



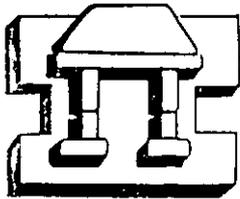
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES CAMPUS IZTACALA

DETERMINACION DEL GRADO DE CONTAMINACION FECAL EN PLAYAS DE RECREO DEL PUERTO DE VERACRUZ, MEXICO, EN BASE AL AISLAMIENTO CUANTITATIVO DE LOS GENEROS Salmonella y Shigella

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: LICENCIADO EN BIOLOGIA PRESENTAN: ANGELICA GARDUÑO MARIA ELENA PEREZ MARTINEZ





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**A MI MADRE**

**María Esther Garduño Carrillo**

Por su gran amor, comprensión y apoyo en todos los momentos importantes de mi vida

**A MI HIJA**

**Claudia Angélica Hernández Garduño**

Por ser el más bello y preciado motivo para superarme y seguir adelante

**A CARLOS**

Esperando con mucha fe todo lo bueno que habrá de venir para ambos

**A MIS HERMANOS:** Tony y Noemí, Pili y Juan, Manuel y Elvira, Guillermina y sus hijos.

**A MIS SOBRINOS:** Elsa Alejandra y Enrique y sus bellas hijas Pamela y Abigail, María de Lourdes (Lulú), Silverio, Juan Cuetzpallin, Mayra, Ulises, Adriana, Miguel y Sebastián

**A MIS AMIGOS DE LA ENEP IZTACALA:** Lorena Vázquez y Raúl Jiménez y sus hijos, Mario Crisóstomo y su familia, Antonio Ortíz, Hugo Galindo, Elvia Závala y Carlos Roa y sus hijos, Martha Flores y familia, Enrique Flores Montiel y familia, Alejandro Magaña, Juan Arturo Ramos y familia, Ma. Elena Pérez Martínez, Teodora Rosas, Raúl Rivera, Alma Rosa González, Verónica, Erika y Marco, Alfonso Soler, Juan, Zahaed y un larguísimo etcétera.

**A MIS AMIGOS:** Carmen Miranda, Jorge Valencia, Gustavo Mejía, Paul, Maricarmen Calderón, Marisol Vázquez y su familia, Jorge Meléndez, Paulina Ruiz, María de la Paz Sanchez, Minerva Herrera, etc.

Angélica Garduño

DOY GRACIAS A DIOS NUESTRO SEÑOR CREADOR DEL UNIVERSO POR HABERME DADO LA ENERGÍA SUFICIENTE PARA TERMINAR

AGRADEZCO EL APOYO RECIBIDO POR MI FAMILIA.

A MI PADRE FINADO EN DONDE SE ENCUENTRE ESPERO QUE LA ALEGRÍA QUE SIENTO LA COMPARTA CONMIGO.

MI MADRE PERDONE LA FALTA DE ATENCIÓN QUE NO LE PRESTE DURANTE MIS ESTUDIOS Y A PESAR DE ELLO SIEMPRE ME ALENTÓ A SEGUIR ADELANTE.

A MIS HERMANOS Y SOBRINOS LES PIDO COMPARTAN CONMIGO ESTE TRIUNFO Y LES DOY LAS GRACIAS POR LA AYUDA QUE ME BRINDARON.

DE MODO ESPECIAL A MI SOBRINA ROSARIO QUE EN LOS MOMENTOS MAS DIFICILES SIEMPRE HA ESTADO CONMIGO, Y EN FIN A TODOS Y A CADA UNO DE ELLOS QUE DE UN MODO U OTRO SIEMPRE ME DEMOSTRARON SU AMOR, COMPRENSIÓN Y SU CONFIANZA GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS.

A MIS AMIGOS DE IZTACALA LES AGRADEZCO QUE DE MULTIPLES MANERAS ME AYUDARON YA QUE ME DIERON FUERZA PARA TERMINAR

MARÍA ELENA PÉREZ MARTÍNEZ.

## AGRADECIMIENTOS

A nuestra asesora de tesis la Dra. Elvia María Gallegos Neyra, por sus acertadas observaciones, comentarios, sugerencias, amabilidad y apoyo. Gracias.

Al Biol. Jesús Medina Soto por su asesoría inicial en el presente trabajo, pero sobre todo por su amistad. Gracias.

A nuestros sinodales:

Q.F.B. Esperanza Robles Valderrama

Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez

Biol. Graciela Molina González

Y muy especialmente al M. en C. Agustín Ruíz Cabrera por sus atinados comentarios y observaciones. Muchas gracias.

A todos y todas las personas que, de alguna manera, han intervenido y apoyado en la elaboración de la presente tesis: Alfonso Lugo Vázquez por su amable apoyo en la parte estadística, Biol. Arturo Calderón Vega, Rosa Ma. Lobera, Ana Cecilia Dávila, Arturo Ruíz por su ayuda en computación y muy especialmente a la M. en C. Beatriz Flores por su interés e impulso, así como sus acertadas observaciones a nuestro trabajo.

# CONTENIDO

## LISTADO DE ABREVIATURAS

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. JUSTIFICACIÓN	3
2.2. ANTECEDENTES	4
2.3. FUNDAMENTO TEÓRICO	
3. OBJETIVOS	25
4. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	26
5. METODOLOGÍA	27
6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
7. CONCLUSIONES	57
8. RECOMENDACIONES	59
9. BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXO	70

## LISTADO DE ABREVIATURAS

ct	coliformes totales
cf	coliformes fecales
ef	estreptococos fecales
NMP	Número Más Probable
LSD	Comparación múltiple de medias
ANDEVA	ANÁLISIS DE VARIANZA
MG	Media Geométrica
EPA (siglas en inglés)	Agencia para la Protección del Medio Ambiente
NTAC (siglas en inglés)	Comité Asesor Técnico Nacional
EEC (siglas en inglés)	Concilio de la Comunidad Económica Europea
L	Lactosa
G	Glucosa
C	Citrato
U	Urea
RM	Rojo de Metilo
VP	Vogues Proskauer
M	Motilidad
I	Indol
H <sub>2</sub> S	Ácido Sulfhídrico
Sc	Sacarosa
Mn	Manitol
ufc	Unidades formadoras de colonias
SS	Agar <i>Salmonella- Shigella</i>

## 1. RESUMEN

Se aplicó la combinación de dos técnicas bacteriológicas (Filtro de Membrana y Enriquecimiento en Tubos Múltiples) para el aislamiento y cuantificación de los géneros *Salmonella* y *Shigella*, y sólo la técnica de los tubos múltiples para los grupos de coliformes y estreptococos procedentes de cinco playas: Boca del Río, Mocambo, Villa del Mar, Puerto, Norte, localizadas en el Puerto de Veracruz, México.

Se realizaron seis muestreos durante el año de 1992, en los que se tomaron 255 muestras para aplicarles la prueba de coliformes totales (ct), coliformes fecales (cf) y estreptococos fecales (ef); asimismo, en 85 muestras se buscó al género *Salmonella*, que fue aislado en un 21% de éstas, mientras que el género *Shigella* fue encontrado en 25 (31%).

Los índices de calidad que establecen la cantidad permitida de coliformes totales (500-1000/100ml; OMS, 1989), coliformes fecales (200/100ml; SEDUE, 1989) y estreptococos fecales (100/100ml; OMS, 1989) en aguas de playas de uso recreativo por contacto directo fueron, en todos los casos, rebasados.

Mediante la aplicación de la proporción cf/ef, se determinó que la contaminación en tres de las cinco playas analizadas (Boca del Río, Mocambo y Puerto) tiene principalmente un origen fecal humano. Mientras que, en la playa Norte y Villa del Mar, la fuente de contaminación fue materia fecal mixta, es decir, tanto animal como humana. Este hecho, aunado a la sola presencia de los géneros *Salmonella* y *Shigella*, patógenos para el hombre y otros animales, evidencian un peligro potencial para la salud de los bañistas en las aguas analizadas.

## 2. INTRODUCCIÓN

Una playa natural es cualquier línea de costa o ribera de una corriente, lago, océano, pantano o manantial termal utilizada con fines recreativos. Son numerosos los gérmenes patógenos que pueden transmitirse al hombre a través de la utilización con fines recreativos de aguas dulces y saladas susceptibles de contaminación por aguas residuales<sup>5</sup>.

Así, las aguas costeras reciben descargas de aguas residuales, de origen doméstico, industrial y de drenaje de campos agrícolas. Este hecho repercute en la calidad de las aguas que son destinadas para diferentes usos y que afectan la preservación de la flora y fauna marina (arrecifes, viveros de crustáceos y peces; sitios de reproducción y desarrollo de aves marinas), la pesca comercial y los lugares recreativos de contacto directo (natación, buceo, esquí, sorfeo, etc.) e indirecto (paseo en bote y playa)<sup>69, 92</sup>. Lo anterior ha conducido al aumento de patógenos en el medio acuático y en aquellas aguas marinas adyacentes a las desembocaduras oceánicas<sup>71</sup>. Brock en 1965 señaló que comúnmente, el agua superficial de bahías y estuarios llega a contener millones de bacterias en cada mililitro de agua, una gran proporción de éstas pueden ser de origen entérico, procedentes del tracto intestinal del hombre y de los animales, lo cual es una indicación de contaminación fecal.

Kampelmacher y Van Norle Jansen en 1970 indicaron que en las aguas negras suelen estar presentes bacterias patógenas principalmente de los géneros *Salmonella* y *Shigella* causantes de enfermedades importantes tales como tifoidea, fiebres entéricas, gastroenteritis, intoxicaciones alimenticias, entre otras y que pueden ser adquiridas por ingestión al nadar en aguas recreativas contaminadas por los efluentes de aguas de desecho.

Romero y Rodríguez en 1982 reportaron que el número de salmonelas presente en las heces fecales de individuos enfermos puede ser de 100 000 hasta 100 000 000 por gramo de materia fecal. Aunque los tratamientos que se dan a las aguas negras reducen el contenido de patógenos y de nutrientes bacterianos, la población de *Salmonella* spp en aguas estuarinas y marinas puede variar de 1 a 1 000 por litro.

En la evaluación microbiológica de la calidad del agua, se realizan pruebas de laboratorio que permiten estimar la magnitud de la contaminación bacteriana de

origen fecal.. Las pruebas sistemáticas consisten en la determinación no de los patógenos, sino de los indicadores bacteriológicos de contaminación que se utilizan para determinar la calidad del agua, teniendo como indicadores preferentes a los coliformes fecales (cf). Tobin y Ward en 1984 recomendaron al grupo de los estreptococos fecales (ef) como elemento de prueba complementario . Aunque algunos autores como Moore en 1975, Jabar y col. en 1983 y Venkateswaran y Hashimoto en 1988 opinaron que el indicador real para determinar la contaminación fecal en el agua es la presencia del patógeno mismo.

## 2. 1. Justificación

El puerto de Veracruz es de gran importancia para el país debido a la gran actividad comercial y turística nacional que se desarrolla en él. En las playas de este puerto se concentran significativos núcleos humanos para su recreación, los cuales carecen de una información adecuada sobre el problema de la contaminación bacteriana. Por lo anterior, el desarrollo de esta investigación y los datos emanados de ella son de interés, sobre todo en los aspectos relacionados con la salud pública.

Asimismo, se hizo patente la necesidad de realizar una evaluación del grado de contaminación bacteriana causada por las diversas fuentes que derraman aguas negras en esta localidad las cuales provocan graves deterioros en la calidad de aguas que son destinadas para uso recreativo.

Se investigó con principal énfasis la presencia de bacterias patógenas tales como *Salmonella* spp y *Shigella* spp, ya que algunas de sus especies pueden ser causantes de diversas enfermedades en los pobladores y visitantes de estas áreas.

El presente trabajo da la pauta para la realización de estudios ecológicos y epidemiológicos que lo complementen para que, a través del uso racional de los recursos hídricos naturales, se preserven las condiciones normales y satisfactorias para ser ofrecidos a las futuras generaciones.

## 2. 2. Antecedentes

Desde el siglo pasado se han registrado descargas de aguas residuales en mares de recreo. En 1949 Stevenson publicó un trabajo en el que trató de establecer una relación entre la calidad de diversos cuerpos de agua recreativa y la salud de los bañistas que las frecuentaban. Después de tres días de nadar en aguas de algunos ríos, lagos y lagunas en la región de los grandes lagos de Chicago, Illinois, hasta un 12.2% de los nadadores en la semana siguiente presentaron molestias en ojos, oído, nariz y garganta (68% de la incidencia total de enfermedades) así como disturbios gastrointestinales (15%). El promedio logarítmico en densidad de coliformes en esta agua fue de 2 300/100 ml.

Moore, en 1959 reportó el aislamiento de *Salmonella* spp en agua de mares ingleses, en los cuales fueron aislados varios serotipos del género *Salmonella*, notablemente *S. Paratyphi*. La proporción de resultados positivos para *Salmonella* spp se incrementó a 13.3% en muestras con menos de 1000 coliformes por 100 ml, y a 40.1 % en muestras con más de 10 000 coliformes en 100 ml

Van Donsel y Geldreich en 1971 reportaron un estudio realizado en 48 muestras de sedimento y agua de ríos, lagos y playas recreativas, donde 22 de las muestras de depósitos resultaron positivas en la búsqueda de *Salmonella* spp, que estuvo representada por 23 de sus serotipos. Mientras que sólo 4 muestras de agua resultaron positivas para este género y su densidad se encontró en menor proporción. Asimismo, los cf se registraron en bajas densidades (10/100 ml).

Por otra parte, las aguas del Río Colorado fueron analizadas por Cherry y col. en 1972 en las cuales fueron hallados 48 serotipos de *Salmonella* spp y 2 de *Arizona* spp en 121 muestras .

Cinco lagos de Ontario, Canadá se analizaron durante 1974 y 1977 estableciendo una relación entre la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en agua recreacional y casos locales de otitis externa en nadadores de estas aguas<sup>85</sup>.

Rosenburg y col. en 1976 documentaron 31 casos de shigelosis en personas que habían nadado en el río Mississippi, supuso que la probable fuente de infección fueron las descargas de aguas residuales en dicha corriente.

Por otra parte, en el río Guayas y los esteros Cobina y el Muerto en Guayaquil, Ecuador, se detectó una alta población bacteriana cuando la concentración de oxígeno disuelto bajó, mientras que la demanda bioquímica de oxígeno se incrementó así como la concentración de elementos nutritivos y materia orgánica<sup>94</sup>.

Cabelli y col. en 1979 reportaron un análisis microbiológico-epidemiológico realizado en playas de New York, en el que se observó gran relación de enfermedades gastrointestinales, respiratorias y otras con la natación en estas playas. Asimismo, la Bahía de Santa Martha en Colombia se monitoreó para determinar su contaminación fecal entre julio de 1979 y marzo de 1980. Los indicadores usados para este fin fueron coliformes totales (ct), cf y ef. Además, se investigó la presencia de *Salmonella* spp en aguas recreacionales de esta bahía. Los resultados mostraron una severa contaminación, sobre todo en la zona de descarga de desechos<sup>31</sup>.

La contaminación bacteriana ha sido estudiada en lagunas costeras de México, aguas colectadas en la laguna Balchacah, laguna Puerto Rico y Boca de Atasta (sistemas fluvio-lagunares asociados a la laguna de Términos en Campeche) se analizaron microbiológicamente para determinar el contenido de bacterias coliformes y patógenas. Se obtuvieron cuentas hasta de 24 000 coliformes en 100 ml de muestra y aunque no se encontró evidencia de *Salmonella* spp, los resultados indicaron que hay contaminación fecal, y por consiguiente, riesgos a la salud humana<sup>69</sup>.

Estruch y col. en 1982 publicaron los resultados de un estudio realizado de junio de 1980 a septiembre de 1981 en 260 muestras de agua de río y presa, así como de aguas residuales de un hospital, de las cuales se aislaron 172 cepas con 18 serotipos diferentes de *Salmonella* spp.

El estudio bacteriológico del agua en el sistema lagunar del Carmen-Machana en Tabasco, México, reportado en 1982 por Romero y Rodríguez demostró que los ct y cf variaron de 15 a 240/100 ml y de 22 a 20/100 ml respectivamente. Los datos concernientes al aislamiento de *Salmonella* spp en agua del río Adige en Italia se dieron a conocer por Ferrari y Brighenti en 1983 y mostraron que la más alta incidencia fue para *Salmonella typhimurium* (20.4%), *Salmonella*

*agona* (16.3%) y *Salmonella infantis* (12.2%). Asimismo, Schoebitz y Montes en 1984 publicaron un análisis del río Valdivia en Chile, realizado en junio de 1983, en el que se registró que de 96 muestras se aisló a *Salmonella* spp en 28% de ellas. Los cf se contaron de 53 a 149 en 100 ml y el índice cf/ef fue igual a 4.0, por lo que el origen de la fuente de contaminación se determinó como fecal humana.

Por otra parte, Singh en 1985 dio a conocer los análisis fisicoquímicos y bacteriológicos realizados en el río Ganga de Bhagalpur, en la India, durante septiembre de 1982 y agosto de 1983, de los cuales se desprende que la contaminación química fue insignificante, mientras que los valores fisicoquímicos mostraron altos niveles, lo mismo que la contaminación bacteriológica:  $420 \times 10^3$  cf/100 ml,  $9.6 \times 10^3$  ef/100 ml,  $108 \times 10^3$  cf/100 ml y  $70 \times 10^3$  *Escherichia coli*/100 ml. Concluyó así que la contaminación bacteriana es de origen fecal. Asimismo, se registró la presencia de patógenos como *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp y *Staphylococcus aureus*

En 1985 Menon reportó un estudio en el que se determinó la calidad bacteriológica de las aguas de desecho del río Cornwallis, Canadá, antes y después de su tratamiento en 7 plantas de procesamiento situadas a un lado del río. Los resultados mostraron la incidencia de cf, ef, *Aeromonas hydrophilia* y *Salmonella* spp tanto en las descargas de agua de desecho de las plantas de tratamiento evaluadas, como en el agua del río casi en la misma proporción que en las aguas residuales antes de ser tratadas.

Un estudio realizado por Rosas y col. en 1985 en el Golfo de México en 23 muestras de ostras (20 especímenes de cada muestra) procedentes de 4 áreas de crecimiento y otras 44 muestras colectadas en mercados de comida marina, reveló altas cuentas de bacterias que excedieron en mucho los índices de sanidad establecidos para las zonas de crecimiento, asimismo, la carga bacteriana en las muestras de comida marina se enumeraron desde  $2.7 \times 10^3$  hasta  $9.5 \times 10^4$  cf en 100 ml. Aunque no se detectó a *Salmonella* spp, se encontraron dos especies que, bajo determinadas condiciones, pueden ser potencialmente patógenas: *Escherichia coli* y *Plesiomonas shigelloides*.

Durante el periodo de enero a diciembre de 1985 se examinaron 53 muestras de aguas de playas localizadas en diferentes áreas del Municipio de Río de Janeiro en Brasil, se aisló a *Salmonella* spp en 13.2% de las muestras y predominaron serotipos pertenecientes al género I representadas por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella agona* y *Salmonella oranienburg* principalmente<sup>68</sup>.

Srikantaiah y col. en 1985 registraron la presencia de *Salmonella* spp en 70 muestras de agua, 71 de sedimentos y 37 de moluscos en aguas estuarinas como resultado de un monitoreo llevado a cabo durante 18 meses en las costas Mangalore en la India.

Ramamurthy y Natarajan en 1987 reportaron la distribución y supervivencia de *Salmonella* spp en diferentes alimentos procedentes de aguas estuarinas de la India, se analizaron 931 muestras de agua, sedimento, plancton, peces, crustáceos y moluscos y todos resultaron positivos para el patógeno, siendo peces y crustáceos frescos donde más persistencia o tiempo de sobrevivencia se encontró.

También en 1987 Rodríguez y Botello describieron el NMP de cf hasta de  $24 \times 10^3$  en 100 ml. de agua en algunos sistemas acuáticos del sudeste de México.

Makintubee y col. en 1987 documentaron un brote de diarrea en Oklahoma, EU, ocasionado principalmente por *Shigella sonnei* en 20 personas que nadaron y que reconocieron haber tomado agua mientras lo hacían. En este mismo año Delgadillo y Orozco reportaron el aislamiento de *Salmonella* spp y *Shigella sonnei*, acompañadas de bacterias coliformes típicas. Los aislamientos se relacionaron con la cercanía a los efluentes de descargas domésticas.

En julio y agosto de 1988 una epidemia de gastroenteritis afectó a 44 de 60 personas (73%) que nadaron en playas de Los Angeles, EU, hallándose gran relación entre esta enfermedad y el uso de esta agua<sup>87</sup>. En 1988 también Venkateswaran y Hashimoto publicaron un estudio en el que se determinó la supervivencia de *Salmonella* spp en agua y su correlación con microorganismos indicadores de contaminación bacteriana en medios acuáticos (ct, cf y ef), dicho estudio se realizó durante un año en aguas superficiales de río y de mar en la ciudad de Fucuyama, Japón. Las conclusiones sugirieron que la enumeración directa de *Salmonella* spp es un buen indicador de la calidad del agua.

Un análisis estadístico aplicado a los resultados que 5 laboratorios franceses obtuvieron a lo largo de 3 años monitoreando la contaminación bacteriana en aguas de recreo, mostró que los índices establecidos para determinar la calidad del bacteriológica de este tipo de aguas fueron, la mayoría de las veces, rebasados<sup>55</sup>. En 1989, Reasoner y Geldreich divulgaron la detección de

bacterias en aguas dulces recreativas utilizando distintos medios de cultivo y dos temperaturas de incubación diferentes.

Iyer y Varma en 1990 dieron a conocer la contaminación por *Salmonella* spp en camarones en proceso de congelación y concluyeron que las principales fuentes de ésta son las aguas de pantano, la arena y aguas de costas marinas, aguas procesadas y el hielo en que se congela a estos crustáceos.

En una investigación de Sanin y col. en 1994 se observó que los procesos de congelación y descongelación contribuyen a reducir la capacidad patógena de microorganismos como *cf*, *Salmonella* spp, *ef*, poliovirus, helmintos y protozoarios en mayor proporción que la alcanzada en plantas de tratamiento de aguas de desecho.

Por último, en 1994, Tobías y Heinemeyer citaron un monitoreo en canales de drenaje que desembocan en el río Em, en el Mar del Norte, en el que se encontró una gran incidencia de *Salmonella* spp en muestras de agua (12.3%) y de sedimentos marinos (7%).

## **2. 3. Fundamento Teórico**

### **2.3.1. Indicadores bacteriológicos de la calidad del agua**

Los parámetros indicadores de la calidad del agua son aquellos que permiten conocer los niveles de contaminación de cualquier tipo de agua, sin importar su uso o procedencia. Además de dar una idea acerca de la condición bacteriológica de las aguas residuales, los parámetros indicadores sirven como criterios para determinar los procedimientos más adecuados para su tratamiento, en caso necesario, y como base de diseño para los equipos de depuración. Para su estudio, estos parámetros se clasifican en: físicos, químicos y biológicos<sup>17</sup>.

El potencial de enfermedades producidas en aguas recreativas es estimado comúnmente a través del uso de bacterias indicadoras que se cree están relacionadas con la presencia de patógenos. En general, estos indicadores y sus valores límites recomendados han sido adoptados usando los métodos estándar existentes para el análisis de desechos sanitarios en agua <sup>61</sup>.

Determinar todos los microorganismos patógenos en una muestra de agua es complicado por su gran diversidad y variabilidad en número, haciendo difícil su

detección. Por lo anterior, se utilizan microorganismos indicadores que son de fácil detección y en tiempos razonablemente cortos<sup>15, 16</sup>. En este contexto, los ct y los cf han sido los indicadores de calidad del agua más utilizados<sup>4,5</sup>, siendo estos últimos los más reconocidos ya que se asume que el incremento de infecciones por patógenos en el agua esta en relación con el incremento en la densidad de cf<sup>65</sup>.

Venkateswaran y Hashimoto en 1988 citan específicamente la enumeración directa de *Salmonella* spp como el método más apropiado para determinar la calidad del agua marina, descartando así a los ct, los cf y los ef que son los indicadores usados por excelencia en este tipo de análisis. Moore (1975) es uno más de los investigadores que comparten este punto de vista, ya que afirma que los cf sólo indican una contaminación reciente por su rápida mortalidad en el mar y, además, que son pocas las evidencias de una relación entre el número de éstos en el agua de mar y la propagación de enfermedades.

#### **a) Características de un indicador**

Según Clausen y col. (1977) la selección de un organismo indicador se basa en los siguientes criterios:

- Debe estar presente siempre que estén los patógenos.
- Su densidad debe tener relación directa con el grado de contaminación fecal.
- Debe sobrevivir en el agua más tiempo que los patógenos, pero su desaparición debe ser inmediatamente posterior a la de aquellos.
- No debe multiplicarse en el agua.
- Debe estar ausente en aguas bacteriológicamente potables.
- No debe ser patógeno para el hombre ni animales domésticos.
- Las técnicas para su análisis deben ser sencillas, rápidas, aplicables en cualquier tipo de aguas y no deben presentar interferencias por otras bacterias.

#### **b) Ventajas y desventajas del uso de indicadores**

Las ventajas de los ct como indicadores son:

- Su ausencia es evidencia de un agua bacteriológicamente segura..
- Se presentan en mayor numero que los microorganismos patógenos de origen intestinal..
- Sobreviven por periodos de tiempo más prolongados que los microorganismos patógenos de origen intestinal..
- Requieren de técnicas sencillas para su identificación..

Como puede apreciarse, los **ct** cumplen con las características de un indicador ideal, sin embargo existen algunas desventajas debido a las características del grupo, que se mencionan a continuación:

- Algunos miembros del grupo de los **ct** están ampliamente distribuidos en la naturaleza.
- Algunas especies son capaces de reproducirse en el ambiente extraintestinal.
- Existen bacterias que interfieren en el análisis.

Debido a estas desventajas, puede considerarse que en aguas residuales los **ct** tienen poco significado sanitario, y que su existencia no es necesariamente indicadora de la presencia de patógenos, sin embargo, son importantes en los procesos de tratamiento, potabilización y desinfección del agua. *Salmonella* spp ha sido aislada de agua que contenía 2.2 coliformes fecales en 100 ml. Por lo tanto los **cf** y **ef** son indicadores más exactos de la presencia de contaminación fecal en aguas costeras.

Las ventajas de los **cf** como indicadores de contaminación son:

- Pueden estar ausentes si la contaminación no es de origen fecal.
- Sobreviven menos tiempo que los **ct**, por lo que permiten suponer contaminación reciente si se encuentran en concentraciones altas.
- Son más exigentes que los **ct** para reproducirse en el ambiente extraintestinal.
- Los procedimientos de laboratorio para su cuantificación son relativamente sencillos.
- Su presencia es indicio de la posible presencia de otros organismos patógenos.
- Su densidad es medida proporcional aproximada de la contaminación fecal.
- Se eliminan en las heces en mucho mayor número que los patógenos.
- Persisten más tiempo en el agua que los patógenos y desaparecen inmediatamente después de ellos.
- En general, no son patógenos para el hombre y pueden determinarse cuantitativamente por procedimientos sencillos y relativamente en corto tiempo.

Las desventajas del uso de los **cf** como indicadores son:

- Su ausencia no necesariamente evidencia potabilidad bacteriológica, puesto que hay algunos patógenos (*Clostridium* spp y *Pseudomonas* spp) que pueden estar presentes cuando no hay coliformes.

- Algunas cepas se reproducen en el agua contaminada.
- Algunas bacterias pueden interferir con las pruebas (*Pseudomonas* spp).
- Algunas cepas de *Escherichia coli* y de *Klebsiella* spp son patógenas para el hombre<sup>17, 20, 90</sup>.

### 2.3.2. Grupos indicadores

Al estudiar los diferentes grupos de bacterias de origen intestinal, se llegó a la conclusión de que ninguno se ajustaba a todas las características de un indicador ideal, sin embargo se encontraron dos grupos que cumplían los requisitos más importantes y que fueron designados como indicadores, éstos son los coliformes, que incluyen a tres géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*) y el grupo de los enterococos formado por 5 especies del género *Streptococcus*.

Así, los grupos de indicadores de la calidad bacteriológica del agua y que se usan en pruebas de rutina son:

- a) **Grupo coliforme**
  - Coliformes totales (ct)
  - Coliformes fecales (cf)
- b) **Estreptococos fecales**
- c) **Otros**

#### a) Grupo coliforme

Grupo que se distingue del resto de las enterobacterias en que fermenta la lactosa rápidamente a 35°C y por tener como hábitat natural el tracto intestinal. Aunque investigaciones posteriores demostraron que algunas especies de estos géneros también son saprófitas de vida libre y tienen la capacidad de fermentar la lactosa a 45°C, por lo que fueron reubicadas y reclasificadas, de este modo, el grupo coliforme se divide en dos subgrupos: los coliformes totales (ct) y los coliformes fecales (cf), que es un subgrupo de los ct.

#### Coliformes totales (ct)

Son bacilos cortos, gramnegativos, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, fermentan la lactosa con producción de ácido y gas en 24 hrs. a 35°C como ejemplo se encuentran los géneros *Escherichia* sp, *Klebsiella* spp y *Enterobacter* spp<sup>4, 5</sup>. Robertson (1984) incluye a *Citrobacter* spp en este grupo. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, agua, suelo y

vegetación de manera natural y no sólo como contaminantes. Además forman parte de la flora habitual del intestino de animales de sangre caliente.

### **Coliformes fecales (cf)**

Comparten las características anteriores pero también tienen la propiedad de fermentar lactosa a 44.5°C, por ejemplo *Escherichia coli*. En este grupo Robertson en 1984 también incluye a *Klebsiella* spp, que aunque es omnipresente (cosmopolita), prolifera en agua marina rica en nutrientes y es un patógeno oportunista. Este mismo autor señala que la calidad del agua recreacional marina ha sido determinada hasta ahora usando a los cf como indicadores de contaminación fecal y que estos son los indicadores reconocidos ya que se asume que el incremento de infecciones por patógenos en el agua está en relación con el incremento en la densidad de cf.

Es indispensable determinar la concentración de bacterias coliformes presentes en el agua contaminada por materia fecal para así indicar el grado de contaminación en dicho cuerpo. Si la contaminación por materia orgánica es elevada puede haber multiplicación de dichas bacterias, sin embargo, de manera general, su nivel de sobrevivencia es bajo y tienden a disminuir significativamente en ambientes naturales<sup>34</sup>.

### **Relaciones entre coliformes fecales y *Salmonella* spp**

Van Donsel y Geldreich en 1971 reportan que el género *Salmonella* fue aislado en un 19% de las muestras de sedimento cuando la densidad de cf en el agua estuvo entre 1 y 200 por cada 100 ml; en un 50% cuando se presentaron de 201 a 2000 de cf por 100 ml y en un 80% cuando había más de 2000 de cf en 100 ml de agua. Si se compara el número de *Salmonella* spp en sedimento con el número de cf en el resto del agua, la razón media es de 1:150.

Geldreich en 1979 compiló y relacionó las densidades de cf con la presencia de *Salmonella* spp en estuarios. Cuando la densidad de cf fue igual o menor a 200 en 100 ml, *Salmonella* spp apareció entre 6.5 a 31% de las muestras. Pero cuando la densidad de cf fue mayor o igual a 1000 en 100 ml, la frecuencia de aparición de *Salmonella* spp incrementó entre 60 y 89 % de las muestras estuarinas.

Similarmente, en la bahía Chesapeake en EU, Robertson (1984) registró que la densidad de *Salmonella* spp fue de 0.03 por 100 ml cuando los cf fueron menos o igual que 200 en 100 ml, pero cuando la densidad de cf fue mayor a

200 en 100 ml, *Salmonella* spp elevó su ámbito entre 0.23 y más de 240 en 100 ml.

Por otro lado, Martins y col. en 1988 citan un estudio en el que aunque no se obtuvo una relación estadística entre el NMP en 100 ml de *Salmonella* spp y el NMP en 100 ml de coliformes, cuando se relacionaron gráficamente los niveles de coliformes totales y fecales con el porcentaje de aislamientos de salmonelas en aguas dulces y saladas se observó una relación prácticamente lineal.

Los altos niveles que suelen presentarse en la población de coliformes, principalmente en la estación de lluvias, constituyen una prueba indirecta de la presencia de bacterias patógenas en el área de estudio. Escobar en 1988, demuestra la existencia de una clara relación entre el crecimiento de coliformes y la abundancia de *Salmonella* sp en las épocas de gran precipitación pluvial.

Finalmente, Bernard (1989) es también de la opinión de que los altos niveles de cf están asociados con el incremento en la concentración de ef, *Pseudomonas aeruginosa* así como con el incremento en la incidencia de *Salmonella* spp.

#### **b) Grupo estreptococo**

Este grupo quedó formado por el género *Streptococcus* con sus cinco especies: *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. bovis*, *S. equinus* y *S. avium*; son habitantes exclusivos del tracto intestinal y por convención se les denominó estreptococos fecales (ef). Se trata de organismos en forma de cocos, grampositivos, se agrupan en cadenas cortas o pares, crecen en ciertas sales a 35°C y resisten temperaturas hasta de 45°C. Son inmóviles, anaerobios facultativos, catalasa negativos, oxidasa negativos, fermentan carbohidratos sin producción de gas, no reducen los nitratos y no producen H<sub>2</sub>S<sup>4,5</sup>.

Para Clausen y col. (1977) los ef pueden proveer una mejor estimación de la calidad del agua debido a que no se multiplican en aguas contaminadas. Además Cohen y Shuval (1973) al comparar la supervivencia entre ct, cf y ef encontraron que estos últimos fueron más resistentes al agua natural del ambiente y a los procesos de purificación que los otros organismos indicadores. Clausen y col. también prefieren el uso de ef como indicadores de calidad del agua sobre el de *Salmonella* spp pues comprobaron que la sobrevivencia de los ef es mayor que la del patógeno, mientras que los cf pueden tener una muerte paralela a diversas bacterias patógenas, tales como *Salmonella* spp.

De 1977 a 1982 se realizó un estudio para determinar qué grupo bacteriano puede ser usado como indicador de la calidad del agua, donde los **ef** resultaron ser más aptos o idóneos que *E. coli* o los **cf**. La densidad de *E. coli* mostró una fuerte relación con los riesgos a la salud en agua dulce, pero no en agua marina y la densidad de **cf** no mostró relación con gastroenteritis asociadas a la natación en ambos medios acuáticos. En tanto, la densidad de enterococos sí mostró una relación directa con las enfermedades asociadas a la natación<sup>28</sup>. La opinión de Robertson (1984) es que los **ef** deben ser usados como indicadores complementarios.

En 1986 la Agencia para la Protección al Medio Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) de los EU adoptó a los **ef** como organismos indicadores para las aguas de uso recreativo en lugar de los indicadores aplicados hasta entonces, principalmente los **ct** y los **cf**. Se estableció una relación lineal entre la concentración media de **ef** /100 ml y los trastornos digestivos asociados a la natación.

### Proporción entre **cf** y **ef**

En 1977 Clausen y col. recalcan que la especificación del grupo estreptococo provee información sobre la fuente de contaminación, pues se sabe que en el hombre hay menos estreptococos que en los animales y que en éstos hay menos coliformes que en el hombre. Por consiguiente, se ha propuesto que la relación entre los coliformes fecales (**cf**) y los estreptococos fecales (**ef**) contenidos en una muestra puede usarse para demostrar si la contaminación sospechada procede de residuos humanos o animales. Con tasas mayores de 4.0 se establece que la contaminación es por desechos domésticos (materia fecal humana), mientras que tasa menores de 0.7 indican que la fuente son animales (tabla 1). Si se obtienen relaciones en el intervalo de 0.8 a 3.9, la interpretación es indeterminada o mixta.<sup>4,5</sup>

Tabla 1. Contribución estimada per cápita de los microorganismos procedentes de los humanos y de algunos animales<sup>37</sup>

Densidad media de indicador (ufc / g de heces)	Contribución media / habitante en 24 hrs				
	<b>cf</b> (10 <sup>6</sup> )	<b>ef</b> (10 <sup>6</sup> )	<b>cf</b> (10 <sup>6</sup> )	<b>ef</b> (10 <sup>6</sup> )	Índice <b>cf/ef</b>
Animal					
Pollo	1.3	3.4	240	620	0.4
Vaca	0.23	1.3	5400	31000	0.2
Pato	33.0	54.0	11000	18000	0.6
Humano	13.0	3.0	2000	450	4.4
Cerdo	3.3	84.0	8900	230000	0.04
Oveja	16.0	38.0	18000	43000	0.4
Pavo	0.29	2.8	130	1300	0.1

### c) Otros indicadores

La utilización de los indicadores ya mencionados presenta algunas limitaciones, por lo que se continúa investigando para encontrar otros que pudieran ser de mayor aplicación y utilidad. Algunos organismos bacterianos como los cf, los ef y *Clostridium perfringens* son usados como indicadores de contaminación en agua<sup>45</sup>.

En 1984 Robertson señala que en estuarios el patógeno potencial *Vibrio parahaemolyticus* promete como un indicador complementario de la presencia en aguas residuales de algunos patógenos potenciales.

Asimismo, Grun y Moller en 1974 evaluaron cuantitativa y cualitativamente a *Pseudomonas pyocyanea* y *Staphylococcus* spp en aguas para natación en Alemania como indicadores de la calidad de éstas.

Scoglio en 1983 reportó que se monitoreó varias piscinas italianas en las que se encontraron cuentas totales de bacterias a 37 y a 20°C de ct, cf, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* sp y otros patógenos como indicadores de una fuerte contaminación en estas aguas.

En 1984 Seyfried y col. evaluaron diez playas de Ontario, Canadá, para analizar la presencia de cf, ef, bacterias heterotróficas, *Pseudomonas aeruginosa* y estafilococos totales así como su relación con la morbilidad en nadadores.

Robles y col. en 1988, proponen a *Pseudomonas aeruginosa* como indicador de calidad de agua de piscina para uso recreativo.

Por otra parte, Borrego y col. (1990) opinan que los colifagos pueden representar buenos indicadores de contaminación fecal en agua.

Jabar y col. en 1983 aseguran que la almeja *Circenita callypigia* es un indicador adecuado para conocer la calidad del agua para uso recreativo. Al tratarse de un animal filtrador y sésil tiene la capacidad de concentrar los contaminantes en su cuerpo y protegerlos de condiciones desfavorables del ambiente. Una evidencia de ello es la presencia del género *Salmonella* aislado a partir de su cuerpo, pero no del agua donde se recolectó la almeja.

Otro reporte a este respecto es el que publican Rowse y Fleet en 1982, donde *Salmonella* spp y *E. coli* fueron aisladas de heces de ostras. Dos estudios más

en los que se usó a bivalvos como indicadores de contaminación microbiana son los dados a conocer por Plusquellec y col. en Francia (1986) y por Araya y García (1988) en Costa Rica, en los que se aisló a *Salmonella* spp de estos moluscos.

Van Donsel y Geldreich (1971) obtuvieron un menor número de aislamientos de *Salmonella* spp en agua que en sedimentos cuando la razón *cf/ef* fue inferior a 0.7, por lo que plantearon que los sedimentos profundos pueden proporcionar información considerable como para establecer que éstos, al mantener una concentración estable, podrían ser un indicador de la calidad del agua. Basaron su opinión también en torno a estudios realizados anteriormente sobre este tema. Otro trabajo que menciona la densidad bacteriana en sedimentos usada como indicador de la calidad del agua es el de Yamamoto y López en 1985 en el cual el incremento de *cf* en el agua en comparación con los sedimentos se valoró en una proporción de 100-1000 en cada 100 ml respectivamente. Matson en 1993 confirmó esta proporción al encontrar con mayor frecuencia a *Salmonella* spp (46%) en sedimentos que en el agua adyacente.

### **2.3.3. Índices de la calidad del agua**

El establecimiento de estándares de calidad debe depender de los usos del agua actuales o previstos en cada lugar específico, el factor principal que determina sus límites es el criterio en que se fundamenta, sea éste epidemiológico, estético o ecológico.

Una guía de calidad de agua es la concentración máxima sugerida del indicador en el agua que está asociada con riesgos inaceptables para la salud. Un estándar o norma de calidad del agua obtenido de este criterio es una guía establecida. Estos estándares o índices difieren de un país a otro (tabla 2).

Tabla 2. Lista de algunos criterios de la calidad bacteriológica en aguas recreativas marinas establecidos a través del tiempo en diversos países

País o ciudad	ct / 100 ml	cf / 100 ml	ef / 100 ml	Año
New Haven(EU)	100			1928 <sup>99</sup>
Connecticut(EU)	50 muy buena calidad. 500 buena calidad. 1000 pobre calidad. >1000 mala calidad			1934 <sup>83</sup>
NTAC (EU)*		200		1968 <sup>20</sup>
EEC **	10 000	2000		1976 <sup>21, 22</sup>
EPA (EU)***		200		1976 <sup>1, 2, 9</sup>
OMS *****	500 a 1 000	200	100	1977 <sup>60</sup>
SARH ****	<1 000	200		1979 <sup>81</sup>
EPA (EU)***			20	1984 <sup>14, 29</sup>
Canadá		200		1984 <sup>92</sup>
Colombia y México	<1 000	200		1984 <sup>56</sup>
SEDUE*****		200		1989 <sup>84</sup>

(\*Comité Asesor Técnico Nacional; \*\*Concilio de la Comunidad Económica Europea; \*\*\*Agencia de Protección al Medio Ambiente; \*\*\*\*Secretaría de Agricultura y Recursos Humanos, México; \*\*\*\*\*Organización Mundial de la Salud; \*\*\*\*\*Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología)

#### 2.3.4. Características específicas de los géneros *Salmonella* y *Shigella*

Los organismos patógenos encontrados en el agua residual pueden proceder de desechos humanos que estén infectados o que sean portadores de una enfermedad determinada. Estos organismos, que pueden ser excretados por el hombre, causan enfermedades del aparato gastrointestinal tales como fiebre tifoidea o paratifoidea, disentería, diarrea y cólera. Dado que estos organismos son altamente infecciosos son los responsables de muchas miles de muertes cada año en zonas con escasa sanidad, especialmente en los trópicos. Dos ejemplos de estos microorganismos altamente patógenos son los géneros *Salmonella* y *Shigella* pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

La familia de las enterobacterias está integrada por bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, oxidasa negativos, fermentan algunos azúcares y reducen los nitratos a nitritos. Los géneros que forman esta familia son los siguientes: *Citrobacter* spp, *Edwardsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Escherichia* sp, *Klebsiella* spp, *Morganella* sp, *Proteus* spp, *Serratia* spp,

*Hafnia* sp, *Yersinia* spp, *Erwinia* spp, *Providencia* spp, *Salmonella* spp y *Shigella* spp<sup>12, 72</sup>.

### a) Características morfológicas, bioquímicas y químicas

Las salmonelas son bacilos móviles con flagelos peritricos (con excepción de *S. enteritidis* variedad *gallinarum-pollorum*), gramnegativos, anaerobios facultativos y no forman esporas. En cultivos de muestras de agua pueden predominar organismos cocobacilares, mientras que en medios líquidos se pueden ver formas filamentosas. Estos microorganismos miden de 2-3  $\mu$  de largo y aprox. 0.6  $\mu$  de ancho, pero pueden presentar variaciones de acuerdo a cambios del medio ambiente.

Ordinariamente, las salmonelas no poseen cápsula cuando se desarrollan a 37°C, pero la mayoría de especies pueden dar origen a colonias mucoides compuestas por bacilos encapsulados, especialmente cuando son incubadas a 20°C o a una temperatura menor. Se han descrito cepas de *Salmonella typhi* encapsuladas. Sus membranas contienen lipopolisacáridos que se liberan por lisis de las células y actúan como endotoxinas

Crece bien en medios de cultivo ordinarios, produciendo en 24-48 hrs de incubación colonias que varían de 2-3 milímetros de diámetro. Las colonias pueden ser circulares, con superficie lisa, convexa y con bordes regulares o bien planas, con superficie rugosa y borde dentado. Pueden presentar un gran crecimiento bajo condiciones anaeróbicas. El rango de temperatura a la que se desarrollan es de 10-42°C con una temperatura óptima de 37°C. Forman ácido y gas a partir de glucosa y manitol. No fermentan lactosa ni sacarosa, indol ni urea. Son citrato positivas, algunas producen H<sub>2</sub>S en triple azúcar. Son resistentes a la congelación en agua y a algunos agentes químicos, por ejemplo: verde brillante, tetrionato de sodio y deoxicolato sódico<sup>72</sup>.

La estructura antigénica de las salmonelas fue estudiada por Kauffman en Dinamarca en 1937 y por White en Inglaterra (1926). Como resultado de sus trabajos, los componentes antigénicos conocidos en el cuerpo celular y en los flagelos constituyen la base para la clasificación de estos organismos. Tres son los principales antígenos del género *Salmonella* :

- Antígenos O (somáticos, termoestables).- En pared celular anticuerpos IgM.
- Antígenos H (flagelares, termolábiles).- Anticuerpos IgG-fase 1 y 2

- Algunas de estas especies también poseen un antígeno de "envoltura" llamado antígeno de virulencia VI; son antígenos K capsulares, en la extrema periferia de la bacteria <sup>11, 46</sup>.

Las shigelas son bacilos inmóviles, gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, sin cápsula. Con base en su fermentación se dividen en cuatro subgéneros (*Shigella dysenteriae*, *Sh. Flexneri*, *Sh. Boydii* y *Sh. sonnei*).

El hábitat de las shigelas está limitado a las vías intestinales del hombre y otros primates, en los cuales produce disentería bacilar. Fermentan glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido, pero no de gas con algunas excepciones. Con excepción de *Shigella sonnei*, no fermentan lactosa. No pueden utilizar citrato o malato como fuente única de carbono, se inhibe su crecimiento con KCN y no producen H<sub>2</sub>S.

Realizan una fermentación ácida mixta entre cuyos productos figuran pequeñas cantidades de etanol. Catalasa positivos y oxidasa negativos. Crecen en el laboratorio en medios comunes, caldos simples, dando una turbiedad uniforme a las pocas horas de cultivo (más abundante en *Shigella flexneri*).

En agar simple forman colonias redondas de 2-3 mm, grisáceas, brillantes, opacas, de borde continuo, irregulares y rugosas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, a un pH de 7.7 - 7.8. Son destruidas durante una hora con fenol al 1% en un tiempo de contacto de 30 minutos.

Las shigelas poseen antígenos "O" pero no antígenos "H", de tal manera que los cuatro grupos que corresponden a las cuatro especies, se han formado con los antígenos somáticos y cada uno de éstos grupos está formado por uno o varios tipos serológicos <sup>11,12, 46 y 72</sup>.

#### **b) Supervivencia y resistencia**

Se han publicado diversos estudios en torno al tiempo de resistencia de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Van Donsel y Geldreich (1971), describen que la supervivencia de *Salmonella* spp en sedimentos es paralela a la de los cf, razón por la cual se usa a estos organismos como indicadores de la presencia de patógenos humanos.

Un estudio comparativo de la supervivencia de varias bacterias indicadoras y patógenas en agua de pozo de un establo arrojaron los siguientes datos: (< mayor supervivencia que...) *Aeromonas* sp < que *Shigella* (*Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*) < estreptococos fecales < coliformes y

algunas salmonelas (*Salmonella enteritidis* serotipo *paratyphi* A y D, *S. enteritidis* serotipo *typhimurium*) < *Streptococcus equinus* < *Vibrio cholerae* < *Salmonella typhi* < *Streptococcus bovis* < *Salmonella enteritidis* serotipo *paratyphi* B<sup>39</sup>.

Leclerc y col. (1976) mostraron que *Salmonella* spp sobrevive mucho más (hasta 17 semanas) que *E. coli* en la superficie del agua contaminada.

Por otro lado, Clausen y Green, en 1977 observaron que la supervivencia de *Salmonella* spp es paralela a la de cf, después de 6-12 días, los números de cf mostraron más rápida declinación y a los 14 días el porcentaje de *Salmonella* spp es excedido sólo por los estreptococos. También observaron que en aguas marinas *Salmonella* spp muere más rápido que *E. coli*. y señaló que aunque hay evidencia de que *Salmonella* spp es capaz de sobrevivir en efluentes de agua, una adecuada cloración muestra la remoción de ésta.

Respecto a la resistencia de *Salmonella* spp a distintos antibióticos Schwartzbrod y col. (1983), dan a conocer un estudio en el que se observó que de 216 muestras del patógeno sometido a la acción de antibióticos (estreptomycin al 10.2%), la mayoría de las bacterias resistentes al antibiótico perteneció a los géneros *Salmonella typhimurium* y *Salmonella panama* (serotipos).

En 1984 Alishyna y col. investigaron la supervivencia del género *Salmonella*, encontrando que una elevada temperatura, un incremento en la dosis inicial de diseminación y un decremento en el grado de contaminación biológica, dan a las salmonelas una alta viabilidad que excede el tiempo de preservación de otros microorganismos indicadores.

En una investigación del Lago Michigan en EU se observó una supervivencia para *Shigella dysenteriae* de menos de 3 días. Sin embargo, en experimentos con *Shigella sonnei* en aguas de mar se observó una supervivencia de más de 100 días<sup>87</sup>.

Por otro lado, Ramamurthy y Natarajan en 1987 reportan que aunque los sedimentos son más conducentes para la persistencia de *Salmonella* spp, las ostras proveen el mejor reservorio para estos organismos.

Después de ser sometida por dos semanas a temperatura de 15°C en muestras de agua estuarina, *Salmonella* spp fue removida casi en su totalidad<sup>67</sup>.

Más recientemente, Matson en 1993 señala que *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp y *Vibrio* spp pueden sobrevivir después de tres semanas en sedimentos costeros aún esterilizados.

La temperatura óptima para los organismos del género *Shigella* es de 37°C, en las heces donde abundan éstos mueren pronto, en cambio pueden ser conservados adecuadamente en solución tamponada glicerinada; en la tierra y no expuestos directamente a la luz solar viven hasta doce días <sup>72</sup>.

### c) Patología

Algunas especies del género *Salmonella* pertenecientes al subgénero I son causantes de enfermedades en el hombre y otros animales de sangre caliente por vía oral y causan tres tipos de enfermedades: fiebres entéricas (tifoidea y paratifoidea), septicemias y gastroenteritis; entre otras se encuentran:

*Salmonella choleraesuis*.- Patógeno para el hombre y otros animales.

*Salmonella typhi*.- Patógeno sólo al hombre (fiebre tifoidea)

*Salmonella paratyphi*.- Patógeno sólo al hombre (fiebre paratifoidea)

*Salmonella schotmuelleri*.- Fiebre entérica, raramente en animales.

*Salmonella typhimurium*.- Hombre y animales, es el agente que más frecuentemente causa gastroenteritis en el hombre.

*Salmonella enteritidis*.- Hombre y animales<sup>12</sup>.

La fiebre tifoidea se adquiere por la ingestión de alimentos y agua contaminados con *Salmonella* spp, generalmente, la contaminación la hacen los portadores que manejan la preparación de alimentos que se consumen sin cocimiento aunque el agua ha sido siempre el vehículo dominante de la diseminación de la tifoidea<sup>47</sup>. Otros animales que pueden transportar el género *Salmonella* son los moluscos <sup>42, 45, 88</sup>, camarones<sup>44</sup>, anguilas<sup>76</sup> y animales domésticos (perros, gatos, pájaros, aves de corral, cerdo, res, cordero, etc.)<sup>41</sup>.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad aparecen en forma insidiosa: primero aparece la fiebre que va aumentando con el transcurso de los días hasta alcanzar 40°C ó más, al mismo tiempo el paciente manifiesta estreñimiento, a la exploración del abdomen es muy sensible a la palpación y después del cuarto día se observan manchas rosadas, en muchos casos, la molestias se generalizan, con dolores musculares, austeria, adinamia y diarrea<sup>72</sup>.

Por otro lado, la shigelosis es un padecimiento que se adquiere por la ingestión de alimentos y agua contaminados con materias fecales humanas, no se conoce

la infección natural en animales, el hombre se infecta de otros hombres. Después de dos o cuatro días de incubación, las primeras manifestaciones son: fiebre que se presenta bruscamente y generalmente llega a 40°C o más acompañada de mialgias, austenia y anorexia al segundo o tercer día aparece diarrea con cólicos y ruidos hidroáereos, poco a poco se va instalando pseudodiarrea en la que el paciente sólo evacua moco con sangre y pus, en ocasiones hay deseo de evacuación intestinal sin bolo fecal sólo con sensación dolorosa de obrar, esto es tenesmo rectal. El padecimiento en evolución natural, remite después de cinco a siete días, es autolimitante y sólo en pocos casos se prolonga más de una semana<sup>72</sup>.

#### **d) Patogenia**

Las salmonelas penetran por la pared del intestino a los ganglios linfáticos del mesenterio en donde se reproducen en forma abundante para después drenar por el conducto torácico a la circulación sanguínea y producir una bacteriemia, desde donde se puede localizar al bacilo en cualquier órgano o tejido, pero existe una predominancia por la localización en las placas de Peyer, en donde dan lugar a úlceras. Otros tejidos colonizados en esta etapa de bacteriemia son: la vesícula biliar, en donde pueden permanecer por largo tiempo aún después de que el cuadro clínico ha remitido, el hígado también se coloniza con frecuencia y en pocos casos las meninges, los huesos (en pacientes con anemia de células falciformes), los pulmones y la pleura, el bazo y las articulaciones. Cuando el padecimiento avanza en forma natural, sin la formación de la respuesta inmune oportuna, pueden presentarse complicaciones que alteren el cuadro clínico y sobre todo que agraven el pronóstico del padecimiento. Entre estas complicaciones las más frecuentes son perforación intestinal, hemorragias, colecistitis y abscesos<sup>72</sup>.

Por otra parte, en la shigelosis los bacilos penetran por la ingestión de alimentos contaminados hasta el íleon y ahí dan lugar a procesos inflamatorios de la mucosa que se manifiestan por la diarrea inicial del padecimiento. Las shigelas colonizan el colon y particularmente el asa sigmoidea en donde producen inflamación, edema y formación de abscesos que evolucionan a la ulceración. Estas lesiones producidas por la shigelas nos explican claramente las manifestaciones clínicas del padecimiento, ya que el reflejo de la defecación se produce en el asa sigmoidea y el estímulo producido por las úlceras se estará repitiendo frecuentemente, además el bolo fecal con moco, sangre y pus, también es explicable por las úlceras asentadas muy cerca de la expulsión de las materias fecales<sup>72</sup>.

### e) Dosis infecciosa

Según Jawetz (1983), la dosis infecciosa para provocar salmonelosis es de  $10^5$ - $10^8$  bacterias, y la dosis infecciosa para provocar disenteria es de menos de 200 bacterias. Aunque otros autores como DuPont en 1973 afirmaban que la dosis mínima para provocar disentería era de 10 organismos.

Romero (1993), opina que es importante la cantidad del inóculo ya que el organismo humano es bastante resistente a la colonización por *Salmonella* spp. Pues se conoce que inóculos muy pequeños no producen la enfermedad, pero sí en cambio estimulan la producción de anticuerpos que confieren mayor resistencia a las personas que habitan en zonas endémicas, sólo con dosis mayores de  $1 \times 10^6$  y sobre todo los inóculos de  $1 \times 10^9$  se tienen muy altas probabilidades de contraer la enfermedad. El periodo de incubación varía de 7 a 14 días dependiendo en parte de la dosis del inóculo. Por otro lado, la disentería o shigelosis se puede adquirir con inóculos muy pequeños de bacilos, se ha comprobado que se requieren sólo cien o doscientos de éstos para que el padecimiento se desarrolle.

### f) Epidemiología

La fiebre tifoidea es un padecimiento que se encuentra en todas las latitudes y en todos los países del mundo. Es más frecuente en países en desarrollo en donde se encuentra en forma endémica con brotes epidémicos. En México la tasa en 1960 era de 17.6 por cien mil habitantes y en 1980 bajó a 4.6 por cien mil habitantes con una epidemia registrada en 1972. En 1994 la tasa de morbilidad aguda por enfermedades gastrointestinales era de 10.8 por cada 1000 habitantes<sup>82</sup>. La mayor incidencia se encuentra en la edad escolar, es poco frecuente antes de los siete años de edad (**tabla 3**). Los portadores crónicos, sobre todo si manejan alimentos, son los responsables de las epidemias o de los casos aislados ya que pueden excretar  $10^{10}$  por gramo de materias fecales de salmonelas. Este padecimiento tiene una tendencia estacional, generalmente es más frecuente en el verano y el otoño que son las estaciones más calurosas y la ingestión de agua contaminada es la fuente de infección. La shigelosis se encuentra en todos los países, pero sobre todo en aquellos de escasos recursos en donde se encuentra la infección en forma endémica. El pico de prevalencia es la edad escolar, los niños se infectan por agua o alimentos contaminados por portadores que pueden eliminar hasta  $10^8$  por gramo de materia fecal. Estos portadores eliminan al bacilo durante varios meses después del padecimiento o bien las personas infectadas que tienen cuadros atenuados o infección asintomática<sup>72</sup>.

**Tabla 3. Mortalidad por infecciones gastrointestinales en México**

<b>Tasa de mortalidad infantil (S) por enfermedades gastrointestinales, cobertura nacional (unidad: por 100 000 habitantes nacidos vivos registrados)<sup>27</sup></b>			
<b>Enfermedad</b>	<b>Período</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>
Shigelosis	1995	0.5	0.6
Fiebre tifoidea	1995	1.0	0.4
Inf. Int. de org.*	1995	2.9	4.0
<b>Tasa de mortalidad preescolar por enfermedades gastrointestinales, cobertura nacional (unidad: por 100 000 habitantes nacidos vivos registrados)<sup>26</sup></b>			
<b>Enfermedad</b>	<b>Período</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>
Colera	1995	0.1	0.1
Shigelosis	1995	0.1	0.2
Fiebre tifoidea	1995	0.2	0.1
Inf. Int. de org.*	1995	0.3	0.5
<b>Tasa de mortalidad preescolar por enfermedades gastrointestinales, cobertura nacional (unidad: por 100 000 habitantes nacidos vivos registrados)<sup>27</sup></b>			
<b>Edad</b>	<b>Período</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>
Menores de 1 año	1996	1 287	1628
1 a 4 años	1996	638	701
<b>Tasa de mortalidad escolar por infecciones intestinales en el Estado de Veracruz (unidad: por 100 000 habitantes nacidos vivos registrados)<sup>83</sup></b>			
<b>Edad</b>	<b>Periodo</b>	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>
5-14 años	1997	1.0	1.5

\* Infecciones intestinales de organismos no especificados

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo General.

**Evaluar la calidad bacteriológica de las playas Boca de Río, Mocambo, Villa del Mar, del Puerto, y playa Norte en el Puerto de Veracruz, México.**

#### Objetivos Particulares.

**Probar la eficiencia del uso combinado de la técnica de Filtro de Membrana y de Tubos Múltiples para el aislamiento cuantitativo de los géneros *Salmonella* y *Shigella*.**

**Determinar el grado de contaminación bacteriológica de las aguas de las playas mediante el aislamiento, identificación y cuantificación de las bacterias patógenas *Salmonella* spp y *Shigella* spp.**

**Aislar y cuantificar a los coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales para, con base en la densidad de éstos, establecer qué playas se encuentran rebasando las normas vigentes de calidad para aguas marinas de uso recreacional.**

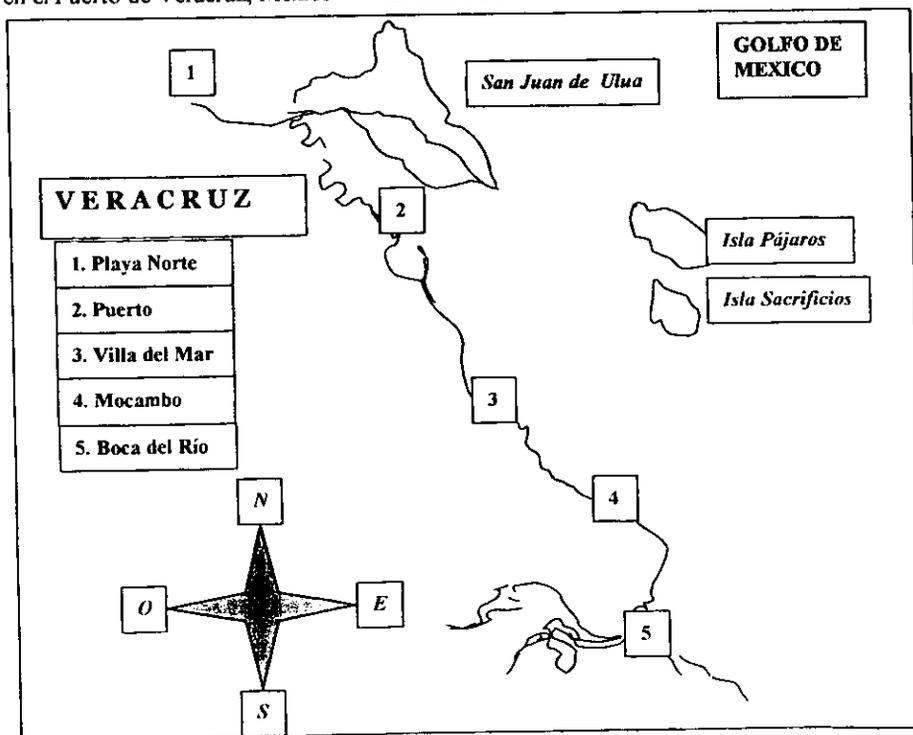
**Determinar la posible relación de los coliformes fecales con los géneros *Salmonella* y *Shigella*.**

**Establecer la proporción coliformes fecales / estreptococos fecales (cf / ef) para así determinar el origen de la contaminación.**

## 4. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El estado de Veracruz se ubica geográficamente al norte a  $22^{\circ} 28'$ , al sur a  $17^{\circ} 09'$  y al oeste a  $98^{\circ} 39'$ . Su superficie representa el 3.7 % de la superficie total del país. Colinda al norte con Tamaulipas y el Golfo de México, al este con el Golfo de México, Tabasco y Chiapas, al sur con Chiapas y Oaxaca, al oeste con Puebla, Hidalgo y San Luis Potosí. Los diferentes climas que se presentan en el estado van desde el cálido húmedo con lluvias todo el año (Af), hasta el frío [E(T)]. El puerto de Veracruz se ubica a  $19^{\circ} 12'$  de latitud norte y  $96^{\circ} 08'$  longitud oeste. Su altitud media es de 10 msnm. Su clima corresponde al cálido subhúmedo con lluvias en verano [A(w)], su temperatura media anual es de  $25.3^{\circ}\text{C}$  con una precipitación de 1694.7 mm anuales. Con relación a su vegetación, en el puerto de Veracruz se ha modificado notablemente la vegetación primaria, y su uso es de tipo forestal y agropecuario (figura 1).

Figura 1. Localización de las playas Norte, Puerto, Villa del Mar, Mocambo y Boca del Río en el Puerto de Veracruz, México<sup>36, 43</sup>. Escala : 1:50 000



## 5. METODOLOGÍA

Se realizaron seis muestreos en el puerto de Veracruz con la finalidad de determinar la calidad bacteriológica del agua de mar que se usa para la recreación. Estas visitas se efectuaron en los meses de febrero, abril, mayo, julio, agosto y septiembre de 1992 (tabla 4).

Tabla 4. Calendario de muestreos en el Puerto de Veracruz durante 1992.

MES	DÍAS
Febrero	1 - 2
Abril	17 - 18
Mayo	30 - 31
Julio	4 - 5
Agosto	29 - 30
Septiembre	19 - 30

En cada salida se tomaron muestras de agua para su análisis bacteriológico en 3 horarios (2 PM, 6 PM y 7 AM) en cada una de las playas (Boca de Río, Mocambo, Villa del Mar, Puerto y Norte).

A cada una de las muestras se les aplicó las siguientes pruebas:

- Aislamiento y cuantificación de los patógenos *Salmonella* spp y *Shigella* spp
- Coliformes totales (ct)
- Coliformes fecales (cf)
- Estreptococos fecales (ef)

Las 85 muestras para los géneros *Salmonella* y *Shigella* se tomaron aproximadamente a la mitad de lo largo de cada una de las playas, a unos diez metros mar adentro, tomando en cuenta las áreas con mayor cantidad de bañistas. Mientras que para ct, cf y ef fue una a la mitad y otras dos en los extremos de cada playa (255 muestras).

La toma de las muestras se realizó en frascos de vidrio de 1000 ml de capacidad, los cuales previamente se lavaron se cerraron, se envolvieron y se esterilizaron en autoclave a 15 lbs de presión y 120°C durante 15 minutos, una vez hecho lo anterior, la muestra se tomó sumergiendo el frasco cerrado a una profundidad de 30 cm aproximadamente bajo la superficie del cuerpo de agua y

se destapó, permitiendo así la entrada del agua hasta 3/4 partes del frasco, con el objeto de dejar un espacio libre de movimiento del agua y, de esta manera se permitió la homogeneización de la muestra dentro del frasco, se le cerró y una vez en la superficie se le rotuló según la estación de colecta correspondiente, para finalmente colocarlo dentro de una hielera para su traslado al sitio de trabajo.

## **5.1. Aislamiento de los organismos de los géneros *Salmonella* y *Shigella***

### **5.1.1. Concentración**

Para el aislamiento primario de los organismos patógenos presentes en la muestra colectada se utilizó la técnica de Concentración por Filtro de Membrana (**figura 2**). El tamaño de la muestra fue de 50 ml en 450 ml de solución tamponada (**ver anexo**). Después de la filtración y con ayuda de una pinza metálica estéril, se colocó la membrana en un recipiente que contenía 100 ml de solución estéril de agua peptonada al 1 % (**ver anexo**), la cual se homogeneizó por un minuto. Estos recipientes se mantuvieron a una temperatura de 4 a 10°C hasta su traslado al laboratorio.

### **5.1.2. Aislamiento cuantitativo**

El Manual para Métodos Normalizados señala que aunque no existe un protocolo específico para la detección de los géneros *Salmonella* y *Shigella*, los métodos utilizados en numerosas investigaciones de campo para su recuperación son de gran eficiencia y además pueden ser modificados para adaptarlos a condiciones particulares<sup>4, 5</sup>. En este estudio se aplicó el método de Filtración de Membrana para la concentración de los patógenos y la técnica de Enriquecimiento en Tubos Múltiples para su cuantificación por Número Más Probable (NMP) (**figura 2**).

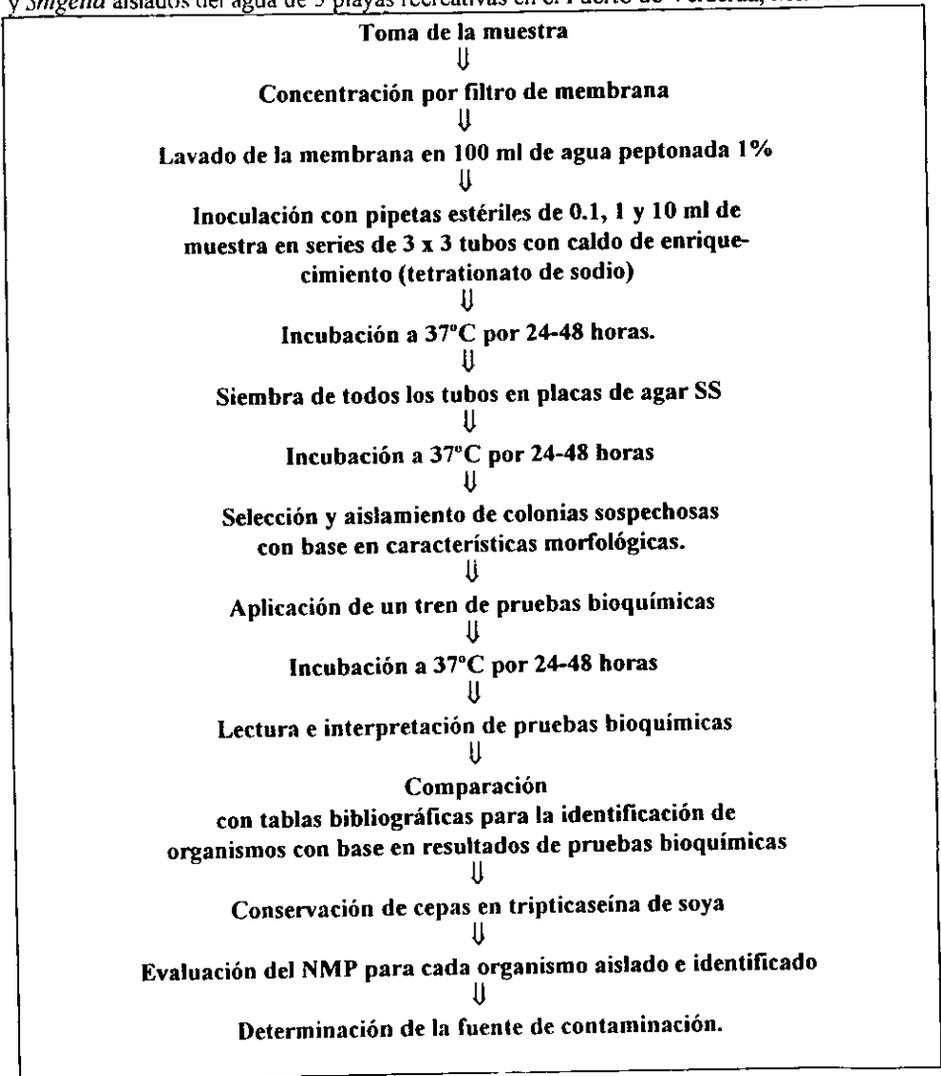
### **5.1.3. Enriquecimiento y dilución en tubos múltiples**

En esta fase se efectuó el enriquecimiento selectivo de las muestras concentradas en un caldo nutritivo con tetratoato de sodio (**ver anexo**) que inhibe el crecimiento de bacterias coliformes u otros organismos que pudiesen interferir en el reconocimiento de patógenos entéricos.

Para la obtención de resultados cuantitativos se empleó el método de tubos de dilución múltiple, el cual se basa en leyes de probabilidad y se utiliza para

obtener una estimación del número de bacterias presentes en una muestra, la cual se expresa como el Número Más Probable (NMP).

Figura 2. Técnica empleada para el aislamiento y determinación de los géneros *Salmonella* y *Shigella* aislados del agua de 5 playas recreativas en el Puerto de Veracruz, México<sup>4, 5</sup>



*Procedimiento de siembra.* Para cada muestra se prepararon 9 tubos con 10 ml de tetrionato de sodio (3 series con tres tubos en cada serie), en donde se

realizaron diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y un inóculo de 10 ml; para la siembra se procedió de la siguiente manera:

- a) A la primer serie de tres tubos a doble concentración de caldo de tetrionato y a los cuales previamente se agregaron 2 ml de solución de yodo (**ver anexo**), se inocularon 10 ml de la muestra.
- b) La segunda serie de tres tubos a concentración sencilla de tetrionato y con dos ml de solución de yodo, fue inoculada con 1 ml de muestra.
- c) Tercer serie de tres tubos a concentración sencilla de tetrionato y con 2 ml de solución de yodo con inóculo de 0.1 ml de muestra. Posteriormente las tres series se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 hrs.

#### **5.1.4. Aislamiento selectivo**

Después de la incubación de los tubos de dilución múltiple se procedió a la siembra de éstos en placas de agar selectivo para los géneros *Salmonella* y *Shigella*: agar SS (**ver anexo**). Las placas de agar se prepararon en cajas de Petri estériles de 10 cm de diámetro, con 25 ml de agar cada una. Se empleó una asa bacteriológica con la cual se diseminó el material en las 3 partes de la placa. El inóculo se diseminó sucesivamente en estrías con un movimiento de arriba hacia abajo en cada tercio, dando vuelta a la placa en ángulos de  $90^{\circ}$ , el asa se esterilizó entre las sucesivas estrías. El propósito de esta técnica fue arrastrar el inóculo suficientemente sobre la superficie del agar como para poder separar y así obtener colonias bacterianas bien aisladas.

#### **5.1.5. Selección por morfología colonial**

Una vez sembradas las placas, se incubaron por 24-48 hrs, a  $37^{\circ}\text{C}$ , y después se seleccionaron las colonias de las que en base a sus características morfológicas, se sospechó que fueran *Salmonella* spp (incoloras con centro negro) o *Shigella* spp (incoloras, sin ennegrecimiento)<sup>48</sup>.

#### **5.1.6. Determinación por pruebas bioquímicas.**

La identificación de patógenos por medio de sus características coloniales en un medio selectivo sólido presenta limitaciones inherentes a las variaciones biológicas de ciertos organismos. Por esta razón cada una de las colonias sospechosas fue resemebrada en un juego de pruebas bioquímicas, cuyos resultados mostraron parte de su metabolismo y propiedades bioquímicas, con base en éstos, se llegó a su identificación. Las pruebas que se realizaron, así como en qué medio, el principio de cada una y otros datos más de ellas se presentan en la **tabla 5**. Una vez sembrados los tubos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24-48 hrs.

Tabla 5. Juego de pruebas bioquímicas utilizado para la detección de ciertos sistemas enzimáticos de las colonias bacterianas sospechosas de ser *Salmonella* spp o *Shigella* spp<sup>50</sup>

Medio	Características del medio	Principio	Técnica de siembra	Interpretación
Agar Kligler	Color rojo, sólido.	Utilización de glucosa y lactosa. Producción H <sub>2</sub> S	Picadura sin llegar a fondo y estria en superficie del pico de flauta	(+) reacción ácida, color amarillo en pico de flauta o capa profunda. (-) reacción alcalina, color rojo. (+) producción H <sub>2</sub> S, color negro.
Agar Citrato de Simmons	Verde sólido tubo inclinado	El Citrato como única fuente de carbono. Actividad de Citocromo Oxidasa.	Por estrias en superficie del pico de flauta.	(+) color azul reacción alcalina (-) color verde.
Caldo Urea	Color salmón, líquido	Desdoblamiento de la urea y formación de 2 moléculas de amoníaco.	Por agitación	(+) color rosado en todo el caldo. (-) color salmón
Caldo M.R.V.P. (prueba de rojo de metilo)	Amarillo paja, líquido	Prueba cualitativa de producción de ácido (rojo de metilo)	Por agitación	(+) reacción ácida, color rojo, en la superficie del medio. (-) color amarillo.
Caldo M.R.V.P. (prueba de Vogues Proskauer)	Amarillo paja, líquido	Detecta productos neutros. Prod. de Acetilmetilcarbinol.	Por agitación	(+) color rojo en la superficie (anillo). (-) color amarillo o cobrizo.
Agar SIM	Color paja, semisólido	Indol: desdobra el Indol del triptofano o productos de indol. Motilidad: determina si el organismo es móvil o inmóvil. H <sub>2</sub> S: actividad enzimática de aminoácidos que contienen azufre	Por picadura sin llegar al fondo.	(+) anillo rojo en la superficie, en la capa alcohólica. (-) color amarillo. (+,-) anaranjado en la superficie. Producción escatol (precursor del indol) (+) medio turbio. (+) ennegrecimiento del medio.

<b>Caldo Rojo Fenol</b>	Rojo, líquido, con campana de Durham	Fermentación de manitol producción de gas	Por agitación.	(+) amarillo: ácido, gas (-) rojo básico
<b>Caldo Rojo Fenol</b>	Rojo, líquido, campana de Durham.	Fermentación de sacarosa producción de gas.	Por agitación	(+) amarillo: ácido, gas (-) Rojo. básico.

Continuación **tabla 5**. Para la lectura e interpretación de las pruebas bioquímicas se emplearon algunos reactivos en los medios que así lo requirieron (**ver anexo**), estos son:

— Solución de KOH al 40 % y solución de naftol al 5 % en la prueba de Vogues Proskauer (caldo MRVP)

— Solución de rojo de metilo en caldo MRVP

— Reactivo de Kovacs o de Ehrlich en agar SIM para determinar la producción de indol

### 5.1.7. Lectura e interpretación de pruebas bioquímicas

La lectura para la identificación de los organismos aislados, con base en los resultados de las pruebas bioquímicas, se realizó comparando estos últimos con tablas preestablecidas para este propósito en bibliografía especializada (**tabla 6**).

**Tabla 6.** Características bioquímicas para los géneros *Salmonella* y *Shigella*<sup>12, 48 y 50</sup>.

	L	G (gas)	G (H <sub>2</sub> S)	C	U	RM	VP	M	I	H <sub>2</sub> S	Sc	Mn
<i>Salmonella</i> spp	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Shigella</i> spp	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-

( L= lactosa; G= glucosa; C= citrato; U= urea; RM= rojo de metilo; VP= Vogues Proskauer; M= motilidad; I= indol; H<sub>2</sub>S= ácido sulfhídrico; Sc= sacarosa; Mn= manitol; (-) = negativo; (+) = positivo).

Las colonias a las que se logró identificar satisfactoriamente fueron sembradas en un medio de conservación: tripticaseína de soya (**ver anexo**).

### 5.1.8. Evaluación del Número Más Probable (NMP)

La técnica del NMP se ha utilizado durante mucho tiempo y se basa en un análisis estadístico de la combinación de resultados positivos y negativos obtenidos al hacer ensayos múltiples sobre fracciones de igual volumen y las que constituyen una serie geométrica para presencia de microorganismos. Hay que hacer notar que el NMP no es la concentración absoluta de organismos que están presentes, sino solamente una estimación basada en determinadas fórmulas de probabilidad de dicha concentración<sup>4, 5 y 70</sup>.

El valor del NMP para *Salmonella* spp y *Shigella* spp se determinó empleando las tablas diseñadas para este propósito (ver anexo, tabla 7). Se realizó un seguimiento desde los tubos de enriquecimiento (tubos de dilución múltiple), tomando como positivos los tubos que, sembrados en agar SS, dieron lugar al crecimiento de las colonias que finalmente fueron identificadas como los géneros *Salmonella* y *Shigella*.

Es importante hacer notar que durante el procedimiento de búsqueda de los géneros arriba mencionados y con base en las colonias sospechosas se encontraron otros organismos, los cuales son también reportados en la sección de resultados como información adicional y complementaria al presente trabajo.

## **5.2. Aislamiento de organismos pertenecientes a los grupos de los coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales.**

Las técnicas que se emplearon para el aislamiento y cuantificación de coliformes totales y coliformes fecales se muestran en el anexo, figuras 3 y 4.

### **5.2.1. Procedimiento de la técnica de tubos de fermentación múltiple para estreptococos fecales**

*Prueba presuntiva:* Se inoculó una serie de tres tubos que contenían caldo azida dextrosa a doble concentración con 10 ml de muestra, tres tubos con concentración sencilla de caldo azida dextrosa se inocularon con 1 ml de muestra y una serie de tres tubos se inoculó con 0.1 ml de muestra. Se incubaron los tubos a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Se revisaron los tubos en busca de turbiedad a las  $24 \pm 2$  h o a las  $48 \pm 3$  h.

*Prueba confirmativa:* se realizó tomando una asada de los tubos positivos y se resembró en placas de agar KF. Se incubaron invertidas a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  h. Las colonias rojas con halo amarillo confirman la presencia de ef. El cálculo de la densidad de ef se efectuó a través de tablas, de igual forma que para los ct y los cf<sup>4,5</sup>.

## **5.3. Determinación de la fuente de contaminación**

Para determinar el origen de la contaminación (fecal animal, humana o mixta), se realizó la proporción cf/ef y con base en ésta, se pudo inferir la procedencia de dicha contaminación.

#### 5.4. Tratamiento estadístico.

Los valores del NMP / 100 ml de **ct**, **cf** y **ef** pueden variar entre un muestreo y otro en diferentes estaciones debido a factores como la hora y el lugar de colecta, tipo de mareas, duración y fuerza de los vientos, etc<sup>57</sup>. Por lo que es más adecuado expresar los resultados como media geométrica.<sup>16</sup> Para el análisis de los resultados de **ct**, **cf** y **ef**, se realizó una transformación de los datos en medias geométricas y éstas en logaritmos para aplicarles un análisis de varianza (ANDEVA) de tres factores y una prueba de comparación múltiple de medias (LSD).

En los resultados del NMP para *Salmonella* spp y *Shigella* spp no se aplicó media geométrica, sólo fueron convertidos a logaritmo en base 10, debido que, por la cantidad de datos cuyo valor fue de cero, era necesario dar una distribución normal a éstos. Lo mismo que con los **ct**, **cf** y **ef**, se determinó el análisis de varianza (ANDEVA) de tres factores y una prueba de comparación múltiple de medias (LSD).

Con el ANDEVA factorial fue posible identificar las diferencias existentes ( $P < 0.01$ ) entre playas, muestreos y horarios de muestreo, y las interacciones entre ellas de las densidades de los indicadores **ct**, **cf** y **ef** y de los patógenos *Salmonella* spp y *Shigella* spp, así como las relaciones **cf**/*Salmonella* spp y **cf**/*Shigella* spp y la proporción **cf/ef**.

## 6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 6.1. Resultados obtenidos para los géneros *Salmonella* y *Shigella*

De las 85 muestras analizadas para los géneros *Shigella* y *Salmonella* 18 fueron positivas para éste último. La tabla 8 muestra los resultados del NMP obtenido para este género. El ANDEVA aplicado a los logaritmos del NMP de *Salmonella* spp sólo mostró diferencias significativas en el factor muestreo (tabla 9).

Tabla 8. Número más probable (NMP) para el género *Salmonella* y su logaritmo (log.) (\* Muestreo no realizado; I = 14:00 hrs; II = 18:00 hrs; III = 7:00 hrs)

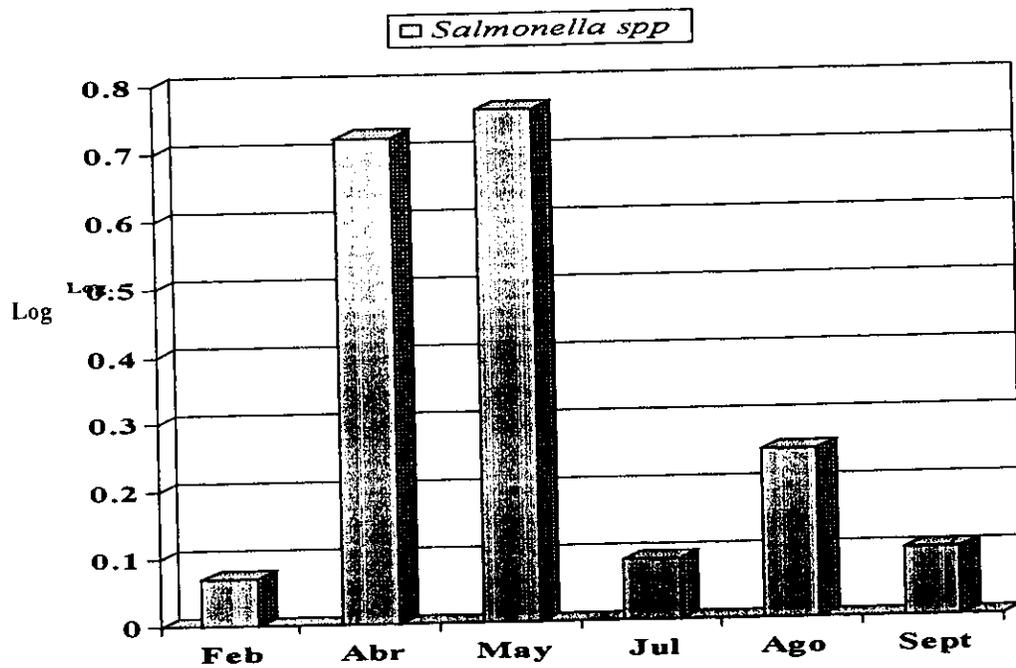
		Boca de Río		Mocambo		Villa del Mar		Puerto		Norte	
		NMP — log.		NMP — log.		NMP — log.		NMP — log.		NMP — log.	
FEBRERO	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II *	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ABRIL	I	0	0	90	1.95	30	1.47	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	290	2.46	40	1.60	60	1.77	0	0	30	1.47
MAYO	I	0	0	130	2.11	30	1.47	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	40	1.60	0	0	30	1.47
	III	1500	3.17	0	0	0	0	0	0	40	1.60
JULIO	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	30	1.47	0	0
AGOSTO	I	60	1.77	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	30	1.47	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SEPT.	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	40	1.60	0	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 9. ANDEVA factorial del log. del NMP de *Salmonella* spp por lugar, muestreo y horario. (\* Efectos estadísticamente significativos a  $P < 0.01$ ; GL Grados de libertad; CM Cuadrado de las Medias; F Razón F; P Nivel de significancia)

FUENTES VARIACIÓN	DE	GL	CM	F	P
Lugar		4	0.2053	0.374	0.8257
Muestreo		5	1.5810	2.881	0.0246 *
Horario		2	0.5672	1.034	0.3641
Lugar-muestreo		20	0.3361	0.613	0.8817
Lugar-horario		8	0.5101	1.930	0.5019
Error		44	0.5487		

La gráfica 1 muestra la LSD por muestreo aplicada al logaritmo del NMP para *Salmonella* spp.

Gráfica 1. Prueba de LSD del logaritmo del NMP para *Salmonella* spp por muestreo



Los datos vertidos en las **tablas 8 y 9** y en la **gráfica 1** mostraron que *Salmonella* spp presentó la mayor densidad en los meses de abril y mayo lo cual se explicó por el período vacacional de "Semana Santa" ya que acarrió una gran cantidad de bañistas con el consecuente incremento en la tasa de contaminación orgánica depositada en las playas y el agua, factor que proporcionó una alta viabilidad y que excedió el tiempo de permanencia de este microorganismo en el agua.

Lo anterior coincide con lo reportado por Alishyna y col. en 1984, quien afirma que altas temperaturas y un incremento de la materia orgánica en el agua favorecen la viabilidad del género *Salmonella* en este medio. Al observar la **tabla 10** se hace evidente que las temperaturas más altas registradas en este estudio son, precisamente, en abril y mayo (25-35°C). Sin embargo, en el mes de febrero, que es donde se registran bajas temperaturas (19-23°C) la disminución en las cuentas del organismo es notable en la **gráfica 1**, lo que coincide también con Rhodes quien ha demostrado que con bajas temperaturas *Salmonella* spp es removida casi en su totalidad del agua de mar.

Asimismo, diversos autores han concluido que el ambiente sedimentario en las playas posee el potencial para proteger los nutrientes necesarios para el desarrollo y persistencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal, así como de organismos patógenos<sup>24, 70, 95, 97</sup>. Además Matson en 1993 probó que este género puede sobrevivir más de tres semanas en sedimentos costeros. Pese a que los sedimentos propiamente no se analizaron, se da por hecho el continuo movimiento de éstos debido al oleaje natural en las playas y al movimiento constante ocasionado por la actividad de los bañistas, así como la influencia que esto tuvo en la alta concentración de organismos registrada en este caso. Por otra parte, aunque el presente trabajo no se llegó a la determinación de las especies del género *Salmonella*, cabe señalar que existe la posibilidad de la presencia de *Salmonella typhi*, y se sabe que esta especie llega a desaparecer del agua de mar hasta después de 2 a 12 semanas del agua de mar<sup>69</sup>. Lo anterior da pauta para temer el riesgo de infecciones por fiebre tifoidea en los bañistas que acuden a estas playas para su recreación.

Aunque el ANDEVA no mostró un comportamiento con diferencias significativas por playas (lugar), es importante hacer notar las altas cuentas con que se aisló a *Salmonella* spp en la playa Boca del Río: de 290 a 1 500 /100 ml en los meses de abril y mayo respectivamente (**tabla 8**).

**Tabla 10.** Temperatura promedio registrada en cada playa durante los 6 muestreos realizados en el puerto de Veracruz en el año de 1992 (°C).

	Boca de Río	Mocambo	Villa del Mar	Puerto	Norte
<b>FEBRERO</b>	19	19.5	19	20	23
<b>ABRIL</b>	25	26	25	25	25
<b>MAYO</b>	32	35	34	31	33
<b>JULIO</b>	29	28	28	29	29
<b>AGOSTO</b>	30	29	28	29	30
<b>SEPT.</b>	29	29	27	28	27

Para el caso del género *Shigella* el cual se aisló en 26 de las 85 muestras, la **tabla 11** presenta los NMP obtenidos para este microorganismo.

**Tabla 11.** Número más probable (NMP) para el género *Shigella* y su logaritmo (log.) (\* Muestreo no realizado; I = 14:00 hrs; II = 18:00 hrs; III = 7:00 hrs)

	Boca de Río NMP — log.		Mocambo NMP — log.		Villa del Mar NMP — log.		Puerto NMP — log.		Norte NMP — log.	
<b>FEBRERO</b>	I	0	0	0	0	40	1.60	0	0	
	II	*	*	*	*	*	*	*	*	
	III	40	1.60	40	1.60	90	1.95	30	1.49	
<b>ABRIL</b>	I	0	30	1.49	930	2.96	110	2.04	0	0
	II	0	0	0	70	1.84	0	0	0	0
	III	110	2.04	30	1.49	90	1.95	0	0	0
<b>MAYO</b>	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	40	1.60
	III	0	0	0	0	0	0	0	40	1.60
<b>JULIO</b>	I	0	0	0	0	40	1.60	0	0	
	II	0	40	1.60	0	0	0	0	0	
	III	0	40	1.60	0	0	0	0	0	
<b>AGOSTO</b>	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	40	1.60	0	0	0	0	0	0	0
	III	40	1.60	0	0	0	30	1.49	0	0
<b>SEPT.</b>	I	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	III	0	70	1.56	0	0	0	0	0	0

El ANDEVA del logaritmo del NMP de *Shigella* spp mostró diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) por muestreo, por horario y en la interacción lugar-muestreo (**tabla 12**).

Tabla 12. ANDEVA factorial del log. del NMP de *Shigella* spp por lugar, muestreo y horario. (\* Efectos estadísticamente significativos a  $P < 0.01$  ; GL Grados de libertad ; CM Cuadrado de las Medias ; F Razón F ; P Nivel de significancia)

FUENTES VARIACIÓN	DE	GL	CM	F	P
Lugar		4	0.3352	0.895	0.4749
Muestreo		5	1.5375	4.106	0.0038 *
Horario		2	1.2271	3.277	0.0471 *
Lugar-Muestreo		20	.9211	2.460	0.0064 *
Lugar-horario		8	0.5173	1.382	0.2311
Error		44	0.3744		

Como lo indicó el ANDEVA de la tabla 12 y al observar la gráfica 2 se concluyó que fue en los meses de febrero y abril donde se encontró la mayor densidad para el género *Shigella*. El factor que pudo influir en esta densidad durante abril fue la presencia de un "norte", el cual provocó, posiblemente, un gran movimiento de corrientes y por consiguiente, la resuspensión y esparcimiento del material contaminante que pudiera estar en el fondo hacia la superficie; además de la presencia de gran cantidad de vacacionistas presentes en el lugar por el período de "semana santa".

Por otra parte, El-Sarkawi y colaboradores han mostrado que a bajas temperaturas del agua de mar (15-25°C) hay mayor sobrevivencia de *Shigella* spp en tanto que a temperaturas altas (35-40°C), la permanencia no va más allá de 3 a 4 días. A pesar de este corto periodo de vida, el microorganismo pudo ser aislado en todas las playas estudiadas. Nuestros resultados concuerdan con lo anteriormente expuesto, ya que fue en febrero donde se encontró la mayor densidad de *Shigella* spp. En este mes las temperaturas registradas oscilaron entre 19 y 23°C. Sin embargo, en el mes de mayo con una temperatura del agua hasta de 35°C, el decremento en las cuentas de este microorganismo fue notable.

Debido a que el ANDEVA mostró diferencias significativas en el comportamiento por horario para el género *Shigella*, se observó que la densidad fue mayor a las 7:00 AM (gráfica 3). Se puede inferir que es en este horario donde se da la mayor actividad en los hoteles, pues al tomar las muestras de este horario se presenciaron las mayores descargas provenientes de éstos. Además la temperatura es más baja que al mediodía o por la tarde.

En la Dirección General de Aguas del Puerto de Veracruz se consultó un plano del puerto y se ubicaron en él los principales vertederos de agua pluvial que desembocan directamente al mar; los exclusivamente pluviales y los que

se denominan "combinados", que son aquellos en los que además del agua de lluvia, acarrean desechos domésticos. Se reportaron 8 diferentes efluentes combinados en la zona límite del municipio de Boca de Río, los cuales abarcan las playas del Puerto y Villa del Mar, cuyos efluentes más cercanos esta ubicados en las calles de Abasolo y Churubusco, respectivamente. Paradójicamente, la zona del Puerto cuenta con vertederos exclusivamente pluviales, 6 en total que desembocan principalmente en la zona de astilleros. Hacia las playas Mocambo y Boca de Río también existen estos efluentes. En la zona de playa Mocambo hay al menos 6 y en Boca de Río hay cuando menos 2 que desembocan directamente al río Jamapa.

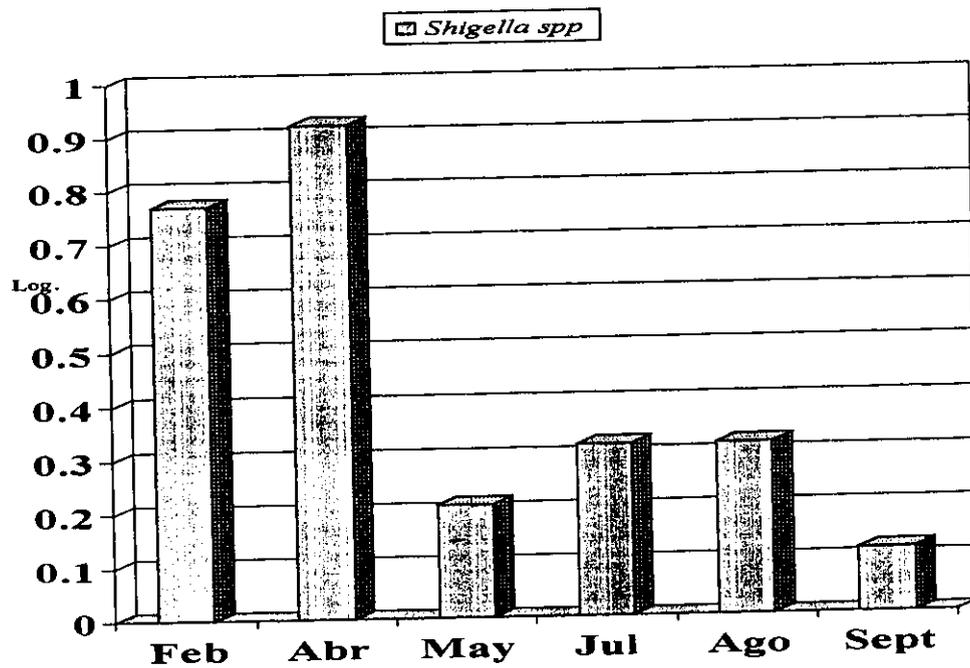
No debe hacerse a un lado la importancia que tienen para los niveles de contaminación registrados la gran cantidad de vertederos pluviales y combinados que existen en el puerto. Estas cuentas microbianas pudieron deberse a un bajo efecto de dilución, lo cual estaría propiciando una acumulación de microorganismos debido al flujo constante de los efluentes

Por otra parte, aunque el género *Salmonella* se encuentra en menor cantidad con respecto a *Shigella* spp y la bibliografía reporta que para causar fiebre tifoidea se requieren de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^9$  salmonelas ingeridas<sup>46,72</sup>, no se deben subestimar las cantidades encontradas en este análisis tomando en cuenta lo severas que son las enfermedades salmonelósicas. El simple hecho de encontrar a *Salmonella* spp en el agua representa ya, un foco de alarma y un riesgo a la salud para los nadadores.

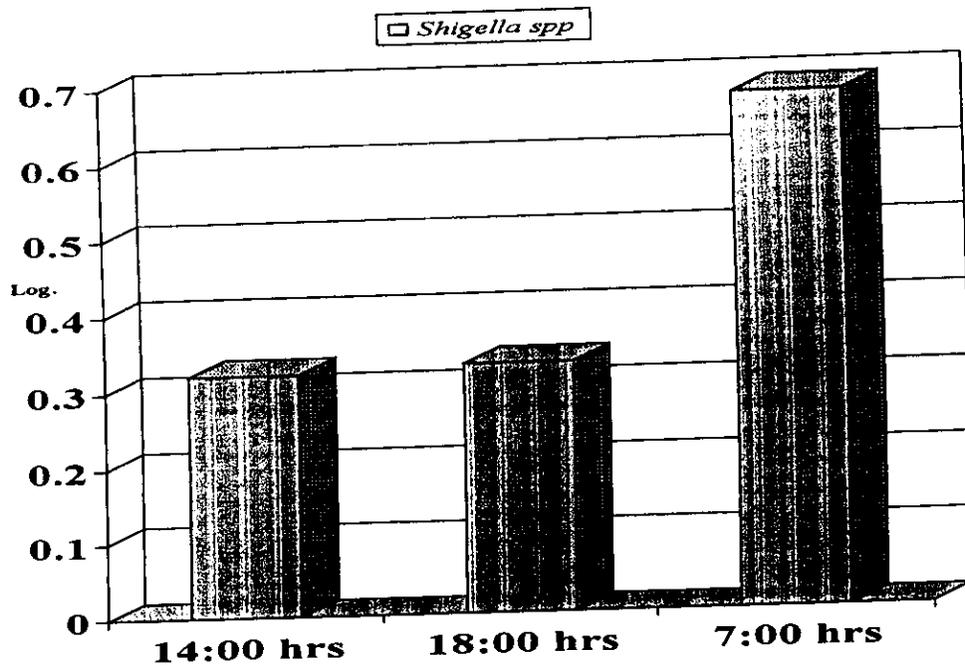
Las cuentas registradas para el género *Shigella* (hasta 930 en abril en la playa Villa del mar) confirman un alto riesgo para la salud de los bañistas ya que para adquirir disentería se requiere de la ingestión de relativamente pocas shigellas ( $100-200/100$  ml)<sup>72</sup>, aunque hay autores que reportan que hasta 10 microorganismos son suficientes para causar la enfermedad<sup>30</sup>.

Repetiendo, en las 6 visitas efectuadas se analizaron 85 muestras para investigar la presencia de los géneros *Salmonella* y *Shigella*, de las cuales en 18 se encontró a *Salmonella* spp (21%) y en 26 a *Shigella* spp (31%). En el caso de *Salmonella* spp Boca de Río contribuyó con 3.5 % al igual que la playa del Norte, Mocambo y Villa del Mar con un 4.7% cada una, y la playa Puerto con un 2.3%. Para *Shigella* spp Boca de Río contribuyó con un 4.7% al igual que Villa del Mar; la playa del Puerto con un 5.8%, Mocambo con un 7.05% y playa Norte con 2.3%

Gráfica 2. Prueba de LSD del logaritmo del NMP para *Shigella* spp por muestreo



Gráfica 3. Prueba de LSD del logaritmo del NMP para *Shigella* spp por horario



## 6.2. Evaluación cuantitativa para ct, cf y ef

La presencia de patógenos entéricos en el agua casi siempre está acompañada por gran cantidad de coliformes, por lo cual fue conveniente establecer la densidad de los organismos indicadores por excelencia (ct y cf) así como de los ef para los cuales se registran los límites que debe contener el agua marina para uso recreativo por contacto directo, estas normas de calidad son: 500 ct/100 ml., 200 cf/100 ml. y 100 ef/100ml<sup>60, 84</sup>. Escobar, en 1988 enfatiza la importancia que tiene el análisis de las poblaciones y tipos de estos microorganismos; su presencia en el medio es criterio sobre las relaciones ecológicas existentes y de la calidad ambiental. De este modo, la distribución de las bacterias del grupo coliforme en aguas costeras confirma el origen fecal de la contaminación e infiere sobre la presencia de los gérmenes patógenos, cuyo número es casi siempre inferior al de las bacterias coliformes normales

Las tablas 13, 14 y 15 muestran las medias geométricas (MG) de los números más probables (NMP) obtenidos para los ct, cf y ef y sus logaritmos respectivamente.

**Tabla 13.** Medias geométricas y sus logaritmos de coliformes totales (ct)  
(\* Muestreo no realizado; I = 14:00 hrs; II = 18:00 hrs; III = 7:00 hrs)

		Boca de Río		Mocambo		Villa del Mar		Puerto		Norte	
		MG	log.	MG	log.	MG	log.	MG	log.	MG	log.
FEBRERO	I	3485	3.54	7066	3.84	118651	5.07	31286	4.4	185043	5.26
	II	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	III	7179	3.85	15846	4.19	185042	5.26	7253	3.86	27227	4.43
ABRIL	I	61513	4.78	13875	4.14	12633	4.10	2059	3.31	37516	4.57
	II	142670	5.15	11885	4.07	3533	3.54	7017	3.84	45227	4.65
	III	185043	5.26	3526	3.54	482	2.68	39459	4.59	27149	4.43
MAYO	I	95244	4.97	37797	4.57	7287	3.86	240000	5.38	185043	5.26
	II	118652	5.07	34126	4.53	2851	3.45	240000	5.38	185043	5.26
	III	185043	5.26	40613	4.60	19452	4.28	240000	5.38	110000	5.04
JULIO	I	2995	3.47	106689	4.13	1396	4.11	4514	3.65	240000	5.38
	II	4309	3.63	13642	2.1	16735	4.22	10907	4.03	240000	5.38
	III	8124	3.9	111398	5.04	106689	5.02	185043	5.26	240000	5.38
AGOSTO	I	240000	5.38	8468	3.92	70533	4.84	142670	5.15	142670	5.15
	II	240000	5.38	16812	4.22	240000	5.35	185043	5.26	118652	5.07
	III	33821	4.52	81513	4.78	185043	5.26	17347	4.23	*	*
SEPT.	I	62801	4.79	3408	3.53	7559	4.87	240000	5.38	240000	5.38
	II	62617	4.79	9524	3.97	10620	4.02	40613	4.60	240000	5.38
	III	62801	4.79	10912	4.03	62617	4.79	9449	3.97	240000	5.38

Tabla 14. Medias geométricas y sus logaritmos de coliformes fecales (cf)

(\* Muestreo no realizado; I = 14:00 hrs; II = 18:00 hrs; III = 7:00 hrs)

		Boca de Río		Mocambo		Villa del Mar		Puerto		Norte	
		MG	log.	MG	log.	MG	log.	MG	log.	MG	log.
FEBRERO	I	4065	3.60	2111	3.32	1749	4.24	28988	4.46	476	2.67
	II	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	III	2581	3.41	4916	3.09	40613	4.60	7253	3.86	972	2.98
ABRIL	I	10805	4.03	2678	3.42	3241	3.71	1871	3.27	12790	4.10
	II	14197	4.14	1821	3.26	1721	3.23	7017	3.84	13875	4.14
	III	14331	4.15	1863	3.27	3130	2.50	21805	4.33	26312	4.42
MAYO	I	95244	4.97	613	2.78	6166	3.78	9831	3.99	185043	5.26
	II	91482	4.96	1361	3.13	6771	3.83	4546	3.65	185043	5.26
	III	82150	4.91	2210	3.34	9332	3.96	5138	3.71	110000	5.04
JULIO	I	600	2.77	0	0	4849	3.68	1682	3.22	240000	5.38
	II	1080	3.03	0	0	2383	3.37	4379	3.64	240000	5.38
	III	2365	3.37	453	2.6	17296	4.23	5506	3.74	138376	5.14
AGOSTO	I	24000	4.38	2344	3.36	13890	4.14	1392	3.14	68410	4.83
	II	14507	4.16	7555	3.87	47365	4.67	2098	3.30	118652	5.07
	III	16553	4.21	26998	4.43	36103	4.55	5507	3.74	*	*
SEPT.	I	23662	4.37	1227	3.08	1129	3.05	70534	4.84	142669	5.15
	II	19189	4.28	13909	4.14	2291	3.36	14778	4.16	185047	5.26
	III	14479	4.16	6733	3.82	7238	3.85	8962	3.95	240000	5.38

Tabla 15. Medias geométricas y sus logaritmos de estreptococos totales (ef)

(\* Muestreo no realizado; I = 14:00 hrs; II = 18:00 hrs; III = 7:00 hrs)

		Boca de Río		Mocambo		Villa del Mar		Puerto		Norte	
		MG	log.	MG	log.	MG	log.	MG	log.	MG	log.
FEBRERO	I	716	2.85	300	2.47	240000	5.38	330	2.51	962	2.98
	II	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	III	1547	3.18	330	2.51	240000	5.38	363	2.56	81214	4.90
ABRIL	I	53407	3.72	686	2.83	3073	3.48	300	2.47	39866	4.60
	II	13137	4.11	13526	4.13	6181	3.79	416	2.61	85889	4.93
	III	11946	4.07	400	2.60	3747	3.57	6130	3.78	106689	5.02
MAYO	I	30956	4.49	15298	4.18	1565	3.19	61727	3.79	61513	4.78
	II	3279	3.51	81214	4.90	25489	4.40	4697	3.67	61513	4.78
	III	37797	3.57	27148	4.43	17251	4.23	8673	3.93	42339	4.62
JULIO	I	648	2.81	1392	3.14	8572	3.93	4300	3.63	240000	5.38
	II	1200	3.07	2391	3.37	6306	3.79	2833	3.45	240000	5.38
	III	4298	3.63	3979	3.59	79782	4.90	63283	4.8	240000	5.38
AGOSTO	I	106548	5.02	600	2.77	2232	3.34	3566	3.50	142670	5.15
	II	240000	5.38	884	2.94	6783	3.88	11737	4.06	91482	4.96
	III	47302	4.67	981	2.99	902	2.95	5200	3.71	0	0
SEPT.	I	13529	4.13	9252	3.96	1774	3.24	240000	5.38	58635	4.76
	II	19189	4.28	45835	4.65	5414	3.75	25582	4.40	240000	5.38
	III	7686	3.88	3301	3.51	1978	4.29	4720	3.67	240000	5.38

Asimismo, las gráficas 4, 5 y 6 ilustran la comparación múltiple de medias (LSD) aplicada a los logaritmos de dichas medias geométricas por lugar, muestreo y horario respectivamente. Además, las tablas 16, 17 y 18

contienen el análisis de varianza (ANDEVA) aplicado a los resultados obtenidos para estos tres grupos.

Tabla 16. ANDEVA factorial del log. de la media geométrica para coliformes totales (ct) por lugar, muestreo y horario. (\* Efectos estadísticamente significativos a  $P < 0.01$ ; GL Grados de libertad; CM Cuadrado de las Medias; F Razón F; P Nivel de significancia)

FUENTES DE VARIACIÓN	DE GL	CM	F	P
Lugar	4	1.6636576	8.623	0.0000 *
Muestreo	5	1.1159761	5.784	0.0003 *
Horario	2	0.0454247	0.235	0.7912
Lugar-Muestreo	20	0.7517620	3.896	0.0001 *
Lugar-horario	8	0.0707488	0.367	0.9325
Error	44	0.1929342		

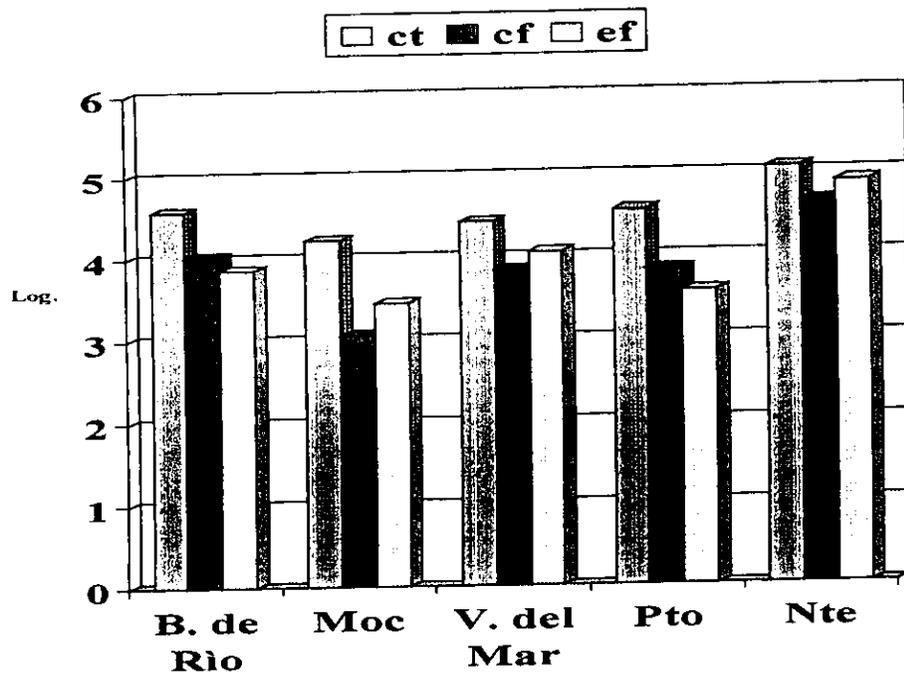
Tabla 17. ANDEVA factorial del log. de la media geométrica para coliformes fecales (cf) por lugar, muestreo y horario. (\* Efectos estadísticamente significativos a  $P < 0.01$ ; GL Grados de libertad; CM Cuadrado de las Medias; F Razón F; P Nivel de significancia)

FUENTES DE VARIACIÓN	DE GL	CM	F	P
Lugar	4	6.0090477	35.952	0.0000 *
Muestreo	5	1.9527388	11.683	0.0000 *
Horario	2	0.4919327	2.943	0.0631 *
Lugar-Muestreo	20	1.5272849	9.138	0.0000 *
Lugar-horario	8	0.1962272	1.174	0.3361
Error	41	0.1671416		

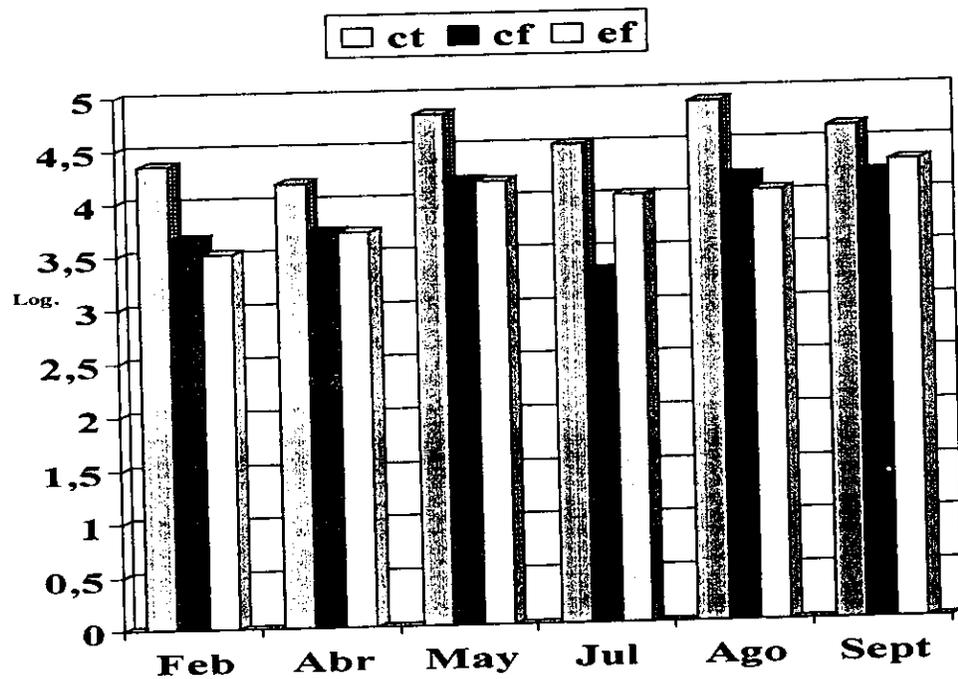
Tabla 18. ANDEVA factorial del log. de la media geométrica para estreptococos fecales (ef) por lugar, muestreo y horario. (\* Efectos estadísticamente significativos a  $P < 0.01$ ; GL Grados de libertad; CM Cuadrado de las Medias; F Razón F; P Nivel de significancia)

FUENTES DE VARIACIÓN	DE GL	CM	F	P
Lugar	4	4.9921062	23.099	0.0000 *
Muestreo	5	1.1638305	5.385	0.0006 *
Horario	2	0.5641741	2.611	0.0848 *
Lugar-Muestreo	20	1.1812156	5.466	0.0000 *
Lugar-horario	8	0.2293453	01.061	0.4071
Error	43	0.2161152		

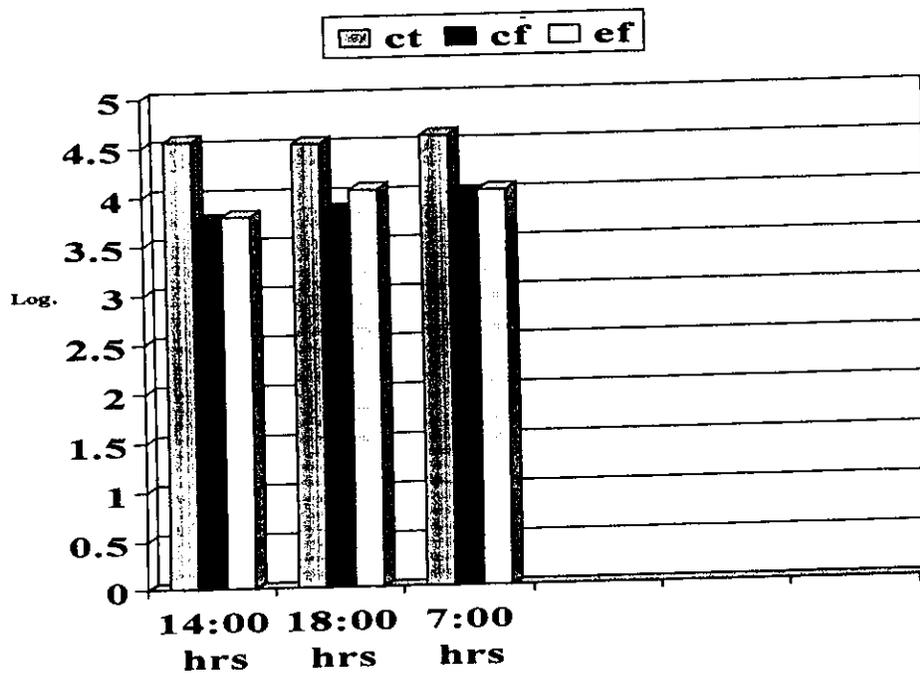
Gráfica 4. Prueba de LSD del logaritmo de la media geométrica del NMP para coliformes totales (ct), coliformes fecales (cf) y estreptococos fecales (ef) por lugar



Gráfica 5. Prueba de LSD del logaritmo de la media geométrica del NMP para coliformes totales (ct), coliformes fecales (cf) y estreptococos fecales (ef) por muestreo



Gráfica 6. Prueba de LSD del logaritmo de la media geométrica del NMP para coliformes totales (ct), coliformes fecales (cf) y estreptococos fecales (ef) por horario



En las **tablas 13, 14 y 15** son notables las altas cuentas bacterianas encontradas en playa Norte (hasta de 240 000 **ct**/100 ml, 240 000 **cf**/100 ml y 240 000 **ef**/100 ml), éstas pueden ser atribuidas a una baja eficiencia en la remoción de microorganismos en el proceso de tratamiento de las aguas en la planta destinada para este uso y que se ubica en esta playa, ya que incluso se encontraron fragmentos de materia fecal sobre la zona a unos 1000 m de donde se encuentra el efluente de la planta. Otra posibilidad es que la planta de tratamiento de agua no se encontrara funcionando por alguna falla en el sistema general. Estas resultan sólo especulaciones pues el personal que labora en la planta de tratamiento se negó sistemáticamente a proporcionar cualquier tipo de información.

A pesar de existir una planta de tratamiento en los márgenes del río Jamapa y propiamente en la playa Boca de Río, ésta al parecer, presenta también ineficiencias en el tratamiento de las aguas que allí desembocan. Aunque se esperaba que la mezcla en esta playa fuera un factor de ayuda en la dilución de contaminantes microbianos, no resulta así, ya que el agua proveniente del río Jamapa, al ser agua dulce, tarda más en mezclarse con el agua de mar debido a la diferencia de densidades.

En Boca de Río se encontraron valores que en todos los casos rebasaron las normas establecidas (hasta de 240 000 **ct** /100ml, 95 244 **cf** /100 ml y 240 000 **ef** /100 ml).

Las playas de Mocambo, Villa del Mar, y Puerto presentaron algunas similitudes en sus características físicas, así como en la carga de bañistas que soportan durante las temporadas vacacionales. Los criterios de calidad para agua recreativa nuevamente se vieron rebasados en estas playas: en Mocambo se obtuvieron cuentas hasta 106 000 **ct** /100 ml, 26 998 **cf** /100 ml y 81 214 **ef** /100 ml. Los resultados en Villa del Mar se registraron hasta 240 000 **ct** /100 ml, 47 365 **cf** /100 ml y 240 000 **ef** /100 ml; y los de playa Puerto hasta 240 000 **ct**/100 ml, 21 805 **cf**/100 ml y 16 553 **ef**/100 ml (**Tablas 13, 14 y 15**).

Fue interesante notar que durante los horarios de muestreo se presentó un comportamiento casi constante en las cuentas de **ct**, **cf** y **ef**, probablemente porque las descargas son intermitentes por la mañana y se mantienen constantes por la tarde y noche.

Por otra parte, en la **gráfica 5** (factor **muestreo**) y en las **tablas 13, 14 y 15** es notable observar que la mayor densidad de grupos indicadores ocurrió en los meses de mayo, julio y agosto. En los demás meses de muestreo las cantidades

de microorganismos presentaron valores inferiores, aunque en todos los meses el límite establecido fue ampliamente rebasado.

Es importante recalcar que los meses de mayor incidencia coinciden con los períodos vacacionales de "Semana Santa" y las vacaciones de verano, las cuales acarrearán gran cantidad de turistas y con ellos mayor descarga de contaminantes a las playas.

En el caso de Boca de Río, cabe recordar que esta playa es, por tradición, una zona de extracción de moluscos bivalvos entre los que destaca el ostión, que en esta región tiene una gran explotación aún cuando no hayan alcanzado la talla ideal para su captura. Aunque esta observación pudiera parecer un tanto ilógica ya que el muestreo se realizó en la playa y no propiamente en el área de extracción de moluscos, puede resultar, incluso, que las cuentas microbianas fueran mayores ya que la zona de extracción se encuentra influenciada directamente por una zona residencial comunicada por medio de canales y en la que no existe otra forma de desalojo de desechos que no sea directamente al agua.

Lo anterior reviste gran importancia por riesgo que representan los altos niveles de cf en esta agua (95 244, **tabla 14**), pues está establecido que las aguas para el cultivo de ostión no deben contener más de 14 cf/100 ml, ya que cantidades mayores pueden ser concentradas por los moluscos bivalvos en desarrollo y no llenar los requisitos establecidos por las normas de un máximo de 230 cf/100 g de pulpa de ostión<sup>4,5</sup>.

### **6.3. Análisis y discusión para la relación entre los coliformes fecales con respecto a los géneros *Salmonella* y *Shigella***

Diversos autores<sup>7, 31, 38, 53, 95</sup> han determinado que la detección de los géneros *Salmonella* y *Shigella* depende del origen de la descarga y determinaron que la mejor correlación se encuentra con los cf; las **tablas 19 y 20** muestran las relaciones entre cf y estos patógenos en el presente estudio. De las 85 muestras analizadas en el 100 % se encontró a los cf.

Tabla 19. Relación entre NMP de cf y NMP de *Salmonella* spp

(\* Muestreo no realizado; I = 14 00 hrs; II = 18:00 hrs; III = 7:00 hrs)

	Boca de Río	Mocambo	Villa del Mar	Puerto	Norte	
FEBRERO	I	0	0	0	0	
	II	*	*	*	*	
	III	0	0	0	0	
ABRIL	I	0	3.36	0.572	0	
	II	0	0	0	0	
	III	2.02	2.14	18.17	0	0.114
MAYO	I	0	21.18	0.49	0	
	II	0	0	0.59	0	0.0162
	III	1.82	0	0	0	0.0327
JULIO	I	0	0	0	0	
	II	0	0	0	0	
	III	0	0	0	0.54	0
AGOSTO	I	0.25	0	0	0	
	II	0	0	0	1.42	0
	III	0	0	0	0	0
SEPT.	I	0	0	0	0	
	II	0	0.28	0	0	0
	III	0	0	0	0	0

Tabla 20. Relación entre NMP de cf y NMP de *Shigella* spp

(\* Muestreo no realizado; I = 14:00 hrs; II = 18:00 hrs; III = 7:00 hrs)

	Boca de Río	Mocambo	Villa del Mar	Puerto	Norte	
FEBRERO	I	0	0	0	0.13	
	II	0	0	0	0	
	III	1.54	0.80	0.22	0.41	0
ABRIL	I	0	1.12	17.79	5.877	0
	II	0	0	4.06	0	0
	III	0.767	1.61	27.25	0	0
MAYO	I	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0.021
	III	0	0	0	0	0.036
JULIO	I	0	0	0	2.37	0
	II	0	0	0	0	0
	III	0	0	0	0	0
AGOSTO	I	0	0	0	0	0
	II	0.27	0	0	0	0
	III	0.24	0	0	0.54	0
SEPT.	I	0	0	0	0	0
	II	0	0	0	0	0
	III	0	1.03	0	0	0

Asimismo el ANDEVA y la LSD de la relación cf/*Salmonella* spp y cf/*Shigella* spp (Tablas 21 y 22 y las gráficas 7, 8 y 9) permiten observar que en los factores (muestreo y horario) la relación de *Shigella* spp con respecto a los cf fue mayor que la relación cf / *Salmonella* spp; mientras que en el factor lugar, en playa Mocambo, el porcentaje de *Salmonella* spp con respecto a los

cf fue mayor que el porcentaje de *Shigella* spp con respecto a los cf. Así, mientras que al género *Shigella* se le aisló hasta en un 27.25% con respecto a los cf en abril (Villa del Mar), *Salmonella* sp fue encontrada en una relación máxima con respecto a los cf de 21.18% en mayo en Mocambo.

Tabla 21. ANDEVA factorial del log. de la media geométrica para la relación cf/*Salmonella* spp por lugar, muestreo y horario. (\* Efectos estadísticamente significativos a  $P < 0.01$ ; GL Grados de libertad; CM Cuadrado de las Medias; F Razón F; P Nivel de significancia)

FUENTES VARIACIÓN	DE	GL	CM	F	P
Lugar		4	0.0583954	1.141	0.3498
Muestreo		5	0.1119125	2.187	0.0728 *
Horario		2	0.550995	1.077	0.3496
Lugar-Muestreo		20	0.394531	0.771	0.7315
Lugar-horario		8	0.589624	1.152	0.3492
Error		44	0.0511833		

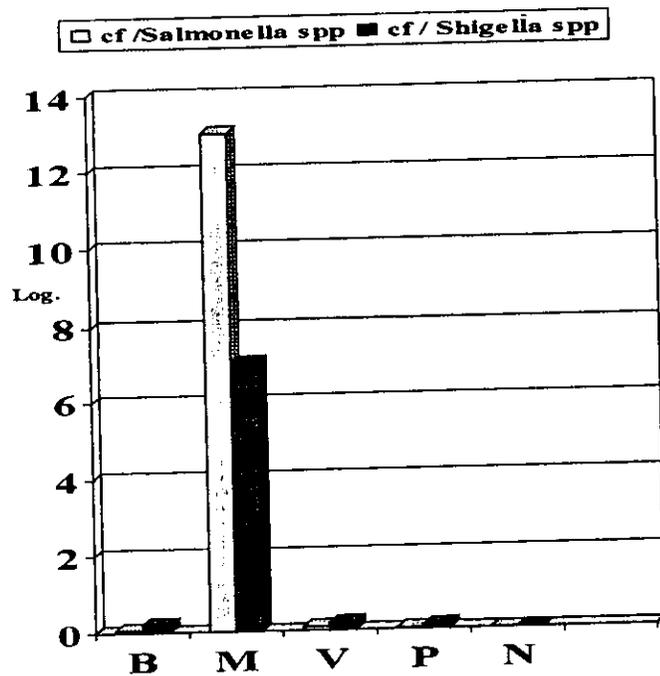
Tabla 22. ANDEVA factorial del log. de la media geométrica para la relación cf/*Shigella* spp por lugar, muestreo y horario. (\* Efectos estadísticamente significativos a  $P < 0.01$ ; GL Grados de libertad; CM Cuadrado de las Medias; F Razón F; P Nivel de significancia)

FUENTES VARIACIÓN	DE	GL	CM	F	P
Lugar		4	0.0994226	1.618	0.1868
Muestreo		5	0.3229358	5.254	0.0007 *
Horario		2	0.0966831	1.573	0.2189
Lugar-Muestreo		20	0.1932680	3.144	0.0008 *
Lugar-horario		8	0.0778718	1.267	0.2851
Error		44	0.0614649		

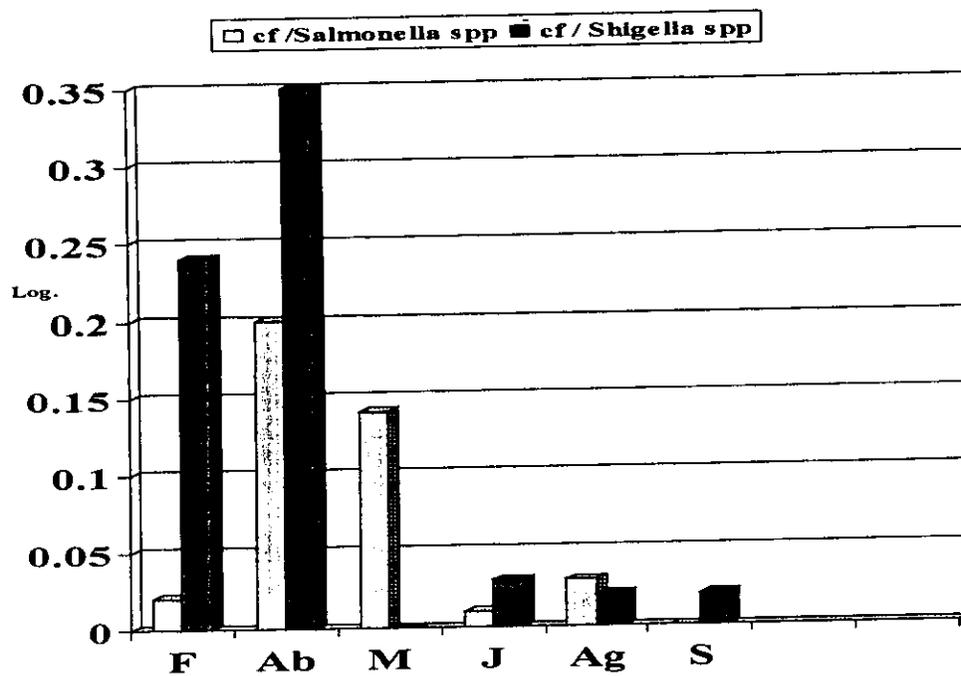
Los ANDEVA para la relación cf/*Salmonella* spp y cf/*Shigella* spp presentaron diferencias significativas por muestreo, lo que resulta evidente al observar la gráfica 8, en la cual se aprecia el dispar comportamiento de estas relaciones en abril y mayo con respecto a los demás meses de muestreo. Esto se explica por la influencia que la gran cantidad de bañistas en la zona tiene sobre la densidad de estos géneros.

En la gráfica 9 es evidente que el porcentaje de shigelas con respecto a los cf es mayor durante el horario de la mañana (7:00 hrs), así como en el mes de febrero (gráfica 8). Lo anterior corrobora nuevamente el efecto favorable de las bajas temperaturas en la sobrevivencia en agua de *Shigella* spp.

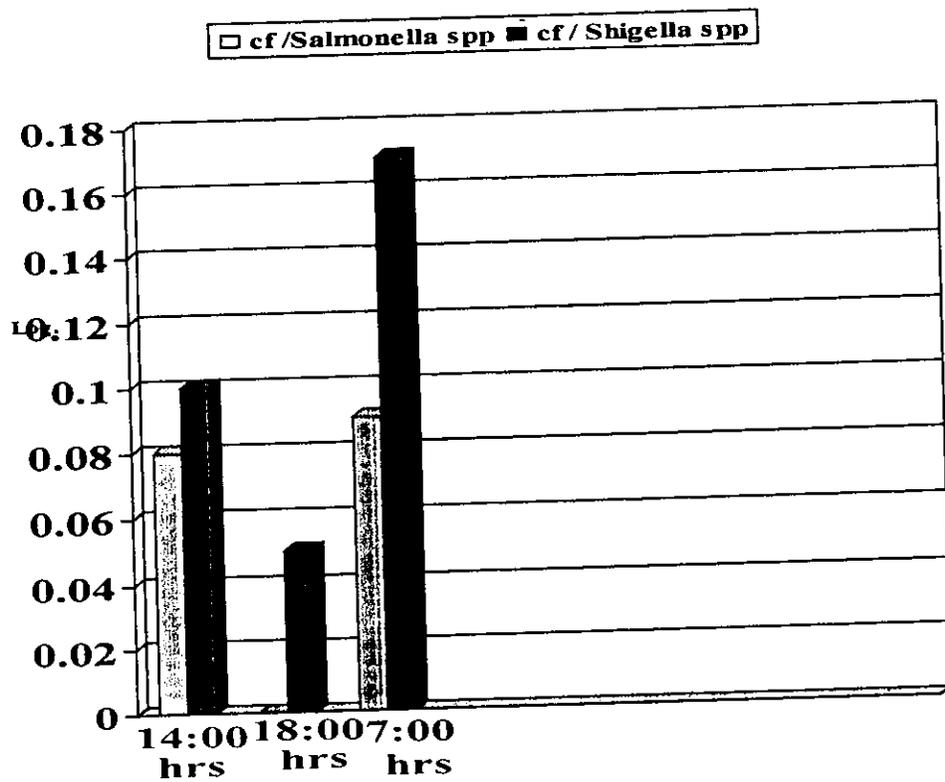
Gráfica 7. Prueba de LSD del logaritmo del NMP para la proporción cf / *Salmonella* spp y la relación cf / *Shigella* spp por lugar



Gráfica 8. Prueba de LSD del logaritmo del NMP para la proporción cf / *Salmonella* spp y la relación cf / *Shigella* spp por muestreo



Gráfica 9. Prueba de LSD del logaritmo del NMP para la proporción cf / *Salmonella* spp y la relación cf / *Shigella* spp por horario



#### 6.4. Observaciones acerca de la proporción coliformes fecales / estreptococos fecales (cf/ef)

Los resultados obtenidos de la densidad de cf y de ef presentes en el área de estudio fueron de gran utilidad para determinar el origen de la contaminación (Tabla 21); con tasas mayores de 4.0 se estableció que la contaminación fue por desechos domésticos con materia fecal humana, mientras que tasas menores de 0.7 indicaron que la fuente provino de animales. Las tasas entre 0.7 y 4.0 se clasificaron como fuentes indeterminadas o mixtas como lo establecieron Van Donsel y Geldreich en 1971. Los datos arrojados en la tabla 21 permitieron concluir que el agua contaminada con materia fecal humana fue la fuente principal de aislamiento de *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

Tabla 21. Prueba de LSD para la proporción de cf / ef con el cual se obtiene la fuente de la contaminación (P < 0.05)

PLAYA (LUGAR)	PROPORCION CF / EF	FUENTE DE CONT.
Boca de Río	4.13	Fecal humana
Mocambo	7.17	Fecal humana
Villa del Mar	3.6	Fecal mixta
Puerto	8.40	Fecal humana
Norte	1.07	Fecal mixta
MES (Muestreo)		
Febrero	13.63	Fecal humana
Abril	2.82	Fecal mixta
Mayo	4.7	Fecal humana
Julio	0.54	Fecal animal
Agosto	6.42	Fecal humana
Septiembre	0.92	Fecal mixta
HORARIO		
14 : 00 hrs.	4.74	Fecal humana
18 : 00 hrs.	3.03	Fecal mixta
7 : 00 hrs.	3.00	Fecal mixta

Además de los géneros *Salmonella* y *Shigella* determinados en este estudio se encontraron bacterias que también representan un riesgo potencial para la salud pública, tal es el caso de los géneros *Proteus* y *Klebsiella* y otros géneros de menor importancia como: *Arizona*, *Serratia*, *Providencia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* quienes fueron determinados como microflora acompañante.

## 7. CONCLUSIONES

Conforme a los objetivos planteados al inicio del presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

Basados en los resultados obtenidos y, a reserva de posteriores estudios ecológicos y epidemiológicos en la zona de estudio, podemos afirmar que las aguas de la cinco playas analizadas en el puerto de Veracruz, México, poseen una pobre calidad sanitaria para su uso recreativo, con el consiguiente riesgo a la salud pública de quien visita estos lugares.

Pudimos también confirmar que el uso combinado de dos técnicas (Filtro de Membrana y tubos de dilución múltiple), resulto ser eficiente para el aislamiento y cuantificación de patógenos en el agua de mar, en este caso para los géneros *Salmonella* spp y *Shigella* spp, pues de las 85 muestras en que se buscó a estos organismos, en 31% se aisló al género *Shigella*, mientras que *Salmonella* spp fue encontrado en 21% de estas muestras.

Asimismo se cuantificaron números más probables (NMP) hasta de 1 500 salmonellas y 930 shigelas. Estas cantidades dan evidencia de un grado de contaminación que puede ser alarmante, sobre todo en el caso de *Shigella* spp, pues se sabe que la dosis mínima infecciosa para adquirir disentería es de 100 a 200 organismos por cien ml<sup>72</sup> y existen antecedentes de brotes de shigelosis en personas que han nadado en aguas con cantidades menores que los aquí reportados (500 shigelas/100 ml) y que han reconocido haber bebido de estas aguas mientras nadaban<sup>51</sup>.

Aunque el mayor NMP establecido para *Salmonella* spp fue de 1 500 en 100 ml, esta cantidad no representa gran peligro como para adquirir alguna salmonelosis, pues se ha determinado que la dosis mínima infecciosa está entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^9$ , el sólo hecho de encontrar al patógeno representa en sí, un alto riesgo para la salud que debe ser tomado en cuenta por las autoridades sanitarias del lugar.

Las cuentas bacterianas de coliformes totales en las cinco playas analizadas (hasta 240 000 en 100 ml) rebasan con mucho la norma establecida por la OMS para este grupo indicador (500-1 000 coliformes totales/100 ml), ubicándolas así como no aptas para la recreación por contacto directo.

Las normas de calidad vigentes para aguas marinas de recreación con respecto a los coliformes fecales (200/100 ml; OMS, 1989 y SEDUE, 1989) y a los estreptococos fecales (100/100 ml; OMS, 1989) fueron también rebasadas en todas las playas (hasta 240 000/100 ml).

Los datos anteriores recalcan el hecho de que debe insistirse en el adecuado tratamiento de las aguas de desecho antes de ser vertidas al mar.

Al efectuar la relación: *cf/Salmonella* spp y *cf/Shigella* spp se observó una mayor cantidad de organismos del género *Shigella* con respecto al número de coliformes fecales (27.25%) que los organismos del género *Salmonella* (21.18%). Existe muy poca o nula información acerca de la relación que puede darse entre la cantidad de coliformes fecales con respecto a especies del género *Shigella*, sin embargo, la mayor relación encontrada entre estos organismos pudo deberse a que, mientras el género *Salmonella* tiene una sobrevivencia paralela a los coliformes fecales (hasta de tres semanas, en los sedimentos y un menor tiempo en el agua)<sup>52</sup>, el género *Shigella* puede sobrevivir hasta 100 días en este medio<sup>87</sup>. Otro estudio que apoya esta idea es el de Gordon quien encontró que *Shigella* spp sobrevive un mayor tiempo que los coliformes fecales, que *Salmonella* e incluso que los estreptococos fecales.

Determinar las cantidades de coliformes fecales y estreptococos fecales fue de gran utilidad para establecer el origen de la contaminación bacteriana en las playas analizadas, ya que se sabe que en el hombre hay menos estreptococos que en los animales y que en éstos hay menos coliformes que en el hombre y que, por lo tanto, realizar una proporción entre los valores de estos dos grupos (*cf/ef*) proporciona un valor que indica el origen de la contaminación: animal, tasas menores de 0.7; humana, tasas mayores de 4.0 y mixta, valores en el intervalo de 0.8 a 3.9<sup>4,5</sup>.

Con estos antecedentes se determinó que la contaminación en tres de las cinco playas analizadas (Boca del Río, Mocambo y Puerto) tienen principalmente un origen fecal humano. En las playas Villa del Mar y Norte el origen de la contaminación resultó ser mixto (material fecal animal y humano), lo cual pone de relieve, una vez más, el grado de contaminación de origen fecal humano que se está desechando en estas playas sin un previo y adecuado tratamiento con los consiguientes peligros a la salud pública.

## 8. RECOMENDACIONES

Sería muy satisfactorio que los efluentes de aguas residuales fueran tratadas y desinfectadas antes de ser arrojadas a los cuerpos de agua receptores, ya que estos procesos permiten reducir el contenido de microorganismos patógenos, así como el contenido de nutrientes necesarios para su persistencia en el medio acuático.

Es notable que la forma de vida de un país a otro es en extremo diferente. El nivel de educación ambiental aún se encuentra en polos opuestos. Los avances tecnológicos y el poder adquisitivo de los países desarrollados no son parámetros que podamos comparar en la mayoría de los casos de nuestro país.

En los países del norte existen programas de monitoreo y seguimiento de la calidad de sus aguas para uso recreativo. Desdichadamente, en México tales programas de vigilancia son escasos o nulos (sobre todo en los hoteles), además de que no se cuenta con los recursos institucionales para mantener vigentes estos programas.

Por todo esto, se propone establecer parámetros adecuados a las condiciones propias del país con el objeto de disminuir el riesgo de salud pública y así formular un criterio de las aguas recreativas, tomando en cuenta la debida protección de los usuarios, una calidad estéticamente aceptable y mantener un ecosistema lo más natural y con el menor daño posible.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA). 1976. *Quality Criteria for Water*, Reporte EPA 440 / 9 - 76 - 023, Oficina para la planificación y estandarización del agua. Washington, D. C. 537 pp.
2. Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA). 1986. Bacteriological ambient water quality criteria availability. *Fed. Regist.* **51** (45): 8012.
3. Alishyna, V. V., Tsatska, A. A. Vlodavets, V. V., Aleshnya, E. P. 1984. Dynamics of *Salmonella* dying off in river water. *Mikrobiol. Zh.* **46** (2):14-18.
4. American Public Health Association/American Water Association/Water Environment Federation Works. 1991. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 17<sup>th</sup> edn, , Washington DC, USA. pp. 53,59,80-92,95-105,150-162.
5. American Public Health Association/American Water Association/Water Environment Federation Works. 1995. *Métodos Normalizados*. 18<sup>a</sup> edición.. Editorial Díaz de los Santos. México. pp.9.59-9.163
6. Araya Vargas, G. y García Cortes, V. 1988. Estudio bacteriológico del bivalvo *Anadara tuberculosa* del estero Puntarenas. *Lat-amer. Microbiol.* **30** (3): 235-238.
7. Bernard, G.A. 1989. The bacteriological quality of tidal bathing waters in Sydney (Australia). *Wat. Sci. Tech.* **21** (2): 65-69.
8. Borrego, J. J., Cornax, R., Morfiño, M. A., Martínez-Manzanares y E. Romero, P. 1990. Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Wat. Res.* **24** (1): 111-116.
9. Breniman, G. R., Rosenberg, S. H. y Northon, R. L. 1981. Microbial sampling variables and recreational water quality standars. *Am. J. Publ. Hlth.* **71** (3): 283-289.

10. Brock, T. D. 1966. *Principal of Microbial Ecology* Prentice Hall. Englewood Cliff, New Jersey. 306 pp.
11. Brooks, G.F., Butel, J. S. Y Ornston, L.N. 1996. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 15ª edición de la 20ª edición en inglés. El Manual Moderno. México. 807 pp.
12. Buchanan, R. E. y Gibbons, N. E. 1982. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8ª. Edición. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, EUA. pp. 415-416, 423-450.
13. Cabelli, V. J., Dufour, A. P., Levin, M. A., McCabe, L. J. y Haberman, P. W. 1979. Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches. *Am. J. Publ. Hlth* . **69** (7): 690-696.
14. Cabelli, V. J. 1984. Environmental Protection Agency. *Health effects criteria for marine recreational waters*. Reporte EPA-600/1-80-031. Washington, D.C. p. 98.
15. Campos, V. 1983. Microbiología y medio ambiente. Los microorganismos como indicadores de contaminación. *Bol. Micol.* **1**: 185-189.
16. Campos, V., Zahr, M., Tello, P. G. y Ríos, R. 1986. Calidad bacteriológica del agua en playas de Valparaíso y Viña del Mar III. Contaminación ambiental. *Bol. Micol.* **3** (1): 93-98.
17. Centro de Investigación y Entrenamiento para el control de la Calidad del Agua (CIECA). 1983. *Memoria de Curso: "Microbiología y Aplicaciones en los Procesos Biológicos de Tratamiento de Aguas*. Dirección General de usos del Agua y Prevención de la Contaminación. Subdirección de Investigación y Entrenamiento. Departamento de Entrenamiento. México, D.F. Capítulo 6, pp.10-11; Capítulo 8, pp. 1-13; Capítulo 11, pp. 1-19; Capítulo 12, pp. 1-17; Capítulo 13, pp. 1-17.
18. Clausen, E. M., Green, B. L. y Litsky, W. 1977. Fecal streptococci: indicators of pollution. En: *Bacterial Indicators*. Hoadley, A.W. y Dutka, B. J. (eds.) . American Society for Testing and Materials. Health Hazars Associated with Water. Publication 635. pp. 247-264.

19. Cohen, J. y Shuval, H. I. 1973. Coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci as indicators of water pollution. *Wat. Air and Soil Pollut.* 2: 85-89.
20. Comité Asesor Técnico Nacional (NTAC). 1968. Administración federal para el control de la contaminación del agua. *Water Quality Criteria*. Washington, USA. p.7.
21. Concilio de la Comunidad Europea (EEC). 1975. Council directive concerning the quality of bathing water. *Off. J. Eur. Communities*. L 31/1.5.2. 76: 17.
22. Comunidad Económica Europea (EEC). 1976. Council directive of 8 december 1975 concerning the quality of bathing water. *Off. J. Eur. Communities*. 19: L 31.
23. Cowan, S. T. y Steel, K. J. 1979. *Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica*. Editorial Continental, S.A., México. pp.149-153.
24. Cherry, B. W., Hanks, B. J., Thomason, M. B., Murlin, M. A., Biddle, W. J. y Croom, M. J. 1972. *Salmonella* as an index of pollution of surface waters. *Appl. Microbiol.* 24 (3): 334-340.
25. Delgadillo, H. F. y Orozco, B. M. V. 1987. Bacterias patógenas en sedimentos de la Bahía de Todos Santos Baja California. *Cienc. Marin.* 13 (3): 31-38.
26. Dirección General de Estadística de la Secretaría de Salud e Instituto Nacional de Estadística y Geografía Informática (INEGI). 1995.
27. Dirección General de Estadística de la Secretaría de Salud e Instituto Nacional de Estadística y Geografía Informática (INEGI). 1996.
28. Dufour, A. P. 1984. Bacterial indicators of recreational water quality. *Can. J. Publ. Hlth.* 75: 49-56.
29. Dufour, A. P. Environmental Protection Agency. 1984. *Health effects criteria for fresh recreational waters*. Reporte EPA- 600 / 1 - 84 004. Cincinnati. p.33.

30. DuPont, H. L. and Hornick, R. B. 1973. Clinical approach to infectious diarrheas. *Medicine*. **52**: 265 -270.
31. Escobar, N. A. 1988. Estudio de algunos aspectos ecológicos y de la contaminación bacteriana en la Bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano. *An. Inst. de Invest. Marinas de Punta de Betin*. **18** : 39-58.
32. El-Sarkawi, F., E-Attar, L., Gaward, A. A. y Molazens, S. 1988. Some environmental factors affecting survival of fecal pathogens and indicators organisms in sea water. **21** (1): 115-120.
33. Estruch, R. L., Callard, M. L., Moren, G., Sang, C. F., Salmon, E. y Montoto, J. 1982. Resultados de una técnica microbiológica en el aislamiento de salmonelas en aguas suspendidas y residuales. *Rev. Cub. Hig. Epid.* **20**: 165-181.
34. Fernández, N. L. M., Parrilla C. M. C. y Salcedo C. N. 1981. Aislamiento de *Vibrio parahemolyticus* de ostiones en México, D.F. *Salud Pública de México*. (32): 275-279.
35. Ferrari, A. Brighenti, E. 1983. Water pollution by pathogen germs: Actual River Adige conditions. *Ig. Mod.* **80** (3):315-320.
36. García, E. 1988. *Modificaciones al Sistema de Clasificación climática de Köppen*. Larios, México. 217 pp.
37. Geldreich, E. E. y Bordner, R. H. 1971. Faecal contamination of fruits and vegetales during cultivation and processing for market. A review. *J. Milk Food Technol.* **34** (4): 184 - 195.
38. Geldreich, E. E. 1979. Membrane filter techniques for Total Coliform and Fecal Coliform Pollution in Water. Cap.3. En: *Membrana Filter Techniques*. Dutka B.J.(ed), CCTW, Canadá.
39. Gordon, A. M. Bissonnette, K. G. Jezeski, J. J. Thomson, A. C. y Stuart, G. D. 1974. Comparative survival of indicator bacterias and enteric pathogens in well water. *Appl. Microbiol.* **27** (5): 823-829.
40. Grun, L. Moller, H. 1974. Staphiglokokkeu-Mikrokokkeu im nasser vin offentlichen Hallenbadern. Staphylococci - Micrococci in the water of public in door swimming pools. *Zbl. Bakt. Hyg. I abt. Orig.* B 158. 561-567.

41. Guevara, G. L. , Aguilar, M. F., De la Fuente, Z. E. y Ordorica L. J.1989 Salmonellosis, 1a. parte. *Rev. Fac. Med. Mex.* 17-31.
42. Holliday, J. Bird, P. Arnold, G. 1991. Purification and storage of Pacific and Sydney rock oysters in NSW. *Austasia Aquacult.* 5 (11):38-40.
43. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), 1995. Anuario estadístico del Estado de Veracruz, México. 3-19.
44. Iyer, T. S. G. y Varma, P. R. G. 1990. Sources contamination with *Salmonella* during processing of frozen shrimps. *Fish. Technol. Soc. Fisch. Technol. Cochín.* 27 (1): 60 – 63.
45. Jabar A., Kadri, M. H. y Salem A.A. 1983. The use of clam as indicator of fecal pollution in seawater. *Water, Air and Soil Pollut.* 20: 257-263.
46. Jawetz, E. y Melnick, J. L. y Adelberg, E. A.1992. *Microbiología Médica.. El Manual Moderno*, 14ª Edición, México. 583 pp.
47. Kampelmacher, E. H. y Van Noorle Jansen L. M. 1970. *Salmonella* its presence in and removal from a waste water system. *J. Wat. Pollut. Control.Fed.* 42: 2069-2073.
48. Koneman, W. E., Allen, D. S., Dowel, R. V. y Sommers, M. H. 1983. *Diagnóstico Microbiológico.* Editorial Médica Panamericana. México. pp. 152-183.
49. Leclerc, J. C. Mossel, D. A., Trinel, P. A. y Gavini, F. 1976. A new test for faecal contamination. **En:** *Bacterial Indicators.* Hoadley, A. W. y Dutka, B. J. (eds.). American Society Testing and Materials. Health Hazards Associated With Water. Publication 635. 159-160.
50. Mac Faddin, S. F. 1980. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica.* Ed. Panamericana. México. pp. 45, 104, 112, 134, 138, 183 y 190.
51. Makintubee, S., Mollonee, J. e Istre, G. R. 1987. Shigellosis outbreak associated with swimming. *Am. J. Publ Heal.* 77: 166 -168.
52. Matson, E. A. 1993. Fecal pollution in Guam's coastal waters and sediments. *Micronesica.* 26 (2): 155-175.

53. Martins, M. T., Pessoa, G. V. A., Sánchez, P. S., Sato, M. I. Z., Monteiro, C. K., Coimbra, C. A., Marques, E. e Irino, K. 1988. Isolamiento de *Salmonella* no ambiente aquático: Significado sanitario. *Rev. Microbiol.* 19 (1): 29-39.
54. Menon, A. S. 1985. *Salmonella* and pollution indicator bacteria in municipal and food processing effluents and the Corwallis river. *Can. J. Microbiol.* 31 (7): 598-603.
55. Meynard, C., Reys, J. P., Tan-Lou, R. y Dumenil, G. 1989. Bacteriological monitoring of seawater: Correlation between fecal and total coliforms and interpretation of the results to the present standards. *Wat. Res.* 23 (3): 663-666.
56. Ministerio de Salud. 1984. *Disposiciones Sanitarias sobre Aguas.* Ministerio de Salud de la República de Colombia, Bogotá. p. 139.
57. Moore, B. 1959. Sewage contamination of costal waters in England and Wales. A bacteriological and epidemiological study. *J. of Hyg.* 57 : 435-472.
58. Moore, B. 1975. The case against microbial standards for bathing beaches. En: *Discharge of Sewage from Sea Outfalls.* Gameson H. (ed.): Pergamont, London. pp. 48-72.
59. Moriñigo, M. A., Cornax, R., Muñoz, M. R., Romero, P. y Borrego, J. J. 1990. Relationship between *Salmonella* spp and indicator microorganisms in polluted natural waters. *Wat. Res.* 24 (1): 117 - 120.
60. Organización Mundial de la Salud. 1977. Health criteria and Epidemiological Studies Related to Coastal Water Pollution. Athens. No. 1 - 4. March 1977. Ginebra.
61. O'Shea, M. L., Field, R. 1992. Detection and disinfection of pathogens in storm-generated flows. *Can. J. of Microbiol.* 38 (4): 267 - 276.
62. Plusquellec, A. Beucher, M. y Le Gal. 1986. *Bivalvia*: indicators of microbial pollution of coastal waters. *Actes Colloq. Ifremer.* 3: 541-548.
63. Ramamurthy, T y Natarajan, R. 1987. Ecology of *Salmonella* in Porto Novo coastal environs. *Ad. in Aquatic Biology and Fish.* Prof. N. Balakrishnan Nair Felicitation.

64. Reasoner, D. J. y Geldreich, E. E. 1989. Detection of fecal coliforms in water by using carbon -14 manitol. *Appl. and Environ. Microbiol.* **55** (4): 907-911.
65. Robertson, W. J. 1984. Pollution indicators and potential pathogenic microorganisms in estuarine recreational waters. *Can. J. Publ. Hlth.* **75**: 19-24.
66. Robles, E., Ramirez, P., Rivera, F., Rivera, V. y Gallegos, E. 1988. Una alternativa para la evaluación bacteriológica de la calidad del agua de piscinas. *Umbrales: Año 1.* **1** (2): 14-17.
67. Rhodes, M. W. y Kator, H. 1988. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella spp* in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2902-2907.
68. Rodrigues, D. P., Solari, C. A., Ribeiro, R. B., Costa, J. E., Reis, E., Silva-Filho, S. J. y Hofer, E. 1989. *Salmonella* em agua de praias do municipio do Río de Janeiro. *Rev. de Microbiol.* **20** (1): 12-17.
69. Rodríguez Santiago, H. y Romero Jarero, H. 1981. Niveles de contaminación bacteriana en dos sistemas fluvio-lagunares asociados a la laguna de Términos Campeche. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. Méx.* **8** (1): 63-68.
70. Rodríguez, S. M. y Botello, A. U. 1987. Contaminación enterobacteriana en la red de agua potable y en algunos sistemas acuáticos del sureste de México. *Contam. Amb.* **3** (1): 37-53.
71. Romero J. y Rodríguez, S. H. 1982. Niveles actuales de contaminación coliforme en el sistema lagunar del Carmen-Machona, Tabasco. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón, Méx.* **9** (1): 121-126.
72. Romero, C. R. 1993. *Microbiología y Parasitología Humana (Bases Etiológicas de las Enfermedades Infecciosas)*. Ed. Médica Panamericana. S.A. de C.V. México. 750 pp.
73. Rosas, I., Yela, A. y Báez, A. 1985. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en ostión *Crassostrea virginica* durante su desarrollo y procesamiento en el mercado. *Cont. Amb. UNAM.* **1**: 51-64.

74. Rosenberg, M. L., Hazlet, K. K., Schaefer, J., Wells, J. G. y Pruneda, R. C. 1976. Shigellosis from swimming. *J. Am. Med. Assoc.* **236**: 1849 - 1852.
75. Rowse, A. J. y Fleet, G. H. 1982. Viability and Release of *Salmonella* charity and *Escherichia coli* from oyster feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** (3): 544-548.
76. Saheki, K., Kobayashi, S., Kawanishi, T. 1989. *Salmonella* contamination of eel culture ponds. *Nippon Suisan Gakkaishi/Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **55** (4): 675-679.
77. Sanin, F. D., Vesilind, P. A. y Martel, C. J. 1994. Pathogen reducing capabilities of freeze/thaw sludge conditioning. *Wat. Res.* **28** (11): 2393 - 2398.
78. Schoebitz, R. y Montes, L. 1984. Indicadores de contaminación bacteriológica y presencia de *Salmonella* en aguas del Río Valdivia (Chile). *Arch. Med. Vet.* **16** (2): 86-92..
79. Schwartzbrod, J., Block, J. C., Collomb, J. 1983. Surface water *Salmonellae*: Serotypes and antibiotic resistance. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.* **42** (2-3): 179-189.
80. Scoglio, M. E. 1983. Indagine batteriologica e chimica sulle acque di piscina. *Igiene Moderna.* **80**: 507-521.
81. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1978. Reglamento para la prevención y control de la contaminación de aguas. *Informe Técnico, México.* 5 - 43.
82. Sector Salud. Encuesta Nacional de Salud II. 1994.
83. Sector Salud e Instituto Nacional de Estadística y Geografía Informática. *Tabulados Inéditos de Uso Interno.* 1997.
84. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE). 1989. Norma Técnica Ecológica CE-CCA-001/89. Criterios de calidad del agua. *Diario Oficial.* 13 de diciembre 1989.

85. Seyfried, L P. y Cook, J. R. 1984. Otitis externa infections related to *Pseudomonas aeruginosa* levels in five Ontario lakes. *Can. J. Publ. Hlth.* 75: 83-91.
86. Singh, A. K. 1985. Physico-chemical and bacterial study of sewage water discharged into the River Ganga at Bhagalpur, India. *Environ. Ecol.* 3 (2): 138-142.
87. Sorvillo, J. F., Waterman, H. S., Vogt, K. J. y England, B. 1988. Shigelosis associated with recreational water contact in Los Angeles country. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38 (3): 613 - 617.
88. Srikantaiah, M., Shenoy, M. G., Mohankumar, K. C. 1985. Studies on the occurrence of enteric in the estuarine waters along the Mangalore coast. *Fish. Technol. Soc. Fish. Technol. Cochin.* 22 (1): 74-78.
89. Stevenson, A. H. 1949. Water quality requirements for recreational uses sewage works jour. *Am. J. Publ. Hlth.* 21: 110.
90. Subsecretaría de Infraestructura Hidráulica. 1984. *Manual de Microbiología del Agua*. 3ª Edición. I: 63-178.
91. Tobias, H. y Heinemeyer, E. A. 1994. The presence of *Salmonella* in coastal North sea waters and their hygienic relation to indicator bacteria and sources of contamination. *Zentrablatt fuer Hygiene und Umwelmedizin.* 195 (5-6): 495 - 508.
92. Tobin, R. S. y Ward, W. M. 1984. Guidelines for canadian recreational water quality. *Can. J. Public. Hlth.* 75: 15-18.
93. Vaccaro, R. M., Briggs, C. y Ketchum, B. 1950. Viability of *Escherichia coli* in sea water. *Amer. J. Hlth.* 40: 1257-1265.
94. Valencia, T. M. 1979. Contaminación química y bacteriana del Río Guayas y el Estero del Muerto alrededor de Guayaquil. *Revista Geofísica.* (10-11): 77-97.
95. Van Donsel, J. D. y Geldreich, E. E. 1971. Relationships of *Salmonella* to fecal coliforms in bottom sediments. *Wat. Res.* 5: 1079-1087.

## ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

96. Venkateswaran, K. y Hashimoto, H. 1988. Influence of indicator bacteria on the incidence of *Salmonella* in aquatic environment. *Nippon Suisan GakkaishilBull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **54** (2): 253-258.
97. Yamamoto, N. y López, G. 1985. Bacterial abundance in relation to surface area and organic content of marine sedimentos. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **90**: 209-220.
98. Valdes, M. G. 1989. *Frecuencia de Aislamiento de Klebsiella y otras Enterobacterias Patógenas no Clásicas en Lechones*. Tesis Biología, ENEPI. UNAM, México. 40 pp.
99. Winslow, C. E. A. y Maxon, D. 1928. Bacterial pollution of bathing beach waters. New Haven Harbor. *Am. J. Hyg.* **8**: 299.

## ANEXO \*

**AGAR CITRATO DE SIMMONS.**- Agar de ensayo, totalmente sintético, para la identificación de microorganismos, especialmente de Enterobacteriáceas y ciertos hongos, basado en el empleo de citrato como única fuente de carbono, según Simmons (1926)

<b>Composición (g / l):</b> Cloruro sódico	----- 2.0
Dihidrogenofosfato amónico	----- 0.2
Hidrogenofosfato de sodio y amonio	---- 0.8
Sulfato de magnesio	----- 2.0
Azul de bromotimol	----- 0.08
Agar- agar	-----15.0

**Preparación:** Disolver 23 g /l, distribuir en tubos, esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C) y dejar enfriar en posición inclinada. pH: 6.9 ± 0.1. El medio de cultivo es claro y de color verde azulado.

**AGAR KLIGLER ( Agar- hierro- dos azúcares según Kligler)**

<b>Composición (g / l):</b> Peptona de caseína	----- 15.0
Peptona de carne	----- 5.0
Extracto de carne	----- 3.0
Extracto de levadura	----- 3.0
Cloruro sódico	----- 5.0
Lactosa	----- 10.0
D (+)- glucosa	----- 1.0
Citrato de amonio y hierro (III)	----- 0.5
Tiosulfato sódico	----- 0.5
Rojo de fenol	----- 0.024
Agar- agar	----- 12.0

**Preparación:** Disolver 55.5 g /l, distribuir en tubos y esterilizar a 15 lb por 15 minutos. A continuación dejar solidificar como agar inclinado. El medio de cultivo preparado es claro y de color rojizo parduzco.

**AGAR KF.** Para la demostración y numeración de Enterococos en agua, alimentos y otros materiales según Kenner, Clark y Kabler (1960, 1961)

<b>Composición (g / l):</b> Proteasa-peptona	----- 10.0
Extracto de levadura	----- 10.0
Cloruro sódico	----- 5.0
Glicerofosfato sódico	----- 10.0
Maltosa	----- 20.0

Lactosa - - - - -	1.0
Azida sódico - - - - -	0.4
Púpura de bromocreasol - - - - -	0.015
Agar- agar - - - - -	15.0

**Preparación:** Disolver 71.5 g / l y esterilizar cuidadosamente a 121 °C por 10 minutos. ¡No sobrecalentar! Dejar enfriar hasta 50 °C aprox., incorporar 10 ml de una solución al 1 % de TTC (2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro) y verter en placas. pH: 7.2 ± 0.2. Las placas con medio de cultivo son claras y de color violeta. Las colonias de estreptococos se observan rojas, con halo amarillo.

**AGAR NUTRITIVO.** Para el cultivo de microorganismos poco exigentes.

**Composición (g / l):**

Peptona de carne - - - - -	5.0
Extracto de carne - - - - -	3.0
Agar- agar - - - - -	12.0

**Preparación:** Disolver 20 g / l y esterilizar por 15 minutos a 121 °C. pH: 7.0 ± 0.2. Las placas con el medio preparado son claras e incoloras hasta con una tonalidad amarillenta.

**AGAR SS (Agar para *Salmonella* y *Shigella*)**

**Composición (g / l):**

Peptonas - - - - -	10.0
Lactosa - - - - -	10.0
Bilis de buey - - - - -	8.5
Citrato sódico - - - - -	10.0
Tiosulfato sódico - - - - -	8.5
Citrato de amonio y hierro III - - - - -	1.0
Verde brillante - - - - -	0.0003
Rojo neutro - - - - -	0.025
Agar-agar - - - - -	12.0

**Preparación:** Disolver 60 g / l y verter en placas ¡No esterilizar en autoclave! pH: 7.0 ± 0.1. Las placas con medio de cultivo son claras y parduzcas. Las colonias incoloras y transparentes muestran la presencia de shigelas y la mayoría de las salmonelas. *Proteus* y algunas salmonelas tienen colonias transparentes con centro negro.

**AGAR SOYA TRITICASEÍNA.** Para la conservación de cepas.

**Preparación:** Disolver 40 g / l distribuir en tubos y esterilizar por 15 minutos a 15 lb. Dejar solidificar como agar inclinado

**AGUA PEPTONADA (Tamponada) 1 %.** Para el enriquecimiento previo no selectivo de bacterias, especialmente de Enterobacteriáceas patógenas a partir de alimentos y otros materiales.

**Composición (g / l):** Peptona de carne ----- 10.0  
Cloruro de sodio ----- 5.0  
Tampon de fosfato ----- 10.0

**Preparación:** Disolver 10.0 g / l, distribuir eventualmente en frascos y esterilizar en autoclave (15 minutos a 121 °C). pH: 7.2 ± 0.1. El caldo preparado es claro e incoloro.

**CALDO AZIDA DEXTROSA.** Para el ensayo previo orientativo de Enterococos y para el enriquecimiento selectivo de los mismos.

**Composición (g / l):** Peptona de caseína ----- 15.0  
Extracto de carne ----- 4.8  
D (+)-glucosa ----- 7.5  
Cloruro sódico ----- 7.5  
Azida sódica ----- 0.2

**Preparación:** Disolver 35 g / l, distribuir en tubos y esterilizar en autoclave (15 minutos a 121 °C). (no recalentar) pH: 7.2 ± 0.2, el medio preparado es claro y amarillento. La aparición de turbidez durante la incubación permite sospechar la presencia de Enterococos.

**CALDO BILIS VERDE BRILLANTE.** Para el enriquecimiento selectivo de coliformes totales en agua, leche, alimentos y otros materiales.

**Composición (g / l):** Peptona ----- 10.0  
Lactosa ----- 10.0  
Bilis de buey desecada ---- 20.0  
Verde Brillante ----- 0.0133

**Preparación:** Disolver 40 g / l, distribuir en tubos de ensayo provistos de campana de DURHAM y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. pH: 7.2 ± 0.1. El caldo preparado es claro y de color verdoso.

**CALDO EC.** Para la demostración selectiva de coliformes fecales en agua, leche, alimentos y otros materiales.

**Composición (g / l):** Peptona de caseína ----- 20.0  
Lactosa ----- 5.0  
Mezcla de sales biliares ----- 1.5  
Cloruro sódico ----- 5.0  
Hidrogenofosfato dipotásico ----- 4.0  
Dihidrogenofosfato potásico ----- 1.5

**Preparación:** Disolver 37 g / l, distribuir en tubos de ensayo provistos de campana de DURHAM y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. pH: 6.9 ± 0.1. El caldo preparado y distribuido es claro e incoloro.

**CALDO LACTOSADO.** Medio de cultivo exento de sustancias inhibidoras para el ensayo previo orientativo de bacterias coliformes.

**Composición (g / l):** Peptona de gelatina ----- 5.0  
Lactosa ----- 5.0  
Extracto de carne -----3.0

**Preparación:** Disolver 13 g / l, distribuir en tubos de ensayo provistos de campana de DURHAM y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. pH: 6.9 ± 0.1. El caldo preparado y distribuido es claro e incoloro.

**CALDO ROJO FENOL Y MANITOL.** Medio de cultivo de ensayo para la identificación bioquímica con la "serie de color".

**Composición (g / l):** Peptona de caseína ----- 5.0  
Peptona de carne -----5.0  
Cloruro sódico ----- 5.0  
Rojo de fenol ----- 0.018  
Manitol ----- 5.0 – 10.0

**Preparación:** Disolver 15 g / l, distribuir en tubos de ensayo provistos de campana de DURHAM y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. El caldo listo para el uso es claro y de color rojo.

**CALDO ROJO FENOL Y SACAROSA.** Medio de cultivo de ensayo para la identificación bioquímica con la "serie de color".

**Composición (g / l):** Peptona de caseína ----- 5.0  
Peptona de carne -----5.0  
Cloruro sódico ----- 5.0  
Rojo de fenol ----- 0.018  
Sacarosa ----- 5.0 – 10.0

**Preparación:** Disolver 15 g / l, distribuir en tubos de ensayo provistos de campana de DURHAM y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. El caldo listo para el uso es claro y de color rojo.

**CALDO UREA.** Medio de cultivo de diferenciación para la demostración de microorganismos que utilizan urea.

**Composición (g / l):** Extracto de levadura ----- 0.1  
Dihidrogenofosfato potásico ----- 9.1  
Hidrogenofosfato disódico ----- 9.5  
Urea ----- 20.0

Rojo de fenol ----- 0.01

**Preparación:** Disolver 38.5 g / l calentando, en caso necesario, a 60 °C como máximo. Esterilizar con cuidado por filtración o en marmita de vapor durante 5 minutos ¡No esterilizar en autoclave! pH: 6.8 ± 0.1. El caldo distribuido es claro y de color amarillento anaranjado.

Nota: Si no fuera posible la esterilización por filtración o de otra manera, deberá sembrarse inmediatamente después de la preparación.

### **KOH 40 %**

**Composición:** Hidróxido de potasio ---- 40.0 g  
Agua destilada ----- 100 ml

**MEDIO MR-VP.** Medio de cultivo de ensayo para la realización de la prueba del rojo de metilo y del ensayo VOGES PROSKAUER para la diferenciación bioquímica.

**Composición (g / l):** Peptona de carne ---- 7.0  
D(+)- glucosa ----- 5.0  
Tampon de fosfatos--- 5.0

**Preparación:** Disolver 17 g / l, distribuir en tubos a razón de 5 ml y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. pH: 6.9 ± 0.1

**MEDIO SIM.** Medio de cultivo de ensayo para comprobar la formación de sulfuro, la formación de indol y la motilidad en el marco del diagnóstico para las Enterobacterias.

**Composición (g / l):** Peptona de caseína ----- 20.0  
Peptona de carne----- 6.6  
Citrate de amonio y hierro III ----- 0.2  
Tiosulfato sódico ----- 0.2  
Agar-agar----- 3.0

**Preparación:** Disolver 30 g / l, distribuir en tubos a razón de 4 ml y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Dejar solidificar en posición vertical. pH: 7.3 ± 0.1. El medio preparado es claro y de color ligeramente amarillo.

### **NAFTOL 5 %.**

**Composición:** 1-naftol ----- 5 g  
Alcohol absoluto ----- 100 ml

**REACTIVO DE KOVACS.** Para la demostración del indol producido microbianamente.

**Composición:** n- Butanol ----- 150 ml  
Ácido clohídrico ----- 50 ml

4-dimetilaminobenzaldehído - - - 10 g

**Preparación:** Se recubre el medio (SIM) ya sembrado e incubado, con una capa de 0.5 cm de altura con el reactivo de Kovacs. En presencia de indol libre se presenta, al cabo de algunos minutos, una coloración rojo cereza en la capa del reactivo

**REACTIVO DE EHRLICH.** Para la demostración del indol producido microbianamente.

**Composición:** Etanol - - - - - 190 ml  
Ácido clohídrico - - - - - 40 ml  
4-dimetilaminobenzaldehído - - - 2 g

**SOLUCIÓN DE YODO.**

**Composición:** Yodo - - - - - 6.0 g  
Yoduro de potasio - - - - - 5.0 g  
Agua destilada - - - - - 100 ml

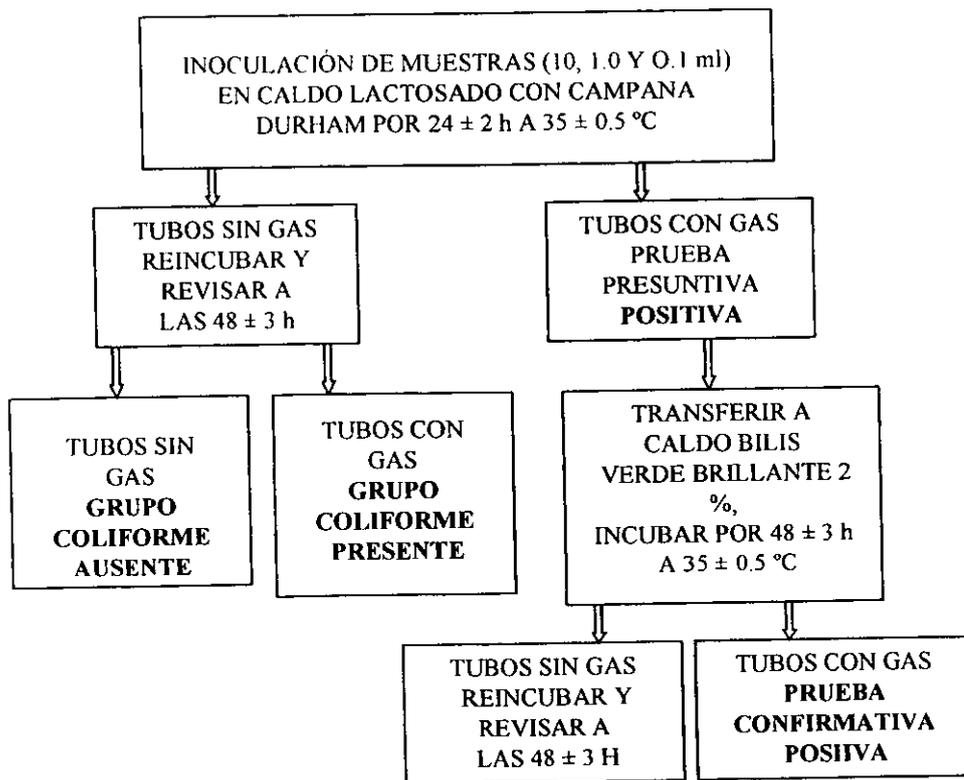
**TETRATIONATO DE SODIO.** Para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* a partir de diversos materiales de investigación (aguas).

**Composición (g / l):** Peptona de caseína - - - - - 2.5  
Peptona de carne - - - - - 2.5  
Mezcla de sales biliares - - - - - 1.0  
Tiosulfato sódico - - - - - 30.0  
Carbonato sódico - - - - - 10.0

**Preparación:** Disolver 46 g / l y en caso necesario, calentar brevemente y enfriar rápidamente. Queda un sedimento de carbonato cálcico. ¡No esterilizar en autoclave! Antes del uso añadir 20 ml/l de solución de yodo. PH: 7.0 ± 0.1. El caldo preparado y listo para su uso debe ser utilizado el mismo día de su preparación.

\*Tomado de Manual de Medios de Cultivo, 1990. MERCK

**Figura 3.** Procedimiento de la técnica de tubos múltiples de fermentación para el aislamiento de coliformes totales <sup>4,5</sup>



**Figura 4.** Procedimiento de la técnica de tubos múltiples de fermentación para el aislamiento de coliformes fecales<sup>4,5</sup>.

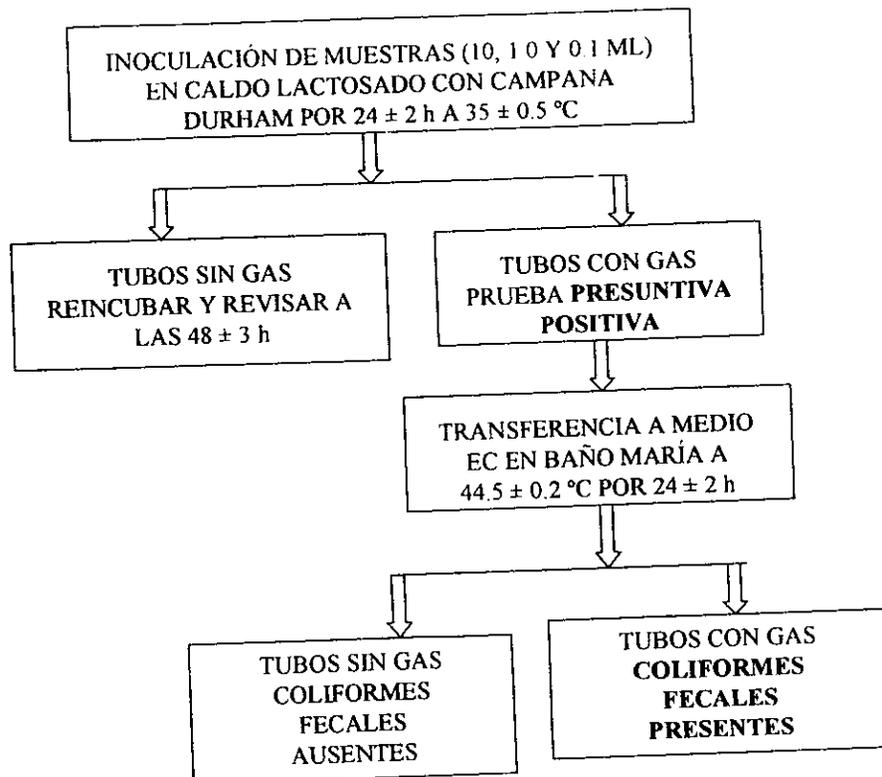


Tabla 7. Tabla de NMP y límites de confianza del 95% para diversas combinaciones<sup>4,5</sup>

Número de tubos positivos de:			NMP 100ml	Límites del NMP		Número de tubos positivos de:			NMP 100ml	Límites del NMP	
10ml	1.0 ml	0.1 ml		Inf.	Sup.	10ml	1.0 ml	0.1 ml		Inf.	Sup.
0	0	0	0	< 3		2	0	1	14		
0	0	1	3	9		2	0	2	20	2.7	37
0	0	2	6			2	0	3	26		
0	0	3	9			2	1	0	15	2.8	44
0	1	2	9			2	1	1	20		
0	1	3	12			2	1	2	27		
0	2	0	6			2	1	3	34		
0	2	1	9			2	2	0	21	3.5	47
0	2	2	12			2	2	1	28		
0	2	3	16			2	2	2	35		
0	3	0	9			2	2	3	42		
0	3	1	13			2	3	0	29		
0	3	2	16			2	3	1	36		
0	3	3	19			2	3	2	44		
1	0	0	4	0.085	20	2	3	3	53		
1	0	1	7	0.67	21	3	0	0	23	3.5	120
1	0	2	11			3	0	1	39	6.9	130
1	0	3	15			3	0	2	64		
1	1	0	7	0.88	23	3	0	3	95		
1	1	1	11			3	1	0	43	7.1	210
1	1	2	15			3	1	1	75	12	230
1	1	3	19			3	1	2	120	30	380
1	2	0	11			3	1	3	160		
1	2	1	15	2.7	36	3	2	0	93	15	380
1	2	2	20			3	2	1	150	30	440
1	2	3	24			3	2	2	210	35	470
1	3	0	16			3	2	3	290		
1	3	1	20			3	3	0	240	36	1300
1	3	2	24			3	3	1	460	71	2400
1	3	3	29			3	3	2	1100	150	4300
2	0	0	9	1.0	36	3	3	3	>2400	460	