad ($\mu\Omega/cm$)	265	320	235	320	290	1000
pH	7.4	7.5	7.7	6.75	7.23	4.5-9.0
Salinidad	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	
Oxígeno Disuelto	6.3	1.9	0.7	4.01	5.5	
Metales (mg/l)						
As	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1
Fe	0.02	0.02	0.08	0.08	0.04	500
Cr	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.01
Ni	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.05
CN	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.02
Al	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.02
Zn	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.00
Cu	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.20

3.5. Cálculo y diseño de clorinadores.

Como propuesta de solución se decidió tratar el agua de riego con cloro, por lo que se realizó el diseño de un clorinador. Para el diseño de este equipo es necesario conocer los parámetros físicos, químicos y microbiológicos ya evaluados, uno los parámetros más importantes para poder utilizar el cloro como desinfectante es la DQO, que como ya mencionamos anteriormente, nos permite conocer la cantidad de materia orgánica presente en el agua; el rango de valores encontrados de DQO fue de 28 a 136 mg/ml. El sitio en el cuál se registró el contenido más alto de DQO fue el 2 (136 mg/l) y el más bajo fue el 1 (28 mg/l). Los valores registrados nos indican que no existe ningún problema en el uso de cloro como desinfectante ya que los valores de DQO se encuentran muy por debajo de los 300 mg/ml, si éstos estuvieran por arriba de los 300 mg/ml se tendría que descartar este método de tratamiento de agua ya que a esta concentración el cloro resulta ser bastante tóxico por la formación de cloramidas y es poco biodegradable.

Otros parámetros indispensables para el diseño de equipo y que también se determinaron fueron: pH óptimo de acumulación de cloro, dosis óptima de cloro (necesario para obtener el punto de quiebre), dosis óptima de cloro y tiempo de contacto óptimo con el efluente que asegure la muerte del microorganismo, así como el gasto volumétrico del canal, velocidad del efluente y el área transversal del canal.

En el Cuadro No. 11 se presentan los resultados de la determinación de cloro residual a diferentes pH's en donde se aprecia que la máxima actividad de cloro residual (56 mg/l) se alcanzó a un pH de 3, este valor es considerablemente bajo y poco usado para efectos prácticos ya que si se trabaja con estos valores el costo de operación se incrementa considerablemente por lo que descartamos este valor y

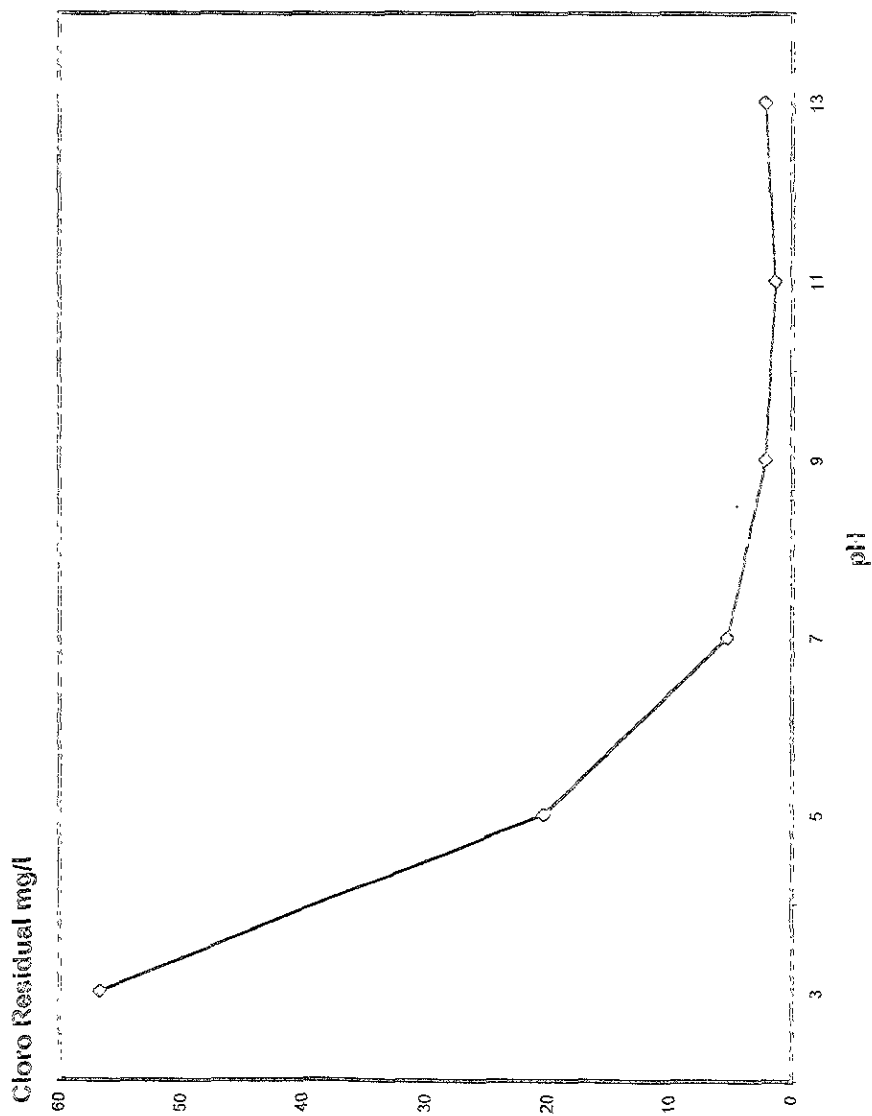
consideramos como una mejor opción trabajar con el pH original que tiene el agua y que se encuentra en un rango de 7 a 8 (Gráfica 8).

Cuadro 11. Determinación de cloro residual en función del pH

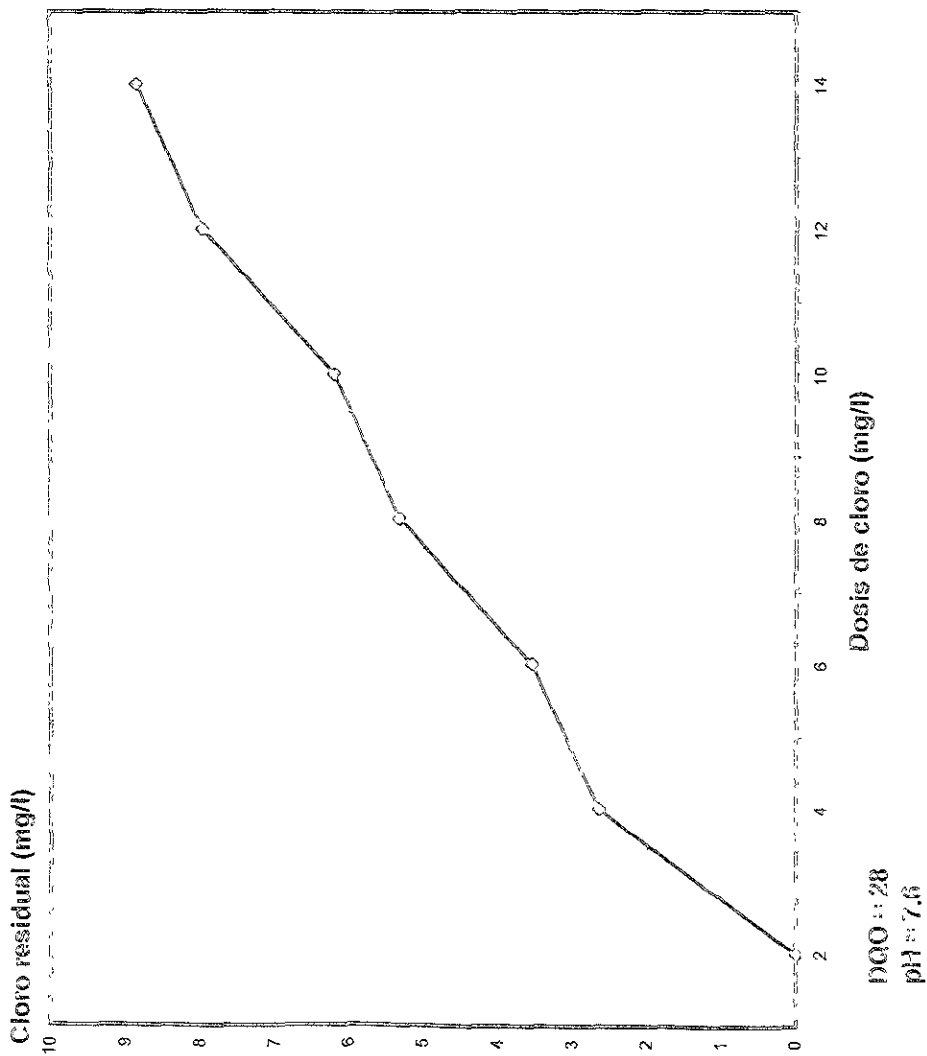
pH	Cloro Residual (mg/l)
3.0	56
5.0	20
7.0	5
9.0	2
11.0	1
13.0	2

En las Gráficas 8, 9, 10, 11 y 12, se muestra el comportamiento del cloro residual, en función de la dosis óptima de cloro, así como la DQO y el pH registrados en cada sitio. El propósito de este análisis es el de obtener el punto de quiebre en cada sitio analizado, esto no es otra cosa que la determinación del punto en el cual se observe una acumulación de cloro residual libre; en las Gráficas 9 y 10 es donde aparentemente este punto se observa más claro y se presenta a una concentración de 8 mg/l, así mismo, en las Gráficas 8, 11 y 12, este punto no se encuentra bien definido, este hecho no tiene gran importancia ya que en numerosos estudios realizados no siempre se hace evidente el punto de quiebre. La dosis de 8 mg/l no es la cantidad real de cloro requerido en nuestro estudio, sino que es la concentración máxima que vamos a utilizar en la cinética de desinfección para así conocer la demanda real que tiene actividad sobre los microorganismos, es importante enfatizar que de el cloro que se utiliza como desinfectante una cierta

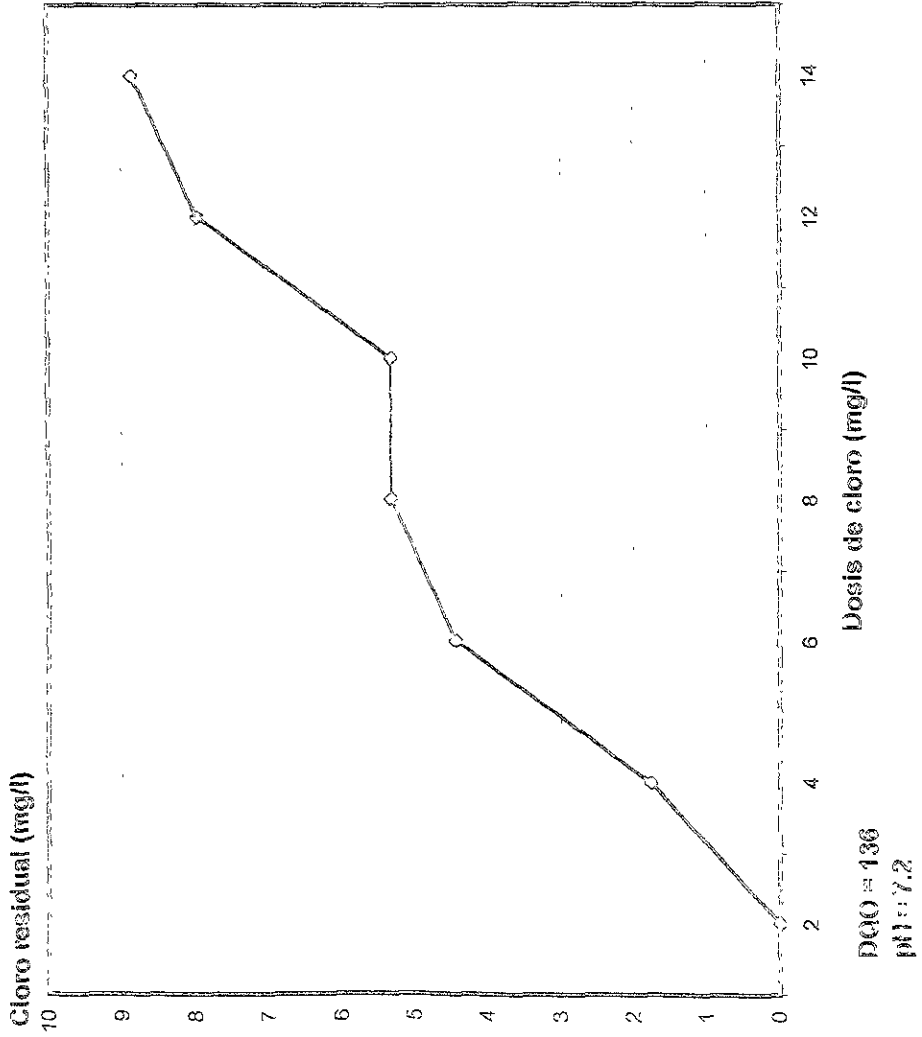
Gráfica 8. Determinación del pH óptimo en el agua de riego de hortalizas



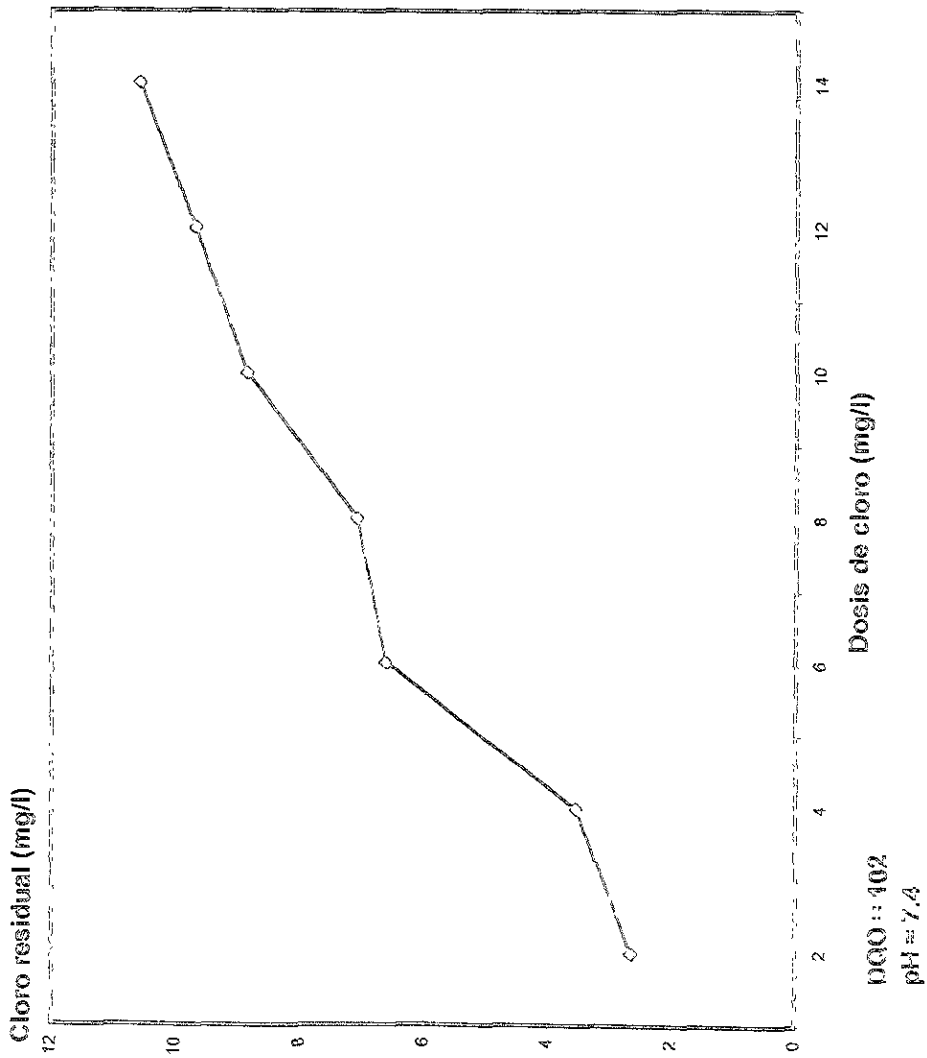
Gráfica 9. Determinación de la dosis óptima de cloro en el sitio 1

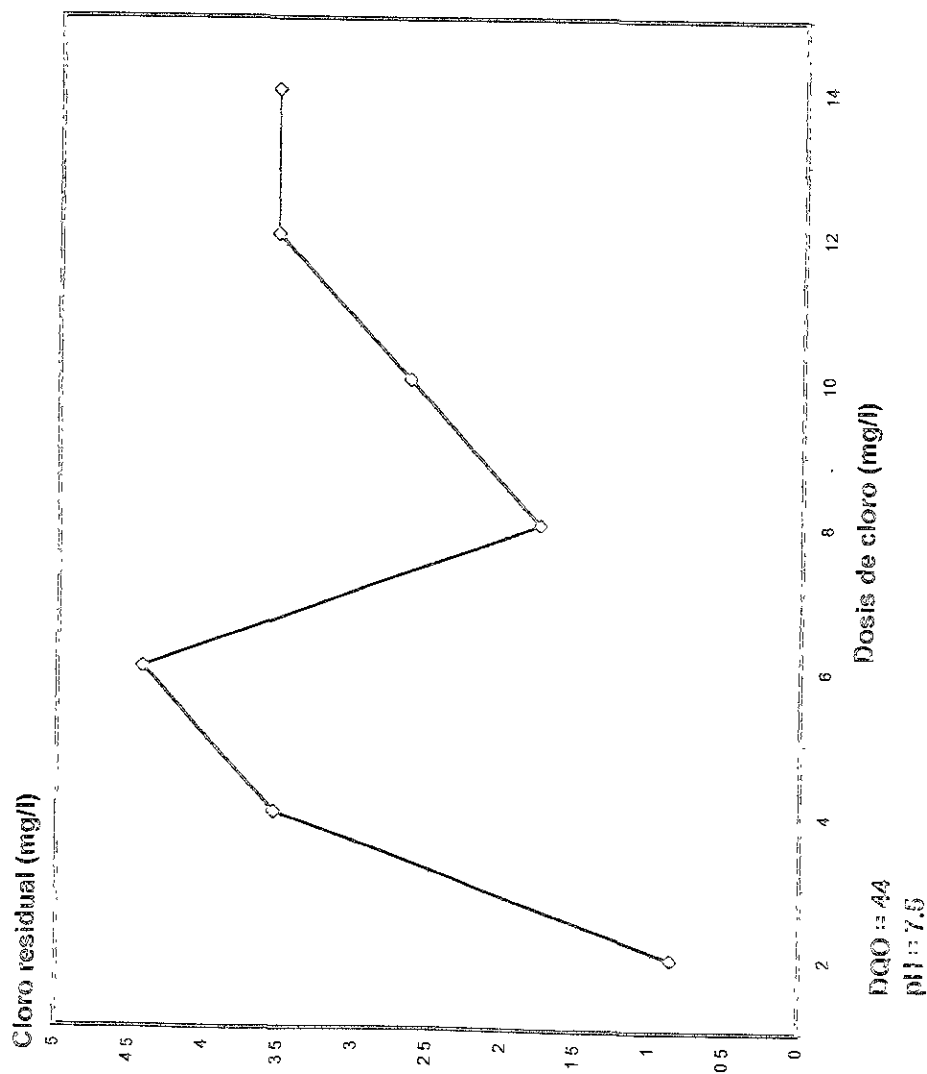


Gráfica 10. Determinación de la dosis óptima de cloro en el sitio 2.

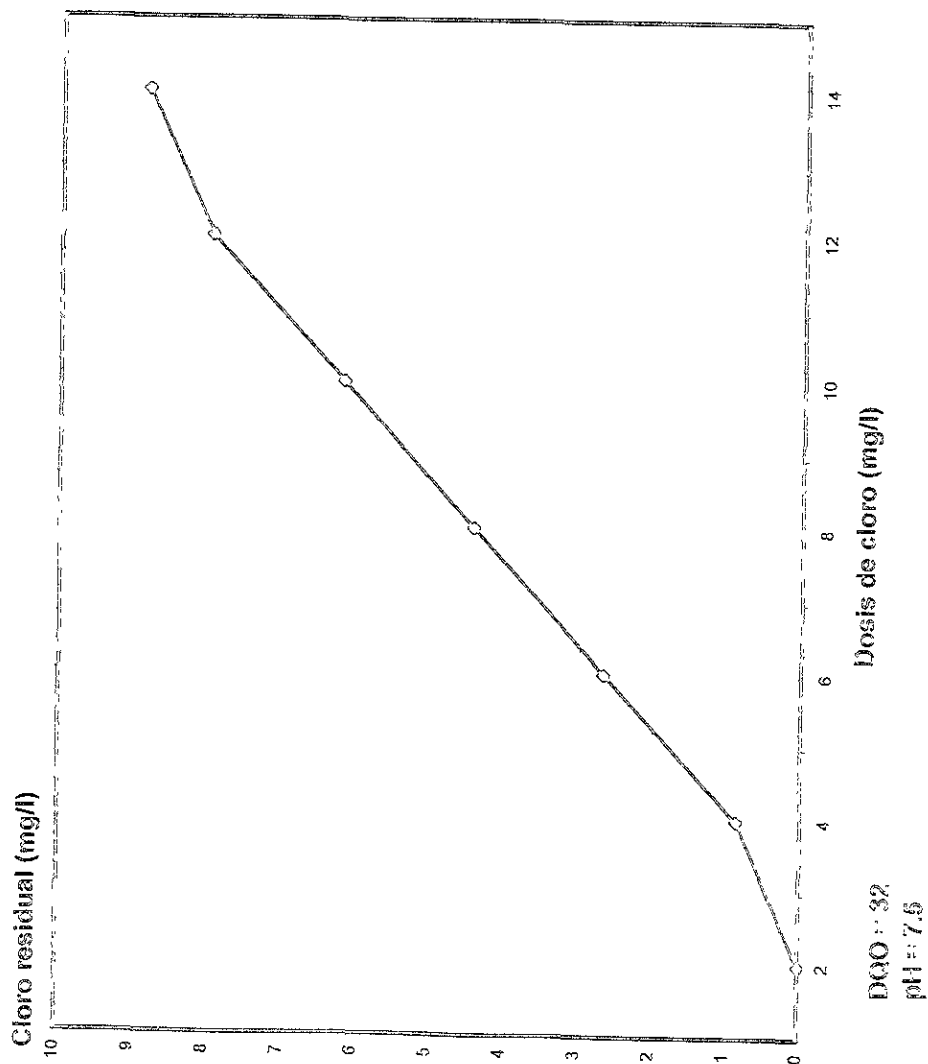


Gráfica 11. Determinación de la dosis óptima de cloro en el sitio 3





Gráfica 13. Determinación de la dosis óptima de cloro en el sitio 5



Los resultados del Cuadro 11 corresponden a la cinética de desinfección, en la cuál se probaron diferentes dosis de cloro de 0 – 4.5 mg/l; los parámetros evaluados son dosis de cloro (mg/l), cloro residual (mg/l), UFC/ ml; en dicho cuadro se aprecia que a medida que se agrega una mayor cantidad de cloro las unidades formadoras de colonia disminuyen, así como también se aprecia una mayor acumulación de cloro residual a medida que se incrementa la dosis, a una concentración de 3.0 mg/l prácticamente la calidad sanitaria del agua alcanza un nivel aceptable, ver Gráfica 14, a concentraciones mayores de 4 mg/l queda inhibido todo crecimiento microbiano, en un tiempo de contacto de 5 minutos

Cuadro 11. Determinación de la dosis óptima de cloro.

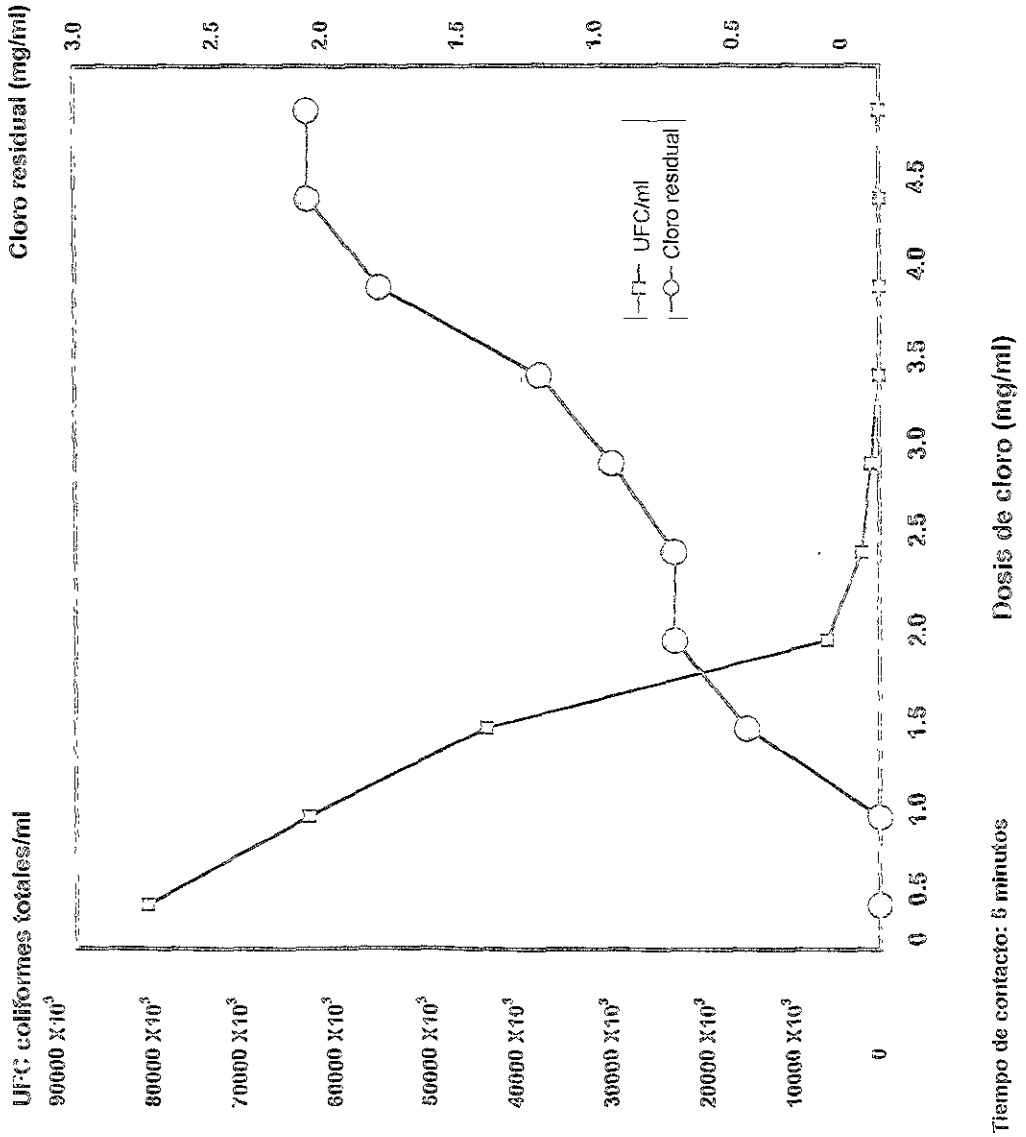
Dosis de Cloro (mg/l)	Cloro Residual (mg/l)	Coliformes Totales U.F.C./ml
0.0	0.00	82 000
0.5	0.00	64 000
1.0	0.00	44 000
1.5	0.50	6 000
2.0	0.70	2 000
2.5	0.70	1 000
3.0	1.00	61
3.5	1.30	10
4.0	1.80	Sin crecimiento
4.5	2.20	Sin crecimiento

Temperatura de incubación $37 \pm 2^\circ\text{C}$

Tiempo de incubación 24 h.

De aquí concluimos que la dosis de 8 mg/l evaluada anteriormente se encontraba sobrestimada ya que la real es un poco menor de 4 mg/l sin embargo, como habíamos comentado este valor fue el que nos permitió tener un punto de referencia máximo de concentración de cloro a probar.

Gráfica 14. Determinación de la dosis óptima de cloro.



En el Cuadro 12 se anotan los diferentes tiempos de contacto, para así conocer el óptimo en el cuál se logre eliminar a los microorganismos coliformes fecales presentes en el agua del canal a una concentración de 8 mg /l. Como se puede observar, la eliminación total de los microorganismos coliformes fecales se logra en un tiempo de contacto de 5 minutos.

Cuadro 12. Determinación del tiempo de contacto óptimo

Dosis de Cloro (mg/ml)	Tiempo de Contacto (min)	Coliformes Totales (UFC/ml)
0	0	85,000
8	5	0
8	10	0
8	15	0
8	20	0
8	25	0
8	30	0

Temperatura de incubación $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$
 Tiempo de incubación 24h.

De acuerdo a las mediciones realizadas en los diferentes sitios de muestreo, se efectuaron cálculos para conocer el área de la sección transversal del canal y el gasto volumétrico; considerando el tiempo de residencia de 5 minutos se calculó el volumen del clorinador y suponiendo 2.0 m de ancho y una profundidad de 1.0 m, se calculó la longitud del clorinador, conociendo el gasto volumétrico del canal y la dosis de 3.0 mg de cloro/litro de agua, se calculó la cantidad de cloro requerida por día para operar eficientemente los clorinadores. Estos resultados se representan en los Cuadros 13 y 14.

Cuadro No. 13. Dimensionamiento de clorinadores y consumo de cloro

Sitio	Gasto Volumétrico (litros/seg)	Volumen del Clorinador (m ³)	Consumo de Cloro 40 % (Kg/día)
1	99.7	29.92	25.84
2	205.4	61.61	53.14
3	113.3	33.99	29.29
4	255.0	76.52	66.10
5	88.0	26.38	22.81

Cuadro 14. Parámetros físicos de la corriente del canal

Sitio	Distancia (m)	Tiempo (seg)	Velocidad (m/seg)	Velocidad Promedio (m/seg)	Área (m ²)	Gasto Volumétrico (litros/seg)	Volumen (m ³) 5 min de tiempo de residencia	Consumo de Cloro (Kg cloro/ día)
1	13.67	72.00	0.1898	0.1614	0.6179	99.7	29.92	25.84
2	3.09	3.99	0.7744	0.6583	0.3120	205.4	61.61	53.14
3	5.00	19.45	0.2571	0.2185	0.5185	113.3	33.99	29.29
4	6.63	10.13	0.6545	0.5563	0.4585	255.0	76.52	66.1
5	5.00	18.73	0.2670	0.2269	0.3875	88.0	26.38	22.81

El método seleccionado para dar tratamiento al agua utilizada en el riego, tiene la ventaja de que es económico, fácil de instalar y de operar en el mismo canal, y requiere el mínimo de mantenimiento ya que solo basta que alguna persona adicione diariamente la cantidad de cloro requerida en cada uno de los equipos.

Aunque este método tiene sus limitaciones bajo determinadas condiciones como son, resistencia del microorganismo a un desinfectante dado, temperatura del agua, concentración del cloro y materia orgánica presente; en la cinética de desinfección se encontró que no existe este problema ya que de acuerdo a los resultados microbiológicos se puede observar que los microorganismos presentes en el agua son sensibles al cloro, en cuanto al pH, no es necesario modificarlo, se trabajará el mismo que tiene el agua por lo que la corrosión de las estructuras de concreto y del mismo clorinador será el mínimo producido por el cloro adicionado. En cuanto a la materia orgánica, proteínas y material coloidal que tiende a reaccionar con el cloro, oxidándolo y dando como resultado la coagulación de proteínas y la inactivación del desinfectante tampoco se presentará, ya que la concentración de 4 mg/l está ligeramente sobrestimada, (Gráfica 12), y como ya se analizó. Cuadro 5, la materia orgánica es realmente baja por lo que tampoco tendrá efecto alguno en la inactivación del desinfectante.

7. Conclusiones

- ◊ De acuerdo a los resultados obtenidos, el agua de El Canal "El Zapote", la cuál es utilizada para el riego de hortalizas, se encuentra altamente contaminada con microorganismos coliformes, excediendo la Norma Técnica Ecológica establecida para agua de riego.
- ◊ El microorganismo causal del cólera, *Vibrio cholerae* O1, Biotipo Ogawa, fue aislado e identificado en el agua de dos de los sitios de muestreo durante el mes de mayo, coincidiendo en tiempo con brotes de cólera registrados en la comunidad.
- ◊ Las condiciones ambientales de pH y temperatura del agua en los sitios en los que se localizó a la bacteria causante del cólera fueron: pH 7.0; temperatura 28 °C y 25.0 °C.
- ◊ El agua del Canal "El Zapote", utilizada para el riego de hortalizas, cumple satisfactoriamente con los parámetros físicoquímicos establecidos en la Norma Técnica Ecológica NTE -032/91.
- ◊ En las Hortalizas muestreadas y analizadas, no fue posible aislar al microorganismo de estudio, ya que éste podría encontrarse en estado viable pero no cultivable.

◊ Con base en los resultados, se propone como alternativa de solución la instalación de clorinadores en dos de los sitios por los que atraviesa el canal, con ello se garantiza la destrucción de microorganismos patógenos y del mismo *Vibrio cholerae* los clorinadores son fácilmente instalables, de operación sencilla y requieren de un mantenimiento mínimo.

3. Apéndice

3.1. Prueba de oxidasa.

La prueba de oxidasa se basa en la producción bacteriana de la enzima oxidasa, la reacción de la oxidasa se debe a la presencia del sistema citocromo - oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones

Existen cuatro pigmentos bacterianos que actúan como enzimas respiratorias citocromooxidasa terminales. citocromo a_1 , citocromo a_2 , citocromo a_3 y un pigmento ligado al monóxido de carbono denominado citocromo O. Los citocromos son pigmentos respiratorios que contienen compuestos de ferropórfirinas. la distribución de los diferentes citocromos varía en cada especie bacteriana; algunos organismos poseen solamente una oxidasa. en tanto que otros pueden producir dos ó tres.

La enzima oxidasa producida por diferentes bacterias cuando se encuentra en presencia de oxígeno atmosférico, citocromo C, y un reactivo oxidasa, oxidan al reactivo para formar un compuesto coloreado el indofenol.

La prueba de oxidasa debe realizarse con cultivos incubados de 18 a 24 horas. dichos medios no deben contener azúcar.

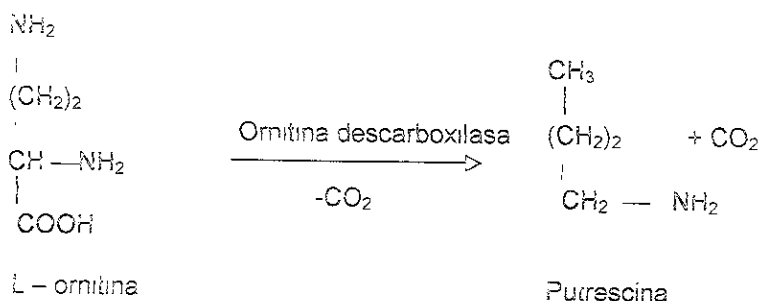
8.2. Prueba de catalasa.

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La catalasa es una hemoproteína en donde el grupo prostético se encuentra formado por cuatro átomos de hierro trivalente (Fe^{+++}) por molécula que retiene su estado oxidado durante la actividad enzimática. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno u oxida sustratos secundarios, sin embargo, no tiene acción contra otros peróxidos, en la descomposición del peróxido de hidrógeno una molécula actúa como el sustrato y la otra como un dador; el sustrato reducido por los átomos de hidrógeno cedidos por el donador dá como resultado un sustrato reducido y un dador oxidado.

8.3. Medio MIO

Ésta prueba sirve para determinar la movilidad, producción de indol y la descarboxilación de la ornitina. La descarboxilación es el proceso por el cuál las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo ($-COOH$), dando como resultado una amina ó una diamina y anhídrido carbónico.

El aminoácido L- ornitina es descarboxilado por la enzima ornitina descarboxilasa para dar diamina putrescina y anhídrido carbónico.



Durante la descarboxilación el pH del medio aumenta a medida que se produce anhídrido carbónico, ya que el pH puede ser controlado, es posible incorporar un indicador de pH, ya sea púrpura de bromocresol y/o rojo de cresol (en éste caso el medio contiene púrpura de bromocresol).

Indicador de pH:	Púrpura de bromocresol
pH	Vire de color. a amarillo
pH	Vire de color púrpura a morado
Movilidad positiva	El medio se enturbia y se observa crecimiento en todo el tubo
Movilidad negativa	Se observa crecimiento solo a lo largo de la picadura

8.4. Descarboxilación de ornitina.

Se efectúa bajo condiciones de anaerobiosis, por lo tanto la prueba se interpreta de acuerdo a los resultados observados en el fondo del tubo.

Ornitina positiva	El fondo del tubo presenta un color púrpura ó morado debido a la alcalinización.
Ornitina negativa	El fondo del tubo presenta un color amarillo.

8.5. Prueba del indol.

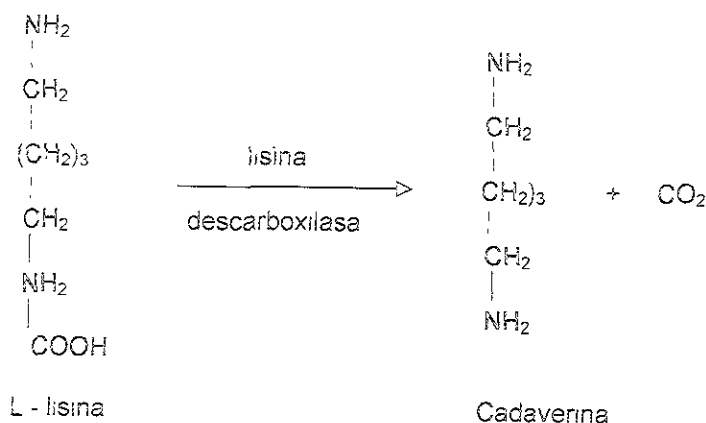
Se puede realizar de varias formas. una de ellas consiste en sembrar las colonias de prueba en medio de caldo triptosa, en caldo nutritivo, se incuba de 24 horas a 37 0 ° C, se adicionan 5 gotas de reactivo de Ehrlich ó de Kovacs y se interpretan los resultados:

Indol positivo	Formación de un anillo de color rojo.
Indol negativo	Formación de un anillo de color amarillo

8.6. Agar de hierro y lisina (LIA).

En este medio se determina la descarboxilación de la lisina, que se lleva a cabo bajo condiciones de anaerobiosis y la desaminación de la lisina que se efectúa bajo condiciones de aerobiosis.

El aminoácido L- lisina se descarboxila dando como resultado una diamina llamada cadaverina y anhídrido carbónico, esto por la acción de la enzima específica lisina –descarboxilasa



Interpretación de la prueba.

Indicador de pH	Púrpura de bromocresol
pH ácido	Vire del indicador a amarillo
pH alcalino	Vire del indicador a púrpura
Descarboxilación positiva	Fondo del tubo en color púrpura
Descarboxilación negativa	Fondo del tubo en color amarillo ó sin cambio
Desaminación positiva	Superficie del tubo con coloración rojo vino
Desaminación negativa	Superficie del tubo en color púrpura ó sin cambio.

8.7. Caldo arginina.

En éste medio se puede demostrar la descarboxilación de la arginina bajo condiciones de anaerobiosis, se inocula caldo arginina y se sellan los tubos con vaselina líquida ó aceite mineral estéril (0.5 ml); se interpretan los resultados.

Indicador de pH	Púrpura de bromocresol
pH ácido	Vire del indicador a amarillo
pH alcalino	Vire del indicador a púrpura
Arginina positivo	El caldo se torna de color púrpura en su totalidad
Arginina negativo	El caldo se torna de color amarillo en su totalidad

El caldo arginina se incuba de 1 a 4 días para darlo como negativo

8.8. Agar de hierro y triple azúcar (TSA).

Este es un medio diferencial que sirve para lo siguiente.

- 1 Para determinar la fermentación de los hidratos de carbono
- 2 Para determinar la producción de ácido sulfhídrico.

Este medio que contiene tres carbohidratos: lactosa (1.0 %), glucosa (0.1 %) y sacarosa (1.0 %), es ampliamente usado para observar la facultad que poseen algunos microorganismos para fermentar los hidratos de carbono, la cual puede efectuarse con ó sin la producción de gas ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$) La fermentación de la sacarosa

y lactosa se efectúa bajo condiciones de aerobiosis en el pico de flauta del medio, y la fermentación de la glucosa se efectúa bajo condiciones de anaerobiosis y ocurre generalmente en el fondo del tubo, además existe la producción de ácido sulfhídrico, que precipita en forma de sulfuro férrico al reaccionar con el hierro presente en el medio de cultivo

Interpretación de resultados.

Glucosa positiva	Fondo amarillo
Glucosa negativa	Fondo alcalino sin cambio
Sacarosa y lactosa positivos	Superficie amarilla
Sacarosa y lactosa negativos	Superficie roja
Producción de gas	Presencia de burbujas de gas en el medio
Producción de ácido sulfhídrico	Precipitado de color negro en el fondo del tubo ó en el sitio de la picadura

8.9. Pruebas de fermentación de hidratos de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa y manitol).

Mediante éstas pruebas se determina la capacidad del microorganismo sospechoso, de fermentar un hidrato de carbono específico incorporado al medio de cultivo, el resultado de la fermentación es generalmente un ácido orgánico

Interpretación de resultados

Prueba positiva	El medio cambia de color, a amarillo
Prueba negativa	No existe cambio en el color del medio de cultivo.

3.10. Prueba de oxidación – fermentación (OF).

Esta prueba permite determinar el metabolismo oxidativo ó fermentativo de un hidrato de carbono, asimismo, permite detectar la producción de gases y / ó ácidos, así como la motilidad del microorganismo de prueba.

La diferencia primordial entre los metabolismos oxidativos y fermentativos, depende de los requerimientos de oxígeno atmosférico y de la fosforilación inicial. La fermentación es un proceso anaerobio que requiere la fosforilación inicial de la glucosa previa a su degradación, mientras tanto, la oxidación es un proceso estrictamente aerobio que implica la oxidación directa de una molécula de glucosa no fosforilada inicialmente. La fermentación produce una acidéz del medio más elevada que la producida por la oxidación.

Interpretación de la prueba

Oxidación	Cambio de color en el medio, a amarillo, se considera que existe producción de ácido
Producción de gas	Formación de burbujas en el medio
Motilidad positiva	Crecimiento que se aleja de la línea de punción
Motilidad negativa	Crecimiento limitado a la línea de punción
Fermentación	Cambio de color en el medio, de verde a amarillo

3.11. Prueba de licuefacción de gelatina

Ésta prueba consiste en incorporar gelatina a diversos medios de cultivo para determinar la capacidad del microorganismo para producir enzimas de tipo

proteolítico que a su vez son detectadas por la digestión ó licuefacción de la gelatina

Las enzimas que degradan a la gelatina reciben el nombre de gelatinasas

El catabolismo de las proteínas por las gelatinasas es un proceso que ocurre en dos etapas, el resultado final es una mezcla de aminoácidos individuales



La interpretación de la prueba consiste en detectar la presencia de crecimiento en el medio con la correspondiente presencia de turbiedad ó licuefacción del mismo.

8.12. Reducción de nitratos.

Mediante ésta prueba se determina la capacidad de un microorganismo para reducir los nitratos a nitritos ó en oxígeno. La reducción del nitrato en nitrito y gas nitrógeno, tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales el microorganismo obtiene el oxígeno necesario de los nitratos. El oxígeno actúa como aceptor de hidrógeno.

En la reducción de los nitratos los citocromos bacterianos transportan electrones a las moléculas receptoras específicas



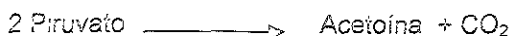
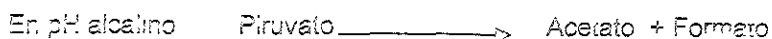
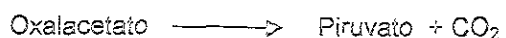
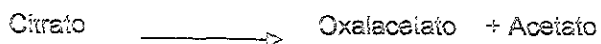
El producto final que se forma depende de la especie bacteriana, el más común es el nitrógeno molecular obtenido por la reducción del nitrito

Interpretación de resultados:

Reacción positiva.	Aparición de un color rosado ó rojo intenso provocado por la reducción de nitrato a nitrito
Reacción negativa:	No existe desarrollo de color.

3.13. Prueba de citrato.

Ésta prueba determina la capacidad que posee un microorganismo para utilizar al citrato como única fuente de carbono. El metabolismo del citrato en la mayoría de las bacterias se efectúa mediante el ciclo del ácido tricarboxílico ó mediante el ciclo de fermentación del citrato, el desdoblamiento del citrato es efectuado por la enzima citritasa (citrato oxalacetato liasa) ó también por la enzima citrato desmolasa, los productos de la reacción dependen del pH del medio.



Los medios de cultivo, además del citrato contienen sales inorgánicas de amonio, por lo que los microorganismos que utilizan al citrato como única fuente de carbono, utilizan al amonio como única fuente de nitrógeno.

Interpretación de la prueba:

Prueba positiva: Crecimiento microbiano con un color azul intenso en el pico de flauta.

Prueba negativa: No se observa crecimiento ni cambio de color.

8.14. Reacción de Voges Proskauer.

Esta prueba determina la capacidad que tienen algunos microorganismos para producir un compuesto final neutro, el acetyl methylcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa.

En presencia de oxígeno atmosférico y álcali, la acetoína y el 2,6 butanodiol son oxidados en diacetilo, que es el reactivo causante del color en la reacción

Además de determinar la presencia de acetoína, se puede realizar la prueba del rojo de metilo. la cuál se basa en el empleo de un indicador de pH. el rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógeno presentes en la fermentación de la glucosa.

La validez de ésta prueba depende del tiempo de incubación (por lo menos dos días)

Interpretación de la prueba

Prueba RM positiva.	Existe formación de un anillo color rojo en la superficie del medio (pH 4.4).
Prueba RM negativa.	Formación de un anillo color amarillo en la superficie del medio.
Reacción retardada	Existe la formación de un anillo color naranja en la superficie del medio. Se recomienda prolongar el tiempo de incubación hasta 4 días y repetir la prueba.

8.15. Prueba de fenilalanina desaminasa.

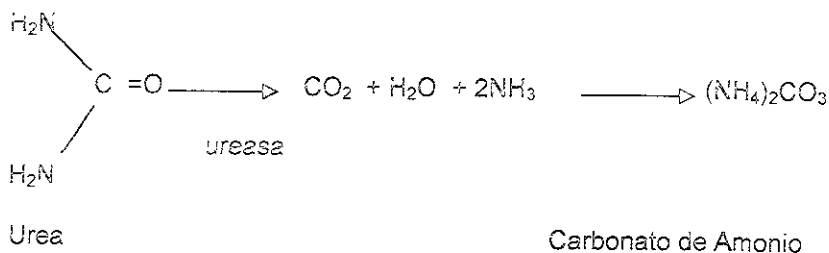
Mediante ésta prueba se determina la capacidad de un microorganismo para desaminar la fenilalanina en ácido pirúvico debido a su actividad enzimática.

Interpretación de la Prueba.

Reacción positiva.	Existe la formación de un color verde en el pico de flauta en un período de 1 a 5 minutos
Reacción negativa.	No se produce cambio de color.

8.16. Reacción de la ureasa.

Mediante ésta prueba se determina la capacidad de un microorganismo para descomponer la urea, formando dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa; la ureasa es una importante enzima microbiana vinculada a la descomposición de los compuestos orgánicos



Interpretación de la prueba

Reacción positiva	Aparición de un color rojo rosado intenso en todo el tubo
Reacción negativa	No se produce cambio de color.

8.17. Determinación de la DQC

Se colocaron 0.4 g de ácido sulfúrico dentro de un matríz de reflujo de 500 ml, se agregaron 20.0 ml de la muestra de agua, se mezclan perfectamente se adicionaron 10 ml de dicromato de potasio y varias perlas de vidrio, se agregaron lentamente y con agitación suave 30 ml de ácido sulfúrico y sulfato de plata, se conectó el matríz al condensador Friederich's y se lleva a reflujo durante dos horas, se enfrió y lavó el condensador con agua destilada, se diluyó la mezcla con agua destilada hasta aproximadamente 150 ml, se enfrió a temperatura ambiente y se valoró con la solución de sulfato ferroso amoniacal al 0.1 N utilizando de dos a tres gotas de ferroín como indicador; el cambio de color es de azul verdoso claro a café

rojizo (en el momento en que apareció éste color se tomó como punto final aunque el color azul verdoso volviera a aparecer) Al mismo tiempo se corrió un testigo de igual forma que la muestra, en la que se substituyó con 20 ml de agua destilada teniéndose cuidado de que tanto muestras como testigo ebullieran al mismo tiempo

El cálculo de la DQO se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{mg/l DQO} = \frac{(a-b) N \times \text{meq} \times 10^6}{\text{ml de muestra}}$$
$$\text{mg/l DQO} = \frac{(a-b) N \times 800}{\text{ml de muestra}}$$

a = ml de sulfato ferroso amoniacal $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2$ usados en el testigo

b = ml de sulfato ferroso amoniacal usados en la muestra.

N = Normalidad del sulfato ferroso amoniacal

Meq = miliequivalentes de Oxígeno = 8

8.17.1. Solución de dicromato de potasio utilizada para DQO

Se disolvieron 12.259 g de dicromato de potasio (grado estándar, previamente secado a 103°C por 2 h) en 1000 ml de agua destilada

8.17.2. Solución de ácido sulfúrico concentrado con sulfato de plata utilizada para la determinación de la DQO.

Se pesaron 9.5 g de Ag_2SO_4 y se disolvieron en 1000 ml de H_2SO_4 y se dejó reposar de 1 a 2 días para obtener una disolución completa de Ag_2SO_4 .

8.17.3. Solución valorada de sulfato ferroso amoniacal 0.25N.

Se disolvieron 39 g de sulfato ferroso amoniacal $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, se adicionaron 20 ml de ácido sulfúrico concentrado, se enfrió y se diluyó a 1000 ml; esta solución se valoró diariamente con solución de dicromato de potasio 0.25N de la siguiente forma: diluyendo 10ml de la solución de dicromato de potasio aproximadamente a 100ml con agua destilada, se adicionó 30 ml de ácido sulfúrico concentrado y se enfrió. Se titula con la solución de sulfato ferroso amoniacal usando como indicador 2 a 3 gotas de ferroína.

8.18. Determinación de metales pesados:

En la determinación de metales se emplearon kits comerciales marca Merck, siguiéndose las recomendaciones del fabricante

Hierro: E. Merck Darmstadt, Aquaquant 14438.

Cianuro: E. Merck Darmstadt, Aquaquant 14429.

Cromo: E. Merck Darmstadt, Aquaquant 14441

Niquel: E. Merck Darmstadt, Aquaquant 14783

8.19. Medición de la sección transversal de la corriente de agua.

Se determina por sondeos, que puede ser por vadeo ó por puente; en el caso particular el canal se puede vadear, por lo que la técnica fué la siguiente:

- a). Se tendió un cable ó cuerda resistente a lo ancho del canal, perpendicular al sentido de la corriente.
- b). Se marcó sobre el cable los márgenes de la corriente y se midió el ancho del canal
- c). Se segmentó el ancho del canal en un número de partes seleccionadas a criterio (comunmente es de 10), procurando que fueran medidas cerradas y se marcó la cuerda en esos puntos.
- d). Se midieron las profundidades en cada punto empleando una sonda, ya sea rígida ó flexible, ó bién, con las varillas del molinete, colocando en el extremo de la primera varilla, la zapata de asiento, para que no se hunda cuando esté en suelo fangoso.
- e). Se reportó cada profundidad para que posteriormente se pudieran calcular las áreas parciales de los segmentos seleccionados.

3.20. Medición de la velocidad de la corriente de agua.

La velocidad de la corriente en la sección transversal seleccionada se midió por medio de flotadores, utilizándose virutas de unicel. El procedimiento para calcular la velocidad es la siguiente.

- a). Se eligió un tramo de la corriente que presente la sección más uniforme.

- b). Se midió una distancia sobre cualquiera de las márgenes de la corriente, señalando sus puntos extremos.
- c). Se arrojó el flotador en uno de los puntos y se empieza a medir el tiempo.
- d). Se midió el tiempo en el cual el flotador recorrió la distancia conocida.
- e). Se repitió el procedimiento tres veces; se promedió el tiempo medido y se calculó la velocidad con la fórmula:

$$v = D/t$$

v = velocidad en m/seg

D = distancia en metros

t = tiempo en segundos

8.24. Cálculo del gasto volumétrico de la corriente de agua.

Con el área transversal y la velocidad previamente medidas, se procedió a calcular Gasto Volumétrico (Q) por medio de las fórmulas siguientes.

Cuando la velocidad se mide por medio de flotadores superficiales, la velocidad promedio se supone que se ve afectada por un coeficiente que varía de 0.8 a 0.9, considerándose como promedio un valor de 0.85

$$V_s = D/t \quad \text{velocidad superficial}$$

$$V_p = 0.85 V_s \quad \text{velocidad promedio}$$

$$Q = A \times V_p \quad Q = \text{Gasto volumétrico de la corriente, m}^3/\text{seg}$$

$A = \text{Área total transversal, m}^2$

$V_p = \text{Velocidad promedio, m/seg}$

9.22. Diseño de clorinadores.

El diseño de los clorinadores se efectuó a partir de los valores de los parámetros físicos del canal.

1. Se calculó la velocidad promedio de la corriente de agua
2. Se calculó el área de la sección transversal del canal.
3. Se calculó el gasto volumétrico de la corriente (Q).
4. Conociendo el gasto volumétrico (litros/seg) y haciendo la consideración de que la dosis de cloro empleada es de 30 mg de cloro / litro de agua, se calculó el consumo de cloro por día.
5. Conociendo el gasto volumétrico del canal, y haciendo la consideración de que el agua deberá permanecer dentro del clorinador durante 5 minutos, se recalcula el volumen del clorinador.
6. Se asignaron dimensiones del canal en cuanto a la profundidad y ancho del mismo. a partir de éstos datos se calculó la longitud del mismo

Los cálculos mencionados se ejemplifican para el sitio de muestreo 1:

1 Cálculo de la velocidad promedio (V_p)

Distancia: 13.67 m

Tiempo de recorrido (promedio): 72 seg

Velocidad = $d/t = 13.67\text{m} / 72\text{seg} = 0.18986\text{ m/seg}$

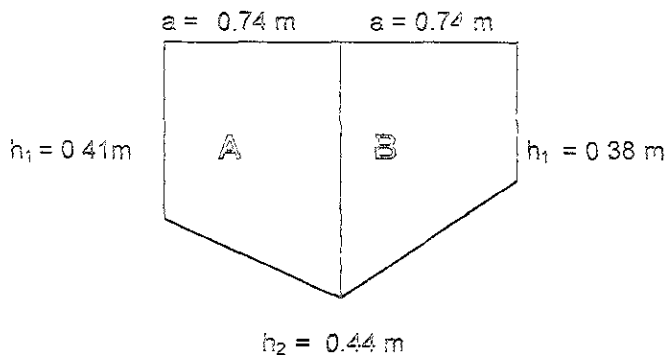
El método de determinación de la velocidad es por flotadores, por lo que

$V_p = (V) (0.85)$

$V_p = 0.16138\text{ m/seg}$

2 Cálculo del área de la sección transversal del canal.

El canal posee una geometría similar al dibujo representado a continuación.



$$\text{Área total} = A_T = A_A + A_B$$

$$A_A = [(h_1 + h_2)/2](a) = (0.41 + 0.44)(0.74)/2 = 0.3145\text{ m}^2$$

$$A_B = [(h_1 + h_2)/2](a) = (0.38 + 0.44)(0.74)/2 = 0.3034\text{ m}^2$$

$$A_T = 0.6179\text{ m}^2$$

3 Cálculo del gasto volumétrico (Q)

$$Q = (A_t) (V_o) = (0.6179 \text{ m}^2) (0.16138 \text{ m/seg})$$

$$Q = 0.09972 \text{ m}^3/\text{seg} \text{ ó}$$

$$Q = 99.72 \text{ litros/seg}$$

4 Consumo de cloro por día

$$\text{Consumo} = Q (\text{dosis establecida})$$

Dosis establecida = 3 mg de cloro/litro de agua

$$\text{Consumo} = (99.72 \text{ litros /seg})(3.0 \text{ mg cloro/ litro})(86400 \text{ seg/ día})(1 \times 10^{-6} \text{ Kg / mg})$$

$$\text{Consumo de cloro} = 25.84 \text{ Kg/día}$$

5 El Volúmen del clorinador

$$Q = \text{Volúmen/Tiempo}$$

$$\text{Volúmen} = (Q) (\text{Tiempo de residencia})$$

$$\text{Tiempo de residencia} = 5.0 \text{ minutos}$$

$$\text{Volúmen del clorinador} = (0.09972 \text{ m}^3/\text{seg}) (300 \text{ seg})$$

$$\text{Volúmen del Clorinador} = 29.916 \text{ m}^3$$

6. Las Dimensiones del clorinador

$$\text{Volúmen} = (\text{largo}) (\text{ancho}) (\text{profundidad}) = 29.916 \text{ m}^3$$

Estableciendo que. Ancho = 2.0 m

$$\text{Profundidad} = 1.0 \text{ m}$$

$$\text{Longitud del clorinador} = 14.958 \text{ m}$$

9.23. Determinación del pH óptimo en el que se obtiene la máxima acumulación de cloro.

Se determinó por el método yodométrico

1. Se tomó una muestra de 100 ml de agua en un matraz de 250 ml, (esto se hizo 6 veces).
2. Se ajustó cada una de las muestras a diferente pH (3,5,7,9,11,y 13)
3. Se agregaron 2.5 ml de ácido acético concentrado
4. Se adicionaron 2.5 ml de yoduro de potas.o.
5. Se tituló con tiosulfato de sodio 0.025N, utilizando almidón como indicador
6. Se calculó la cantidad de cloro residual mediante la siguiente fórmula

$$\text{mg/ml Cl}_2 = \frac{(A + B) \times N (35450)}{\text{ml de muestra}}$$

A = Volumen de tiosulfato de sodio en ml

B = Volumen agregado al blanco de agua

N = Normalidad del tiosulfato.

7. Se reportó el pH óptimo como aquel en el que se obtuvo la máxima acumulación de cloro residual.

8.24. Determinación de la concentración óptima de cloro.

1. Se tomaron 100 ml de la muestra de agua y se transfirieron a un matríz de 250 ml.
2. Se midió el pH de cada muestra.
3. Se adicionó el desinfectante a cada muestra de agua, de tal forma que se obtuvieron las siguientes concentraciones 2,4,6,8,10,12,14,16 mg/ml
4. Se dejó reposar 15 minutos (tiempo de contacto)
5. Se calculó la concentración óptima de cloro con la fórmula anterior (9.2.2)
6. La concentración óptima de cloro se alcanzó cuando se obtiene el punto de quiebre

8.25. Determinación del tiempo de contacto óptimo.

1. Se tomaron 100 ml de las muestras de agua en un matríz de 250 ml (cada muestra analizada 8 veces, ya que se probaron 8 tiempos diferentes).
2. Se midió el pH de cada muestra.

Se adicionó a cada matríz la cantidad de cloro necesario para obtener la misma concentración en donde se obtuvo el punto de quiebre.

Se probaron diferentes tiempos de contacto (5,10, 15, 20, 25,30,35,40 minutos).

Se determinó la concentración de cloro residual con la fórmula (9.2.2). para cada tiempo de contacto probado.

Se sembró cada muestra en caja de petri que contengan agar bilir rojo violeta

Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 24 h.

Se contaron y reportaron las UFC/mi como organismos coliformes totales.

Se reportó el tiempo de contacto óptimo como aquel en el que se produce la muerte de todos los microorganismos presentes en la muestra

8.26 Análisis estadístico:

Tabla de Análisis de Variancia.

Efecto	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P (Nivel de significancia)
Súic	4	15159E100	378971E8	3.87	0.0144
Mes	6	83398E8	138997E8	1.42	0.2477
Error	24	23483E10	978469E7		

álisis de variancia: Evaluó el grado de contaminación en diferentes sitios del
nal y en diferentes meses del año.

prueba de Tukey : Evaluó las diferencias entre los promedios de los diferentes sitios
de muestreo y los diferentes meses del año. Se consideró una diferencia significativa
si $p < 0.05$.

De acuerdo al sitio de muestreo el nivel de significancia es menor de 0.05
(0.0144) por lo que se puede concluir que el grado de contaminación si depende del
sitio de muestreo

Respecto al mes el nivel de significancia es mayor de 0.05 (0.2477), por lo que
podemos concluir que el grado de contaminación no depende de los diferentes
meses del año

9. Bibliografia

1. Abstract Temperature Upshift. "Temperature- Induced recovery of *Vibrio cholerae* from the Viable but Nonculturable state: Growth or Resuscitation?". <http://www.glumbc.edu/~jrave1/ABTC HTML>
2. Adams Linda B., Henk Margaret C. and Siebeling Ronald J. 1998. "Detection of *Vibrio cholerae* With Monoclonal Antibodies Specific for Serovar O1 Lipopolysaccharide". *Journal of Clinical Microbiology*. 9: 1801 – 1809.
3. Aisina M. 1994. "A set keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species" *Journal of Applied Bacteriology*. p. 79-85.
4. Amaro C., Aznar R., Alcaide E. And Lemos M. "Iron- Binding Compounds and Related Outer Membrane Proteins in *Vibrio cholerae* Non-O1 Strains from Aquatic Environments". *Applied and Environmental Microbiology*. Aug. 1990 p 2410-2416.
5. Ansaruzzaman M., Rahman M., Kibriya A.K.M.G., Bhuiyan N.A., Islam M.S. and John Albert M. 1995. "Isolation of Sucrosa Late- Fermenting and Nonfermenting Variants of *Vibrio cholerae* O139 Bengal: Implications for Diagnosis of Cholera". *Journal of Clinical Microbiology*. 5: 1339- 1340.
6. Anwarul Haq, Colwell R.R., Rezaur Rahaman, Afsar Ali, Chowdhury M.A.R., Salina Parveen, Sack D.A. and Russek-Cohen. 1990. "Detection of *Vibrio cholerae* O1 in the Aquatic Environment by Fluorescent – Monoclonal Antibody and Culture Methods" *Applied Environmental Microbiology* 8: 2370-2373.
7. Anwarul Haq, Salina Parveen, Firdausi Qadri, David A and Colwell Rita. 1993 "Comparison of *Vibrio cholerae* serotype O1 Strains Isolated from Patients and the Aquatic Environment". *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 96: 86-92.
8. Araki T. 1992. "An analysis of the effect of changes in growth temperature on proteolysis *in vivo* in the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. Strain ANT-300". *Journal of General Microbiology*. 138: 2075-2082.
9. Bagchi Kunal, Echeverria Peter, Arthur James D., Sethabutr Orntips, Serichantalergs Oralak and Hoge Charles W. 1993 "Epidemic of Diarrhea Caused by *Vibrio cholerae* Non -O1 That Produced Heat- Stable Toxin among Khmers in a Camp in Thailand". *Journal of Clinical Microbiology*. 5: 1315 – 1317.
10. Benítez J.A., Spelbrink R.G., Silva A., Phillips T.E., Stanley C.M., Boesman-Finkelstein and Finkelstein R.A. 1997. "Adherence of *Vibrio cholerae* to Cultured Differentiated Human Intestinal Cells: an *In Vitro* Colonization Model". *Infection and Immunity*. Aug. 1997. p 3474-3477.

11. Bolívar F., Quintero R. 1975. "Estudios Monográficos Influencia de la Biotecnología en el Desarrollo de las Ciencias". Revista de la Sociedad Mexicana de Química Vol. 19 (3): 85 – 89.
12. Braude i. A., Davis E.C., Fierer J. Microbiología Clínica, Vol III Ed. Médica Panamericana 1984 p. 4403- 410
13. Britannica Search: cnoiera.1999. [http //www.eb.com/cgi-bin/g](http://www.eb.com/cgi-bin/g)
14. Carbajal G.H., Sánchez J., Ayala M.E., Hase A. 1998. "Differences among marine and hospital strains of *Vibrio cholerae* during Peruvian epidemic". J Gen Appl. Microbiol., 44: 27-33.
15. Carnahan A.M., Harding J., Watsky D., Hansman S. 1994. "Identification of *Vibrio hollisae* Associated with Severe Gastroenteritiss after Consumption of Raw Oysters". Journal of Clinical Microbiology. 7: 1805- 1806.
16. Coelho A. 1995. "New Variant of *Vibrio cholerae* O1 from Clinical Isolates in Amazonia". Journal of Clinical Microbiology. Jan. 1995 114-118.
17. Davies M. C. 1991. "Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters" Journal of Applied Bacteriology 265- 274
18. Davis D. B., Dulbecco R. "Tratado de Microbiología" Ed Salvat 2ª Ed p. 804-807
19. Davis S. And Goulder R. 1993 "Deterioration in bacteriological quality of watwr though fish farms". Journal of Applied Bacteriology. 74: 336-339.
20. De Paola A. 1981." *Vibrio cholerae* in Marine Foods and Environmental Waters A Literature Review". Journal of Food Science. p. 66 – 69.
21. Dhar R., Ghafoor M. A. and Nasraiah A.V. 1989 "Unusual Non – Serogroup O1 *Vibrio cholerae* Bacteremia Associated with Liver Disease". Journal of Clinical Microbiology 12: 2853 – 2855.
22. Diario Oficial de la Federación 1992. Organo del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. "Ley de Aguas Nacionales 1992" Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos 01 de Diciembre de 1992.
23. Dumler J.S., Osterhout G.J., Spangier J.G. and Dick J.D. 1989 "*Vibrio cholerae* Non-Serogroup O1 Cystitis". Journal of Clinical Microbiology 8: 1898 – 1899.
24. Elliot E.L. Kaysner C.A. y Tamplin M.L. "Metodología de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para la Recuperación,

Identificación y Enumeración de las Especies Patogénicas de *Vibrio*, incluyendo *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y otras especies de *Vibrio*"

25. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. 1994. "Cólera El Viajero del Ganges". Ciencia Médica. Boletín de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina UNAM. Vol. 1 No. 1. p. 12 - 44.
26. Fernández- Escartín. 1995. "Survival of *Vibrio cholera* 01 on plastic materials" *International Journal of Food Microbiology*. 31: 197-204.
27. Frazier W.C. 1985. *Microbiología de los Alimentos*. 3ª Ed. Acribia. Cap. 12 . p. 190 - 193.
28. Glass R.I., Libel M. Brandling A.D. and Bennett. 1992. "Epidemic Cholera in the Americas". *Science*. 256: 1524 - 1525
29. Gontijo- Filho, Silva M.G.D. 1991. "Sensitivity of *Vibrio cholerae* to different disinfectants". *Folha Medica*. 103: 103-104.
30. Hall R.H. and Drasar B.S. 1990. "*Vibrio cholerae* H1yA Hemolysin Is Processed by Proteolysis". *Infection and Immunity*. 10: 3375 - 3379.
31. Honda T., Lertpocasombat K., Hata A., Miwatani T. and Finkelstein R. 1989. "Purification and Characterization of a Protease by *Vibrio cholerae* Non- 01 and Comparison with a Protease of *V. cholerae* 01. *Infection and Immunity* 9: 2799 - 2803.
32. Ibañez R., Serrano- Heranz, Muñoz J.L. y Sánchez- Zaballón. 1996 "Cólera por *Vibrio cholerae* no 01". *Medicina Clínica*. 2: 77.
33. Ichinose Y., Yamamoto K., Nakasone N., Tanabe M., Takeda T. 1987. "Enterotoxigenicity of El Tor -Like Hemolysin of Non-O1 *Vibrio cholerae*" *Infection and immunity*. May. 1987. p. 1090- 1093.
34. Ichinose Y., Yamamoto K., Nakasone N., Tanabe M.J., Takeda T., Miwatani T. and Iwanaga M. 1987. "Enterotoxigenicity of El Tor - Like Hemolysin of Non - 01 *Vibrio cholerae*". *Infection and Immunity*. 5: 1090 - 1093.
35. INDRÉ, Secretaría de Salud, Subsecretaría de Investigación y Desarrollo. 1991. "Manual sobre Cólera para Personal de Salud". Publicación Técnica del INDRÉ No. 11.
36. INDRÉ, Secretaría de Salud, Subsecretaría de Investigación y Desarrollo. 1991. "Manual de Procedimientos para el Aislamiento y Caracterización de *Vibrio*

cholerae 01" Publicación Técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) No. 10

37. Jafrul A.K., Huq A., Tamplin M.L., Siebeling R.J. and Colwell R.R. 1994 "A novel Kit for Rapid Detection of *Vibrio cholerae* 01". Journal of Clinical Microbiology 1: 249 - 252
38. Jawetz R.R. 1990 Manual de Microbiología Médica Ed. El Manual Moderno
39. Kelly M.T., Hickman - Brenner and Farmer J.J. III. 1990. Manual of Clinical Microbiology Fifth Edition Chap. 37.
40. Koichiro Y., Takeda Y., Miwatani T. and Craig J. 1983. "Evidence That a Non - 01 *Vibrio cholerae* Produces Enterotoxin That is Similar but Non Identical to Cholera Enterotoxin. Infection and Immunity 3: 896 - 901
41. Lynn T., Ryder R and Richardson S. 1971. "Biochemistry of *Vibrio cholerae* Virulence. Infection and Immunity 5: 611 - 618.
42. Masako T., Okubo S., Ikigai H., Suzuki T. and Shimamura T. 1991 " The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* 01". Journal of Applied Bacteriology. Vol 70 p 109 - 112
43. Mata L. 1994 " Extinction of *Vibrio cholerae* in acidic substrata. Contaminated fish marinated with lime juice (ceviche)". Rev. Biol. Trop 3: 479- 485.
44. Mata L. 1994 "Extinction of *Vibrio cholerae* in acidic substrata. Contaminated cabbage and lettuce treated with lime juices". Rev Biol. Trop. 3: 487- 492.
45. Mata L., Vargas C. Saborío D. y Vives M. 1994 "Extinction of *Vibrio cholerae* in acidic substrata: Contaminated cabbage and lettuce treated with lime juice" Rev. Biol. Trop. 3: 487 - 492.
46. McCarthy S.A. 1996 "Effects of Temperature and Salinity on Survival of Toxigenic *Vibrio cholerae* 01 in Seawater". Microbial Ecology 31: 167-175.
47. McCarthy S.A. 1996. "Effects of Temperature and Salinity on Survival of Toxigenic *Vibrio cholerae* 01 in Seawater" Microb Ecol 31: 167-175.
48. Michiko A., Takeda T., Honda T. 1986 "Purification and Characterization of *v. cholerae* Non 01 Heat Stable Enterotoxin". Infection and Immunity Abr 1986 p 45-49
49. Mulder G. 1989. "Nontoxigenic *Vibrio cholerae* Wound Infection After Exposure to Contaminated Lake Water". The Journal of Infectious Diseases. 4: 809-810

- 50 Munro P. and Colwell R. 1995 "Fate of *Vibrio cholerae* O1 in Seawater Microcosms". *Wat. Res.* 1: 47-50.
51. Muñoz C. 1998. "Excelente Bactericida contra el *Vibrio cholerae*" CIIDIR. <http://www.arcoide.edu.ar/servicios/comunica/vibrio.htm>
- 52 Novitsky J. and Morita R. 1976. "Morphological Characterization of Small Cells Resulting from Nutrient Starvation of a Psychrophilic Marine Vibrio" *Applied and Environmental Microbiology* Oct 1976 P 617-622
53. OPS. Atención Integrada de las Enfermedades Prevalentes. 1999 "Enfermedades Transmisibles. Situación del Cólera en las Américas". Organización Panamericana de la Salud. <http://www.paho.org>
54. OPS. 1991 "Actividades y datos recientes sobre el Cólera". *Infectología Boletín de la OPS.* Marzo 1991 p. 255-260.
- 55 Pérez J., Suárez F., Flores R. 1990. "Bacteriología General. Principios Biológicos". Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Departamento de Bacteriología. 1990 México.
56. Pierce N., Greenough W., Carpenter C. 1971. "*Vibrio cholerae* Enterotoxin and its Mode of Action". *Bacteriological Reviews.* Mar. 1971. p 1-13
57. Pitrak D. And Gindorf J. 1989. "Bacteremic Cellulitis Caused by Non - Serogroup O1 *Vibrio cholerae* Acquired in a Freshwater Inland Lake" 1989 *Journal of Clinical Microbiology.* Dec. 1989. p. 2874- 2876.
- 58 Puente E., Vega-Villasante F., Holguin G. And Bashan Y. 1992. " Susceptibility of the brine shrimp *Artemia* and its pathogen *Vibrio parahaemolyticus* to chlorine dioxide in contaminated sea- water" *Journal of Applied Bacteriology.* 73: 466-471
- 59 Rajkowski K., Rice E., Huynh B. And Patsy J. 1996. "Growth of *Salmonella* spp And *Vibrio cholerae* in Reconditioned Wastewater" *Journal of Food Protection,* 6: 577- 581
- 60 Rajkowski K.T., Rice E.W., Huynh B., Patsy J. 1996 " Growth of *Salmonella* spp. and *Vibrio cholerae* in reconditioned wastewater" *J. Food Prot.* 6: 577-581.
- 61 Ramamurthy T., Pal A., Takeda T. 1990. Experience with toxin bead ELISA in cholera outbreak" *The Lancet* Vol. 336 P. 375- 376.
- 62 Richardson K., Kaper J. and Levine M. 1989 "Human Immune Response to *Vibrio cholerae* O1 Whole Cells and Isolated Outer Membrane Antigens". *Infection and Immunity.* Feb. p. 495- 501.

- 63 Richardson S.D., Thruston A.D., Caughran T.V., Collete T.W., Patterson K.S. and Lykins B.W. 1998 "Chemical By- Products of Chlorine and Alternative Desinfectants". Food Technology. 4: 58-61.
64. Rivera P., Monge R., Hernández F. 1994. "Susceptibility of the bacterium *Vibrio cholerae* to acid pH in saled vegetables". Rev. Biol. Trop. AUG. 42, Suppl 2: 97-100.
65. Roberts D. 1992 "Growth and survival of *Vibrio cholerae* in foods". PHLS Central Public Health Laboratory. PHLS Microbiology Digest. 1: 24- 30
66. Roberts S. 1992. " Coliform bacteria from aquatic sources in Fiji" Journal of Applied Bacteriology 73: 263 - 268
67. Salud Pública de México. 1993 "Perspectivas de las vacunas contra el cólera". Salud Pública de México. 35: 3 - 19
- 68 Saunders D., Schanbacher K. And Bramucci M. 1982. "Mapping of a Gene in *Vibrio cholerae* That Determines the Antigenic Structure of Cholera Toxin". Infections and Immunity. Dec. 1982 p. 1109-1116.
69. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. 1992 " Gaceta Ecológica" Volumen IV. 19: 18
70. Secretaría de Recursos Hidráulicos. "Métodos de Análisis de Agua y Agua Residual" Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua. México. Vol I.
71. Secretaría de Recursos Hidráulicos. "Métodos de Análisis de Agua y Agua Residual". Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua. México. Vol II
72. Secretaría de Recursos Hidráulicos. "Técnicas de Muestreo y Análisis de Campo" Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua. México Vol I.
- 73 Secretaría de Recursos Hidráulicos. "Técnicas de Muestreo y Análisis de Campo". Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua México. Vol II
74. Secretaría de Recursos Hidráulicos. 1990. "Memoria del Curso Microbiología y Aplicaciones en los Procesos Biológicos de Tratamiento de Aguas". Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua (CIECCA) Comisión Nacional del Agua. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua Octubre 1990 Vol I

75. Secretaría de Recursos Hidráulicos. 1990. "Memoria del Curso Microbiología y Aplicaciones en los Procesos Biológicos de Tratamiento de Aguas" Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua (CIECCA) Comisión Nacional del Agua. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Octubre 1990 Vol II.
76. Secretaría de Salud. 1991. "Boletín Quincenal: Cólera/ Diarreas Infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dirección General de Epidemiología. Mayo 1991 México
77. Secretaría de Salud. 1991. "Boletín Quincenal: Cólera/ Diarreas Infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología Junio 1991. No. 3. México
78. Secretaría de Salud. 1991. "Boletín Quincenal: Cólera/ Diarreas Infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dirección General de Epidemiología Junio 1991. No. 4 México.
79. Secretaría de Salud. 1991. "Información sobre Cólera". Dirección General de Epidemiología. Marzo 1991
80. Secretaría de Salud. 1991. "Introducción Del Cólera En México" Dirección General de Epidemiología. México Abril 1991
81. Secretaría de Salud. 1991. "Manual Para la Vigilancia Epidemiológica del Cólera en México" Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. Dirección General de Epidemiología. Noviembre 1991.
82. Secretaría de Salud. 1992. "Boletín Mensual: Cólera/ Diarreas Infecciosas". Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. Marzo 1992. No.3 México.
83. Secretaría de Salud. 1992. "Boletín Mensual: Cólera/ Diarreas Infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. Agosto 1992. No 8. México.
84. Secretaría de Salud. 1992. "Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica de Cólera en México" Dirección General de Epidemiología. Junio 1992 No 1 Semana 23
85. Secretaría de Salud. 1992. "Manual de Técnicas y Procedimientos para la Investigación de *Vibrio cholerae* en Agua y Alimentos" Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. Laboratorio Nacional de Salud Pública. Febrero 1992

86. Secretaría de Salud. 1993. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. Marzo 1993 No 3 México.
87. Secretaría de Salud. 1993. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dirección General de Epidemiología Abril 1993. No 4 México
88. Secretaría de Salud. 1993. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. Mayo 1993. No. 5. México
89. Secretaría de Salud. 1993. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. Junio 1993. No 6 México
90. Secretaría de Salud. 1993. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología Julio 1993. No 7. México.
91. Secretaría de Salud. 1993. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas". Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología Agosto 1993. No. 8. México
92. Secretaría de Salud. 1993 "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dirección General de Epidemiología Septiembre 1993. No. 9. México.
93. Secretaría de Salud. 1993 "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dirección General de Epidemiología. Octubre 1993. No 10. México.
94. Secretaría de Salud. 1994. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dirección General de Epidemiología. Enero 1994 No. 1. México
95. Secretaría de Salud. 1994. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas". Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dirección General de Epidemiología Febrero 1994 No 2. México
96. Secretaría de Salud. 1994. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas infecciosas". Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dirección General de Epidemiología. Marzo 1994. No 3. México

- 97 Secretaría de Salud. 1994. "Boletín Mensual: Cólera/Diarreas Infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. Abril 1994 No. 4. México
98. Secretaría de Salud. 1994 "Boletín Mensual Cólera/Diarreas Infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dirección General de Epidemiología Junio 1994 No. 6. México
- 99 Secretaría de Salud. 1995 "Epidemiología". Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Subsecretaría de Servicios de Salud Dirección General de Epidemiología. Vol 12 No 4 Semana 29.
- 100 Secretaría de Salud. 1995 "Epidemiología". Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Subsecretaría de Servicios de Salud. Dirección General de Epidemiología Vol. 12 No. 25. Semana 50.
101. Secretaría de Salud. 1995. "Epidemiología" Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Subsecretaría de Servicios de Salud. Dirección General de Epidemiología Vol. 12 No 27 Semana 52
102. Secretaría de Salud. 1997. "Epidemiología". Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Subsecretaría de Servicios de Salud Dirección General de Epidemiología. Vol 14 No. 12. Semana 12
- 103 Secretaría de Salud. 1997 "Epidemiología" Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Subsecretaría de Servicios de Salud. Dirección General de Epidemiología. Vol. 14 No. 35 Semana 35.
- 104 Secretaría de Salud. 1997. "Epidemiología" Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Subsecretaría de Servicios de Salud. Dirección General de Epidemiología Vol. 14. No. 53. Semana 53.
- 105 Secretaría de Salud. 1998 "Epidemiología". Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Subsecretaría de Servicios de Salud Dirección General de Epidemiología Vol. 15 No. 22. Semana 22
106. Secretaría de Salud. 1998. "Epidemiología" Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Subsecretaría de Servicios de Salud Dirección General de Epidemiología. Vol. 15 No 23. Semana 23.
107. Secretaría de Salud. 1998. "Epidemiología" Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Subsecretaría de Servicios de Salud Dirección General de Epidemiología Vol 15. No. 28 Semana 28

- 108 Secretaría de Salud. 1992 "Boletín Mensual: Cólera/ Diarreas infecciosas" Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología. Enero 1992 No 1. México
- 109 Sharma C. 1997. "Molecular Characterization of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor Strains Isolated Between 1992 and 1995 in Calcutta, India. Evidence for the Emergence of a New Clone of the El Tor Biotype". The Journal of Infectious Diseases. 175 1134-1141.
- 110 Shuval H. 1993. "Investigation of typhoid fever and cholera transmission by raw wastewater irrigation in Santiago, Chile" Wat. Sci. Tech 3-4: 167-174
- 111 Sigma Product Information Sheet. "Cholera Toxin B Subunit". <http://s.ai.com/sigma/proddata/c9903.htm>
112. Singleton F., Attwell R., Jangi M., Colwell R. 1982. "Influence of Salinity and Organic Nutrient Concentration on Survival and Growth of *Vibrio cholerae* in Aquatic Microcosms". Applied and Environmental Microbiology. May. 1982. p. 1080-1085
113. Singleton F.L. 1982 "Effects of Temperature and Salinity on *Vibrio cholerae* Growth" Applied and Environmental Microbiology. Nov. 1982 p. 1047-1058.
114. Sirajul M. "Long- term persistence of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the mucilaginous sheath of a blue- green alga, *Anabaena variabilis*". Journal of Tropical Medicine and Hygiene 93: 133-139
- 115 Sirajul M. 1989. "Attachment of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to various freshwater plants and survival with a filamentous green alga, *Rhizoclonium fontanum*". Journal of Tropical Medicine and Hygiene 92 396-401
- 116 Sirajul M. 1990. "Increased Toxin Production by *Vibrio cholerae* O1 during Survival with a Green Alga, *Rhizoclonium fontanum*, in an Artificial Aquatic Environment". Microbiology. Immunology 7 557- 563.
117. Sistema Nacional de Salud. México. 1991 "Vigilancia Epidemiológica Internacional" Dirección General de Epidemiología Boletín Trimestral. Vol. 5 No 15. Noviembre 1991.
118. Sistema Nacional de Salud. México. 1991. "Vigilancia Epidemiológica Internacional" Dirección General de Epidemiología Boletín Trimestral. Vol 5 No 14 Abril 1991.
119. Sisti M., Albano A. and Brandi G. 1998. "Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy" Letters in Applied Microbiology. 26. 347-351.

- 120 Springs D. 1990 "Summary of the 25th United States- Japan Joint Conference on Cholera and Related Diarrheal Diseases". The Journal of Infectious Diseases 162: 584- 590.
- 121 Tamplin M. and Colwell R. 1986. "Effects of Microcosm Salinity and Organic Substrate Concentration on Production of *Vibrio cholerae* Enterotoxin". Applied and Environmental Microbiology Aug 1986. p 297-301.
- 122 Thrive @ health. 1996. "How cholera became a killer"
<http://www.thriveonline.com/@@EN11UcJAZW7>
- 123 Timothy L. 1989 "*Vibrio cholerae* Wound infection Acquired in Colorado". The Journal of Infectious Diseases. 6: 1083.
- 124 U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition From the Centers for Disease Control and Prevention. 1991. "Cholera Associated with Imported Frozen Coconut Milk—Maryland, 1991" Morbidity and Mortality Weekly Report Centers for Disease Control and Prevention MMWR 40(49): Dec. 13 <http://vm.cfsan.fda.gov/~MOW/cocochoi.html>
- 125 Varela P. 1994 "Direct Detection of *Vibrio cholerae* in Stool Samples" Journal of Clinical Microbiology. May. 1994. p. 1246-1248
126. Vess. R. 1993 "The colonization of solid PVCsurfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms" Journal of Applied Bacteriology 74 215-221
- 127 Vigilancia Epidemiológica Internacional. 1989. "Hoja Epidemiológica Países Infectados por Cólera, Fiebre Amarilla y Peste" 1: 21-23
- 128 Vigilancia Epidemiológica Internacional. 1990 "Cólera. Investigaciones sobre la Vacunación Anticolérica" 13: 103- 104
129. Vila J. 1992 "A one- minute oxidase test to detect *Vibrio* strains isolated from cultures on thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) medium" Journal of Applied Bacteriology. 72: 490- 492
- 130 Wiström J. 1987. "A Case of Non-O1 *Vibrio cholerae* Bacteremia from Northern Europe" The Journal of Infectious Diseases. 4. 732.
131. www.nbc-med.org/FMS/medman/cap1.htm. 1998. "Bacterial Agents".
- 132 Xu H.S., Roberts N., Singleton F.L., Attwell R.W., Grimes D.J. and Colwell R.R. 1982. "Survival and viality of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment" Microbial Ecology. 8: 313-323

133 Yamamoto T. 1988 "*Vibrio cholerae* O1 Adherence to Villi and Lymphoid Follicle Epithelium: In Vitro Model Using Formalin-Treated Human Small Intestine and Correlation between Adherence and Cell-Associated Hemagglutinin Levels". *Infection and Immunity* Dec 1988 p. 3241- 3250.

134 Yamamoto T. 1988 *Vibrio cholerae* Non O1: Production of Cell - Associated Hemagglutinins and In vitro Adherence to Mucus Coat and epithelial Surfaces of de Villi and Lymphoid Follicles of Human Small Intestines Treated with Formalin" *Journal of Clinical Microbiology* Oct. 1988 p 2018-2024.