



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

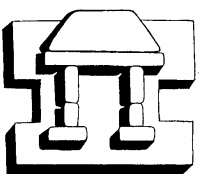
UNIDAD DE INVESTIGACION INTERDISCIPLINARIA  
EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA EDUCACION  
(UIICSE)

**“Aislamiento y Caracterización serológica de  
*Vibrio cholerae*, aislado de la Planta de Tratamiento Cerro  
de la Estrella y de Raíz de Lirio en los canales de  
Xochimilco”**

T E S I S P R O F E S I O N A L  
Q U E P A R A O B T E N E R E L T Í T U L O D E  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A:  
K E I L A A M P A R O L U N A F U E N T E S

**DIRECTOR DE TESIS:**

*Dr. Pedro Ramírez García.*



IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2006.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

A *Dios*, por su amor incondicional y su gracia con que cada día me permite realizar mis sueños.

Al Dr. *Pedro Ramírez García* por todo su apoyo brindado, confianza y dirección en la realización de este trabajo.

Al Dr. *Carlos Eslava Campos* del laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina por su tiempo, apoyo y sus acertadas sugerencias.

A los integrantes del comité tutorial, QFB. *Esperanza Robles Valderrama*, M. en C. *Elizabeth Ramírez Flores* y a la Biol. *Blanca Martínez Rodríguez*, del proyecto CyMA de la UIICSE, por sus observaciones y sugerencias en la revisión de este trabajo y sobre todo por su amistad.

Al M. en C. *Armando Navarro Ocaña* del laboratorio de Salud Pública y Cepario de la Facultad de Medicina, por su ayuda y asesoría en la determinación serológica de los microorganismos.

A la Bióloga *Rocío Ibarra Montes*, del laboratorio de Bacteriología de la UIICSE por su enseñanza, apoyo, dedicación y sobre todo por tu amistad.

Al proyecto DGAPA-PAPIIT IN-210205.

### *DEDICATORIA*

*A Dios*, por que Tú eres mi Padre Celestial, aquel que dio a su hijo Jesús para darnos vida y salvación, gracias por tu amor incondicional, por tu fidelidad, por cada minuto que me dejas respirar y vivirlo para Ti. Gracias Dios por permitirme cumplir un sueño más en mi vida y todas las metas que me permitas alcanzar son por Ti y para Ti, te amo...Gracias!

*A mis abuelitos, Andrés y Amparo*, solo tú abuelita vas a leer esto y quiero que sepas que eres la mejor y que mi abuelito fue el mejor papá del mundo entero, gracias por brindarme su amor, su paciencia, su cariño y su apoyo incondicional en todo momento, gracias por abrirme las puertas de su casa pero sobre todo las puertas de su corazón. Los amo y siempre estarán en mi corazón.

*A mi mamá,* gracias por tu amor y por que a pesar de todo lo que hemos vivido sabemos que el amor siempre vencerá todo lo malo, gracias por tu apoyo, por tus consejos, etc. te amo...

*A mis hermanos, Areli y Anwar* porque ustedes son mis mejores amigos, gracias por esas peleas inolvidables que finalmente nos unieron más, por todos los momentos que hemos pasado juntos, que Dios los guarde siempre y nos permita seguir apoyándonos y queriéndonos, también los amo.

*A mi Tía Dalia,* porque sin duda alguna tú has sido un apoyo muy grande en mi vida y sin ti no hubiera sido posible terminar esta carrera, gracias por todo tu apoyo desinteresado y por tu amor, gracias por esas pláticas que créeme me hacen reflexionar, Te quiero mucho.

*A mis tíos, Beto y Lupis* porque siempre me han molestado y me hacen mucho enojar, gracias por su amor y apoyo, los quiero...

*A mis primas, Noemí y Abigail* porque por ustedes conocí del Señor Jesús, muchas gracias por su amor y apoyo en los momentos que mas las necesite, 1000 gracias por su compañía y cariño, las quiero.

*A mi esposito Miguel,* tú eres lo que yo tanto le pedí a Dios, te amo. Gracias por tu amor y tu apoyo en todo momento, por tu sinceridad, eres mi complemento y mi felicidad, te amo y te agradezco todo lo que haces por nosotras, juntos hacemos una gran familia.

*A mi hija Keymi*, tú eres una gran bendición en nuestras vidas, el angelito que llevo para completar nuestra felicidad, gracias por el simple hecho de existir y a Ti te dedico este trabajo y todo lo que logre alcanzar es para Ti con mucho amor, te amo y eres lo mejor que me ha pasado...

*A mis suegritos Miguel Ángel y Ma. Esther*, por todo su apoyo desinteresado que nos han brindado y por que sé que cuento con ustedes en todo momento, gracias por su confianza, los quiero mucho...

*A mis amigas, Karen, Ale, Graciela, Erika, Moni, Ale M. y Stephi*, gracias por su amistad y su apoyo en todo momento, gracias porque juntas hicimos los ratos más ligeros y divertidos, las quiero mucho.

*A mis compañeros y amigos* del laboratorio de Bacteriología de la FESI, *Lolita Paloma, Rocío, Blanquita Eric y Mago*, los gusanos, muchas gracias por su amistad y por hacer de esos momentos tensos momentos divertidos y amenos, gracias por los cafecitos, los quiero mucho... Los amigos también se conocen al terminar la carrera.

*"Clama a mí, y yo te  
responderé, y te enseñaré  
cosas grandes y ocultas que tú  
no conoces".*

*Jer. 33:3*

## Índice de Contenido

Resumen

Introducción

Antecedentes

Generalidades

Panorama Mundial

Panorama en México

Justificación

Objetivos

Objetivo General

Objetivos Particulares

Área de Estudio

A) Planta de Tratamiento Cerro de la Estrella

B) Xochimilco

Material y Métodos

Parámetros Físico-Químicos

Aislamiento de *Vibrio cholerae*

A) Muestras de agua de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella

B) Muestras de raíz de lirio de los canales de Xochimilco

Enriquecimiento

Bioquímicas

Pureza

Identificación Automatizada VITEK

Susceptibilidad a Antimicrobianos

Tipificación Serológica

Resultados

Parámetros in situ

Aislamientos

Caracterización de las colonias de *Vibrio cholerae*

Tipificación serológica de las cepas de *Vibrio cholerae*

Sensibilidad a Antimicrobianos

Discusión

Conclusiones

Literatura Citada.

Anexo

Índice de Cuadros y Figuras

Figura 1. Planta de Tratamiento Cerro de la Estrella.

Figura 2. Estación 1. Influyente de la Planta de Tratamiento Cerro de la Estrella

Figura 3. Estación 2. Tanque de Salida de Lodos Activados de la Planta.

Figura 5. Estación 4. Rebombeo

Figura 6. Estación 5. Efluente de la Planta de Tratamiento que llaga a Nativitas (Xochimilco)

Figura 7. Estación 1. San Pedro Tláhuac, Xochimilco

Figura 8. Estación 2. Floricultores, Xochimilco.

Figura 9. Estación 3. Coltongo, Xochimilco

Figura 10. Estación 4. Nativitas, Xochimilco.

Cuadro 1. Promedios de los valores del Oxígeno Disuelto ( $\text{mg/L}^{-1}$ ) obtenidos en las diferentes etapas del tratamiento del agua residual en la Planta Cerro de la Estrella

Gráfica 1. Comparación entre el número de aislamientos y el pH.

Gráfica 2. Comparación entre el número de aislamientos y la temperatura del agua.

Cuadro 2. Especies bacterianas identificadas en muestras de agua y raíz de lirio

Figura 11. Hemólisis Parcial en cepas de *Vibrio cholerae*



Figura 12. Hemólisis Completa en cepas de *Vibrio cholerae*

Figura 13. Morfotipo liso en cepas de *Vibrio cholerae* en cultivos de agar sangre e incubados por siete días a temperatura ambiente.

Figura 14. Morfotipo rugoso en cepas de *Vibrio cholerae* en cultivos de agar sangre e incubados por siete días a temperatura ambiente.

Cuadro 3. Frecuencia de serogrupos de *V. cholerae* identificados en las cepas aisladas de muestras de agua y raíz de lirio.

Cuadro 4. Sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *V. cholerae* aisladas de muestras de agua y raíz.

## Resumen

Los efluentes provenientes de aguas residuales tratadas, para diversos usos plantea la problemática de su calidad bacteriológica. Tal situación se torna peligrosa cuando el recurso se reutiliza en servicios al público. El lago de Xochimilco se localiza en el sureste de la ciudad de México y su nivel de agua se mantiene con el efluente de la planta de tratamiento "Cerro de la Estrella" en Iztapalapa. En estudios previos se identificó la presencia de *Vibrio cholerae* No-O1/No-O139 en este lago, por lo que se decidió identificar la fuente de contaminación. En un lapso de 12 meses se colectaron 50 muestras de agua y 28 de raíz de lirio. Las bacterias se aislaron en TCBS, la identificación y la susceptibilidad a antimicrobianos se realizó con el sistema automatizado Vitek (Biomeraux). La tipificación se realizó con sueros de conejo Nueva Zelanda (SERUNAM) preparados contra 155 serogrupos de las cepas tipo. Del agua se identificaron 34 aislados como *Vibrio alginolyticus* y 34 como *Vibrio cholerae*. De raíz de lirio se aislaron 40 *V. cholerae* y 2 *V. fluviales* así como 2 *Aeromonas veronii*. El 82% de las cepas de *V. cholerae* aisladas de lirio fueron resistentes a la Amoxicilina, en las cepas de agua se observó resistencia a más de un antimicrobiano. Los serogrupos más comunes de las cepas aisladas de agua fueron O ND (30%), VO34 (12%) y VO39 / VO6 (9%) y en las cepas de lirio O ND (30%), O52 (18%) y VO34 / VO74 (12%). El análisis de la morfología colonial mostró en las cepas de agua fenotipo rugoso en el 17.64% y en las de lirio 22.5%. Las cepas de raíz presentaron además hemólisis completa en el 17.5% de los *V. cholerae* aislados. Aunque no se identificó *V. cholerae* O1/O139 la presencia del microorganismo en estos cuerpos de agua sugiere su participación como posible reservorio del microorganismo.

## **Introducción**

Se calcula que en la tierra existen aproximadamente  $1,385,000,000\text{km}^3$  de agua, de los cuales el 97.3% es salada, el 2.08% se encuentra congelada en los polos y sólo una pequeña parte está efectivamente disponible para uso y consumo humano (Jiménez, 2001). De esta pequeña parte que tenemos disponible, que es menos del 1%, no toda el agua es apta para uso y consumo humano, ya que el crecimiento no planificado de los asentamientos humanos y el manejo no controlado de los desechos generados por la población, ha provocado el deterioro de los cuerpos hídricos, tornándolos no aptos para su uso, además de que contribuyen de manera importante en la transmisión y propagación de enfermedades que merman el bienestar y la productividad, particularmente de los países en vías de desarrollo.

Cabe mencionar que según clasificaciones internacionales, las regiones que muestran datos por debajo de los  $1,000\text{m}^3$  anuales por habitante, tienen una disponibilidad muy baja o incluso crítica del recurso. Tal es el caso de la parte central y norte de México (CNA, 1999). La disponibilidad hidrológica de la región del Valle de México es notoriamente la más baja del país, no rebasa los  $230\text{m}^3$  anuales por habitante. Aunado a esto, el incremento en la población humana ha generado que la demanda de agua potable sea cada vez mayor y ante esta situación se ha generalizado en ciertas

regiones del mundo el uso de las aguas residuales para diversos usos como son la agricultura, la acuicultura, la recarga de aguas subterráneas y el riego de parques y jardines. En algunos casos las aguas residuales son el único recurso hídrico de las comunidades pobres que subsisten por medio de la agricultura y dado que el uso de este tipo de aguas generalmente no está controlado, se le relaciona con impactos significativos en la salud humana; de esto resulta la importancia de aplicar un buen tratamiento al agua residual. Para ello existen una gran variedad de métodos, entre los cuales destaca el sistema de lodos activados el cual brinda un tratamiento muy eficiente.

La planta de tratamiento “Cerro de la Estrella” que se ubica en la delegación Iztapalapa del D. F., lleva a cabo la regeneración de aguas residuales mediante el sistema secundario de lodos activados, el cual se basa en la descomposición de la materia orgánica presente en el agua mediante la acción de los microorganismos. Sin embargo este tipo de tratamiento no elimina la alta carga bacteriana que está presente en estas aguas residuales ya que aún después del proceso de desinfección se mantiene una considerable carga bacteriana en los efluentes tratados los cuales, en ciertos casos se descargan a los cuerpos de agua.

Cuando estos efluentes con cierta carga de bacterias patógenas llegan a ser descargados a los cuerpos de agua, la supervivencia de estas bacterias se ve seriamente afectada por factores ambientales bióticos y abióticos, tales como la bacterivoría por protozoos, rotíferos y copépodos, oxígeno disuelto, pH, temperatura, concentración de sales y cantidad y disponibilidad de nutrientes. Las bacterias patógenas como *Vibrio cholerae* pueden desarrollar estrategias de supervivencia

formando asociaciones comunitarias por medio de biopelículas con miembros de su misma especie o con organismos de especies diferentes. Estas biopelículas se establecen en torno a un sustrato, que puede ser peces, zooplancton o raíces de plantas acuáticas, como la raíz de lirio (*Eichornia crassipes*), donde las bacterias se protegen de los factores adversos del medio acuático y asegurándose, además, un suministro constante de nutrientes para la comunidad bacteriana, ya sea por la presencia de corrientes de agua que lleven los nutrientes necesarios a toda la biopelícula, o por el intercambio y utilización de productos de desecho entre los miembros de la biopelícula (Kolter y Losick, 1998).

Uno de los cuerpos receptores que reciben estas aguas tratadas es el lago de Xochimilco con la finalidad de mantener su nivel de agua. Particularmente Xochimilco es uno de los principales proveedores de verduras en la Ciudad de México, el sistema de chinampas en donde se cultivan diversos vegetales, forman en su conjunto y desde tiempos prehispánicos, canales en el lago, los cuales también tienen otra función importante al permitir la navegación de pequeñas embarcaciones y proporcionar un importante sitio recreativo a la ciudad. Por su ubicación y las actividades que en él se realizan se le clasifica como una área semirural, que recibe los desechos domésticos y pecuarios de los alrededores, lo que ha llevado al lago a una severa eutrofización. Esta situación le da a los canales de Xochimilco características ecológicas particulares tales como la presencia de macrofitas e incremento de las poblaciones del fitoplancton y zooplancton que pueden favorecer la supervivencia y persistencia de organismos patógenos, como es el caso de *Vibrio cholerae*, que podrían provenir de las poblaciones aledañas o de las aguas residuales que no reciban un buen tratamiento. Estas características deterioran la calidad del agua, lo que representa un factor de

riesgo para la salud al utilizarlas para el riego de hortalizas que se consumen crudas y el contacto indirecto durante el uso recreativo en este tipo de aguas.

*Vibrio cholerae* es un habitante común de ambientes acuáticos salobres o marinos y asociado a cuerpos de agua contaminada, éste es el agente etiológico causante de la enfermedad conocida como cólera. Se trata de un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo que mide de 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho, en cultivos jóvenes (menores a 18 hrs.) se observa en forma de coma y a veces, en forma de S, es catalasa y oxidasa positivo y presenta un solo flagelo polar que le confiere gran movilidad e incluye una amplia variedad de cepas y biotipos tanto patógenas como no patógenas. En la actualidad se conoce que sólo el serogrupo O1 Clásico y El Tor, ambos con los biotipos Ogawa, Inaba e Hikojima y el Serogrupo O139 son los únicos capaces de provocar epidemias de cólera (Shimada, 1994; Faruque, 1998; Villeneuve, 1999).

## Antecedentes

### 1. Generalidades

*Vibrio cholerae* es el agente causal del cólera y fue descrito por primera vez en Italia por F. Pazzini en 1854, encontrando un gran número de bacterias largas y curvadas en pacientes con cólera, a las cuales llamó *Vibrio cholerae*. En ese mismo año, Jonh Snow demostró que el agua era el vehículo de diseminación de la enfermedad.

*Vibrio cholerae* se encuentra dentro del Dominio Bacteria, Phylum BXII Proteobacteria, Clase III Gammaproteobacteria, Orden XI Vibrionales, Familia I Vibrionales, según el manual Bergey de sistemática bacteriológica (Garrity *et al.*, 2001). Son bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, poseen ambos metabolismos, respiratorio y fermentativo, miden de 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho, hay formas involucionadas que usualmente se presentan en cultivos viejos (en fase estacionaria) o bajo condiciones adversas de cultivo, no forman endoesporas, ni microquistes; en medio líquido son móviles por flagelos polares. Muchos son capaces de crecer en un medio mineral con D-glucosa y cloruro de amonio y sólo unas cuantas cepas necesitan factores orgánicos de crecimiento. Los iones sodio estimulan el crecimiento en todas las especies marinas y son un requerimiento para la mayoría.

Se encuentran en el hábitat acuático con ciertas variaciones de salinidad y son comunes en ambientes marinos, se ha encontrado íntimamente asociado a especies de vertebrados e invertebrados (peces, mariscos y zooplancton). Además se puede aislar del agua dulce en ríos, corrientes y lagos. El ser humano es un huésped

incidental y transitorio pero es él quien disemina la bacteria hacia las fuentes de agua y a los alimentos.

## 2. Panorama Mundial

En 1989, Jonson *et al.*, reportaron que *Vibrio cholerae* expresa antígenos de superficie durante la infección, los cuales no se presentan en cultivos *in vitro*, hecho de vital importancia para el entendimiento de la patogenicidad e inmunidad de enfermedades infecciosas.

En 1994, Shimada *et al.*, publicaron un esquema de serotipificación ampliada con 155 serogrupos en total, una herramienta de gran utilidad en investigaciones ecológicas y etiológicas de la enfermedad ocasionada por *V. cholerae*.

En 1995, trabajos realizados por Waldor, mostraron la relación existente entre el lipopolisacárido (LPS) y el antígeno O de *V. cholerae* O1, como factores importantes para la colonización del intestino delgado y la resistencia al suero.

En 1996, Huq y Colwell, asocian los factores ambientales al surgimiento de brotes epidémicos, relacionando estos factores con la supervivencia y reproducción bacteriana, en especial de *V. cholerae*.

En 1997, Borroto, realiza una revisión bibliográfica sobre la ecología de *V. cholerae* donde describe que el patógeno encuentra condiciones favorables en ambientes con características de salinidad moderada, alto contenido de nutrientes, temperaturas cálidas, pH neutro o ligeramente alcalino y la presencia de macrofitas, fitoplancton,



zooplancton, peces, moluscos y crustáceos. Dichas condiciones ecológicas son típicas de estuarios y zonas costeras, donde *V. cholerae* O1 es considerado miembro autóctono de dichos ambientes.

En 1999, Yildiz y Schoolnik, muestran que la producción de un exopolisacarido en variantes rugosas de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor le confiere resistencia al cloro y capacidad para la formación de biopelículas, encontrando también que contienen secuencias homólogas con genes de bacterias de otras especies.

## 2. Panorama en México

En 1991, del mes de Junio se presentó el primer caso positivo de cólera O1 Biotipo El Tor, serotipo Inaba (de la séptima pandemia) en un paciente del sexo masculino de 68 años de edad, ubicado en la sierra de Goleta en el Estado de México.

En 1995, Ramírez-García *et al.*, realizaron un estudio ecológico de *Vibrio cholerae* en la laguna de Mecoacán (Tabasco), para determinar el nicho ecológico en ambientes salobres y su importancia epidemiológica, demostrando que *V. cholerae* O1 es una especie endémica que forma parte de la microbiota de la laguna que presenta un patrón estacional con incrementos en la época de lluvias y disminución en la época de secas. En este estudio se observó además una asociación con el plancton y con

niveles de salinidad de hasta 21 partes por mil, sin embargo, no se encontró una relación con las bacterias indicadoras de contaminación fecal.

En 1997, Ramírez-Pérez aisló *Vibrio* spp. de muestras de agua, ostión y sedimento de la laguna de Mecoacán, encontrando sólo la presencia de *V. cholerae* del serogrupo No-O1. También se determinaron otras especies de *Vibrio* como *V. alginolyticus* y *V. parahemolyticus*, éste último más abundante que los demás; en el mismo estudio se encontró, una relación significativa entre la temperatura y la presencia del microorganismo en la laguna.

En 1998, Isaac-Márquez *et al.*, realizaron un estudio en pozos de agua para consumo humano, en la localidad de Campeche, mostrando la presencia de *V. cholerae* No-O1, predominando principalmente los serogrupos O14, O155 y O112, además los aislamientos mostraron resistencia a la ampicilina y a la carbenicilina.

En el 2000 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reportó cinco casos de cólera en los Estados de Campeche y Tamaulipas, con el menor número de casos desde el resurgimiento de la epidemia.

En el 2001 la Dirección General de Epidemiología reportó un solo caso confirmado de cólera en el Estado de Jalisco.

En Octubre del 2003, Juárez-Figueroa y colaboradores realizaron un estudio de la calidad de aguas residuales de dos Plantas de Tratamiento y en los canales de Xochimilco, en la Ciudad de México. Ellos encontraron que el agua tratada que es descargada a los canales contiene cantidades bajas de coliformes fecales,

enterococos y quistes de *Cryptosporidium*, mientras que se encontraron en mayor cantidad Colifagos y quistes de *Giardia* spp., sugiriendo que el tratamiento del agua por parte de las plantas de tratamiento puede ser ineficaz para remover estos agentes.

En el 2005, Solís-Sánchez realizó un estudio en los canales de Xochimilco, detectando la presencia de *Vibrio cholerae* No-O1/No-O139, predominando principalmente los serogrupos O135 y O14, tales aislamientos mostraron resistencia principalmente a la ampicilina y se identificó también la presencia del gen *toxR* en dichas cepas.

## Justificación

La Planta de Tratamiento “Cerro de la Estrella” es la que se encarga de suministrar agua a los canales de Xochimilco, con la finalidad de mantener el nivel del agua del lago. Sin embargo, hay que recordar que Xochimilco cuenta con el sistema de chinampas en donde se cultivan diversos vegetales que se venden a los mercados de la ciudad, por lo que el riego de estas hortalizas con aguas tratadas podría ocasionar severos problemas de salud, sobre todo por enfermedades gastrointestinales como es el caso del cólera.

*Vibrio cholerae* es un microorganismo de gran importancia clínica y epidemiológica, es el agente etiológico del cólera, responsable de siete pandemias en los últimos dos siglos y actualmente es endémico en el sureste asiático, partes de África y Latinoamérica. Además este microorganismo puede desarrollar estrategias de supervivencia formando asociaciones comunitarias por medio de biopelículas que se establecen en torno a un sustrato, como lo son las raíces de lirio acuático, donde la bacteria se protege de factores adversos y asegura su persistencia en el ambiente.



## Objetivos

### Objetivo General

- Aislar, identificar y determinar los serogrupos de *Vibrio cholerae* en muestras de agua de la planta de tratamiento “Cerro de la Estrella” y en muestras de raíz de lirio de los canales de Xochimilco.

### Objetivos Particulares

1. Determinar la presencia de *Vibrio cholerae* en el influente, lodos activados, sedimentador, rebombeo y efluente (Nativitas) de la planta de tratamiento “Cerro de la Estrella”; así como en muestras de raíz de lirio del lago de Xochimilco.
2. Caracterizar los serogrupos de *Vibrio cholerae* aislados en la planta de tratamiento “Cerro de la Estrella”.
3. Caracterizar los serogrupos de *Vibrio cholerae* aislados de la raíz de lirio presentes en el lago de Xochimilco.
4. Evaluar la influencia del pH, la temperatura del agua y el oxígeno disuelto (OD), con la presencia de *Vibrio cholerae* en aguas residuales de la planta de tratamiento.



## Área de Estudio

### A) Planta de Tratamiento “Cerro de la Estrella”

La Planta de Tratamiento “Cerro de la Estrella” se ubica en la Avenida San Lorenzo s/n en la delegación Iztapalapa de la Ciudad de México, cuyas coordenadas geográficas son: longitud oeste: 99°, 04', 42.55”, latitud norte: 19°, 20', 13.88” y una Altitud de 2244 m.s.n.m. Comenzó a operar en 1968 produciendo inicialmente un caudal de 1,500 L/s mediante el tratamiento secundario de lodos activados el cual se basa en la descomposición de la materia orgánica por la acción de los microorganismos. Actualmente la planta de tratamiento tiene una capacidad instalada de 2,000 a 2,500 L/s y suministra el agua tratada a una cárcel de la Delegación, además de que una parte se envía al lago de Xochimilco con la finalidad de mantener el nivel de agua de dicho lago.





Figura 1. Planta de Tratamiento “Cerro de la Estrella

Para el presente estudio se realizaron 10 muestreos mensuales en la Planta de Tratamiento de aguas residuales “Cerro de la Estrella”, en el período comprendido de diciembre de 2003 a octubre de 2004, incluyendo las épocas de secas (Febrero-Abril, 2004) y la de lluvias (Mayo-Octubre, 2004). En este estudio se seleccionaron cinco puntos de muestreo en todo el tren # 9 de la planta de tratamiento, los cuales comprendieron el influente como el punto uno, el tanque de salida de lodos activados como el segundo, el tanque sedimentador secundario como el tercero, el rebombeo como el cuarto y la última estación que es el efluente que llega a Xochimilco.



Figura 2. Estación 1. Influyente de la Planta de Tratamiento “Cerro de la Estrella”



Figura 3. Estación 2. Tanque de Salida de Lodos Activados de la Planta.



Figura 4. Estación 3. Tanque Sedimentador Secundario



Figura 5. Estación 4. Rebombeo



Figura 6. Estación 5. Efluente de la Planta de Tratamiento que llega a Nativitas (Xochimilco).

## B) Xochimilco

Ubicado al sur de la ciudad de México, al pie de la sierra Chichinautzin a una altura promedio de 2,240msnm; Xochimilco o “lugar de las flores silvestres” mantiene una parte de sus condiciones acuáticas originales: lagos, canales, o las famosas “chinampas”, técnica prehispánica para generar un terreno “flotante” de gran fertilidad que no distorsionaba mayormente el equilibrio ecológico del lago original. Presa del crecimiento y densificación urbana, Xochimilco, alberga hoy día una población aproximada de 368,000 habitantes, situación que hace crisis en los años 80's al manifestarse toda una problemática ambiental encabezada por la contaminación del agua, problemas de niveles en los canales y chinampas, deforestación, abandono de la actividad agrícola, sin olvidar las consecuencias sociales y económicas que contribuyeron a exacerbar la degradación ambiental de este sitio.

Para este estudio se realizaron 7 muestreos mensuales, durante el período comprendido de abril a octubre del 2004. Se seleccionaron cuatro puntos de muestreo (Figs. 7-10).

Estaciones	Latitud Norte	Longitud Oeste
------------	---------------	----------------

1. San Pedro Tláhuac	19°15'57"	99°00'22"
2. Floricultores	19°15'30"	99°02'47"
3. Coltongo	19°15'32"	99°05'19"
4. Nativitas	19°14'50"	99°05'33"



Figura 7. Estación 1. San Pedro Tláhuac, Xochimilco.



Figura 8. Estación 2. Floricultores, Xochimilco.



Figura 9. Estación 3. Coltongo, Xochimilco



Figura 10. Estación 4. Nativitas, Xochimilco.

## Material y Métodos

### Parámetros Físico-Químicos

**Oxígeno Disuelto (OD) y Temperatura**, se determinó con un Oxímetro (Modelo: YSI, 51-B con electrodo, Ohio, USA), realizando mediciones *in situ* a 20cm de profundidad.

**pH**, este parámetro se determinó con un potenciómetro digital (CONDUCTRONIC, México) tomando mediciones a 20cm de profundidad.

### Aislamiento de *Vibrio cholerae*

A) Muestras de agua de la planta de tratamiento “Cerro de la Estrella”.

Para el aislamiento de las bacterias en muestras de agua de la planta de tratamiento "Cerro de la Estrella" se realizaron 10 muestreos, abarcando el mes de diciembre (2003) y los meses de enero a octubre (2004). Se utilizaron hisopos de Moore, los cuales fueron sumergidos a nivel superficial en el influente, tanque de salida de lodos activados, sedimentador secundario, rebombeo y efluente durante 24 hrs., posteriormente las muestras se transportaron a temperatura ambiente en bolsas de polietileno con 250 ml del medio de transporte AMIES, para su análisis en el laboratorio.

#### B) Muestras de raíz de lirio de los canales de Xochimilco.

Para el aislamiento de las bacterias en muestras de raíz de lirio del lago de Xochimilco, se realizaron 7 muestreos que comprendieron los meses de abril a octubre (2004). Se tomaron 20g de raíz en los 4 puntos de muestreo de los Canales de Xochimilco y se transportaron a temperatura ambiente en 250 ml de medio de transporte AMIES para su análisis. Una vez en el laboratorio se trituraron las raíces en licuadoras estériles durante 2 minutos.

Una vez en el laboratorio las muestras tanto de agua como de raíz se procesaron siguiendo la técnica descrita por Sánchez *et al.*, (1991) de la siguiente manera:

#### Enriquecimiento

Se tomaron 10ml de cada muestra (agua y raíz), pasándolos a 100 ml de agua peptonada alcalina de concentración doble, incubándose de 6-8hrs a 37°C. Pasado el período de incubación, se tomó por asada un inóculo –de la biopelícula blanca formada en la superficie del medio- y se sembró por estría cruzada en dos placas de



TCBS (tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa) por cada muestra. También se inocularon 10 ml del mismo matraz (doble concentración) a otro con 100 ml de agua peptonada alcalina de concentración sencilla (este pase a la concentración sencilla se realiza para dar tiempo a los Vibrios de lento crecimiento a que se adapten y se les pueda aislar mejor cuando se siembran en las placas de agar TCBS), incubándose a 37°C durante 12-18hrs, pasado ese tiempo, se sembraron por estría cruzada dos placas de agar TCBS por cada una de las muestras, incubándose a 37°C durante 24 horas.

### Bioquímicas

De cada una de las placas que se sembraron por muestra, y en las que se presentó la morfología colonial típica de *Vibrio cholerae* (redondas, convexas, de color amarillo brillante, pegajosas y de 2 a 4 mm de diámetro), se tomaron cinco colonias y se les realizó las siguientes pruebas bioquímicas:

- a) **TSI** (Triple-Azúcar-Hierro) En un tubo en posición inclinada que se inocula por picadura y estría sobre la superficie.
- b) **LIA** (Lisina y Hierro) En un tubo en posición inclinada que se inocula por doble picadura y estría.
- c) **MIO** (Movilidad-Indol-Ornitina) tubo en posición vertical al que se transfiere el inóculo por picadura.

Las pruebas bioquímicas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Aquellas pruebas que resultaron positivas presentaron el perfil bioquímico de *Vibrio cholerae* que es el siguiente:

TSI	*A/A o K/A*
OXIDASA	+
LIA	Descarboxilasa +
ARGININA	Hidrolasa -
MIO	Movilidad +

A/A= Reacción ácida, ácida; K/A= reacción alcalina, ácida

Las cepas con el perfil de *V. cholerae* se sembraron en placas de Agar de Manutención de donde se toma una asada para aplicarles la prueba bioquímica complementaria de la Oxidasa y que es positiva para *Vibrio*.

#### Pureza

Las cepas identificadas como *Vibrio cholerae* se sembraron en placas de Agar McConkey y Agar Sangre para verificar su pureza y capacidad hemolítica. Las cepas típicas se pasaron a tubos de gelosa especial pH 8.6 para su conservación.

#### Identificación Automatizada VITEK

Para la identificación definitiva de la bacteria se utilizó el sistema automatizado Vitek, con tarjetas de identificación GNI+, la cual está diseñada para la identificación de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias Gram negativas no fermentadoras de glucosa y miembros de la familia *Vibrionaceae*. El sistema se

compone de una tarjeta con 30 pocillos, de los cuales 28 contienen caldos bioquímicos, un caldo para control negativo y otro para control positivo de crecimiento.

La prueba se realizó hidratando de manera automática cada uno de los pocillos de la tarjeta GNI<sup>+</sup> con 100 µL de una suspensión de bacterias identificadas bioquímicamente como *Vibrio cholerae*, equivalente a 1x10<sup>6</sup> UFC/mL en un lector automático de la escala de Mc Farland, las tarjetas se incuban a 37°C en el lector/incubador.

#### Susceptibilidad a Antimicrobianos

Para esta prueba se utilizó el mismo sistema automatizado Vitek con tarjetas para sensibilidad de Gram<sup>-</sup>, GNS-604 Vitek. El sistema consta de 40 pozos con una serie de agentes antimicrobianos liofilizados, que son suspendidos en medio de crecimiento. La concentración de los antibióticos está diseñada para identificar niveles bajos y altos de resistencia, ya que cada antibiótico se prueba con dos concentraciones expresadas en µg/mL.

#### Tipificación Serológica

Para la obtención del antígeno somático "O" se sembró cada cultivo en TSA (agar soya-tripticaseína) en tubo inclinado, posteriormente se incubó a 37°C por 24 hrs. Después de ese período se le agregó a cada tubo 10 ml de solución salina al 0.85% para desprender la biomasa, esta suspensión bacteriana se puso a vapor efluente (110°C) por una hora. Posteriormente se les agregó formalina en solución salina (ver anexo) para su conservación. La tipificación se realizó retando cada antígeno de cada

uno de los aislamientos de *Vibrio cholerae* contra los 155 sueros específicos (SERUMAN), obtenidos de conejos Nueva Zelanda blanco.

## Resultados

### Parámetros *in situ*

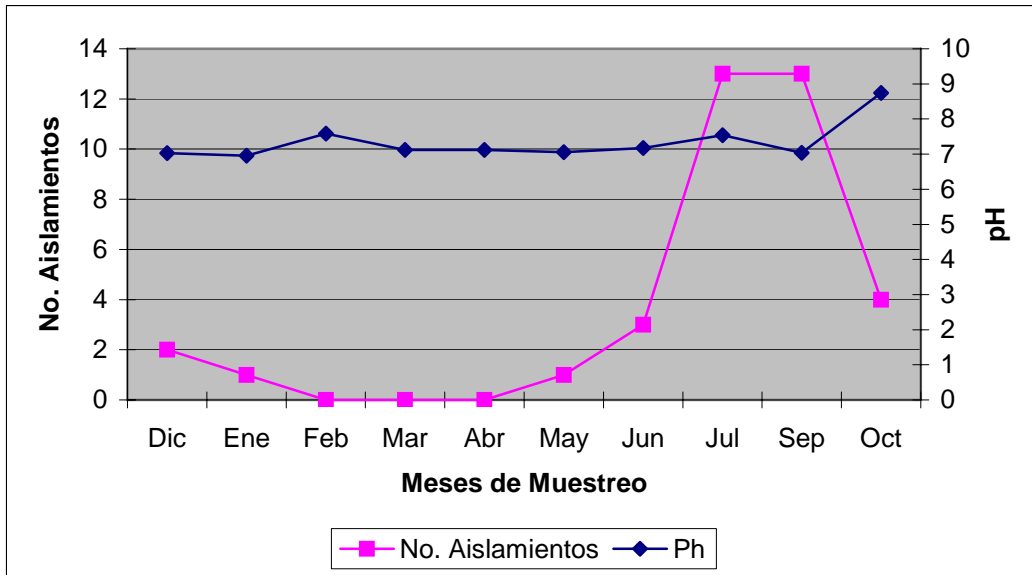
Al determinar los valores del Oxígeno Disuelto (OD), se encontró que el promedio anual en las diferentes etapas de tratamiento se incrementó desde 0.8 en el influente hasta 3.5 mg/L<sup>-1</sup> en el efluente (Cuadro 1). El análisis de los valores por mes señala que el promedio anual fue de 2.2 mg/L<sup>-1</sup> observándose los valores más bajos en julio (1.3 mg/L<sup>-1</sup>) y el más alto en octubre (3.4 mg/L<sup>-1</sup>). La última etapa del tratamiento llega a Nativitas como un influente a Xochimilco y mostró los valores más altos en marzo, abril,

septiembre y octubre. Con relación al pH se encontró que en los meses de diciembre (2003) a septiembre (2004) las lecturas mostraron valores de neutralidad (7.0) y sólo en octubre (2004) se determinó un pH alcalino (9.0) en todas las estaciones (Gráfica 1). La evaluación de la temperatura del agua mostró un promedio entre los 19 y 20°C (Gráfica 2), durante los 10 meses de estudio (diciembre 2003-octubre 2004).

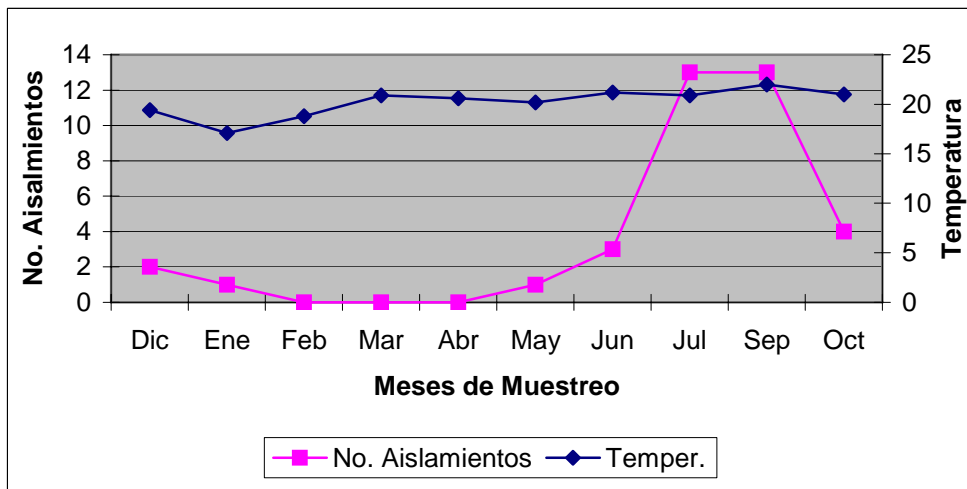
Cuadro 1. Promedios de los valores del Oxígeno Disuelto ( $\text{mg/L}^{-1}$ ) obtenidos en las diferentes etapas del tratamiento del agua residual en la "Planta Cerro de la Estrella"

Oxígeno disuelto	Influente	Lodos	Secundario	Rebombeo	Nativitas	Promedio mensual
Diciembre	1.2	0.9	1.2	2.8	3	1.8
Enero	0.2	2.0	1.2	1.8	2.8	1.6
Febrero	0.3	1.2	1.4	2.0	2.8	1.5
Marzo	1.2	1.2	2.0	2.6	5.2	2.4
Abril	1.0	1.2	1.4	4.0	4.6	2.4
Mayo	1.0	2.0	2.0	3.2	3.4	2.3
Junio	1.0	2.2	1.8	2.0	2.8	2.0
Julio	0.6	0.6	1.0	2.0	2.4	1.3
Septiembre	1.0	3.2	4.0	3.2	4.0	3.1
Octubre	0.8	4.2	4.0	3.4	4.4	3.4
<b>Promedio anual</b>	<b>0.8</b>	<b>1.9</b>	<b>2.0</b>	<b>2.7</b>	<b>3.5</b>	<b>2.2</b>

Gráfica 1. Comparación entre el número de aislamientos y el pH.



Gráfica 2. Comparación entre el número de aislamientos y la temperatura del agua.



## Aislamientos

Se analizaron 50 muestras de agua de las diferentes etapas de la planta de tratamiento (influyente, lodos, secundario, rebombeo y efluente) durante 10 meses de muestreo (dic. 2003 – oct. 2004) y 28 muestras de raíz de lirio, colectadas de abril a octubre del 2004 en los canales de Xochimilco. De cada muestra se trabajaron 20 aislamientos (provenientes de dos placas de agar TCBS del agua alcalina de concentración doble así como las dos placas de TCBS del agua alcalina de concentración sencilla), haciendo un total de 1,560 aislamientos tanto de agua como de raíz, estos aislados se transfirieron a pruebas bioquímicas para descartar aquellos que no presentaron el perfil bioquímico para *Vibrio cholerae* y de los cuales solo 116 fueron presuntos Vibrios, 68 que correspondieron a agua y 48 a raíz. Los aislados con el perfil bioquímico característico y oxidasa positiva se identificaron finalmente mediante el sistema automatizado Vitek. De los 68 aislados de agua, 34 fueron identificados como *Vibrio cholerae* y 34 como *Vibrio alginolyticus* y de los 48 aislados de raíz, 40 fueron identificados como *Vibrio cholerae*, 2 *Vibrios fluvialis*, 2 *Aeromonas veronii* y 4 no identificados (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especies bacterianas identificadas en muestras de agua y raíz de lirio

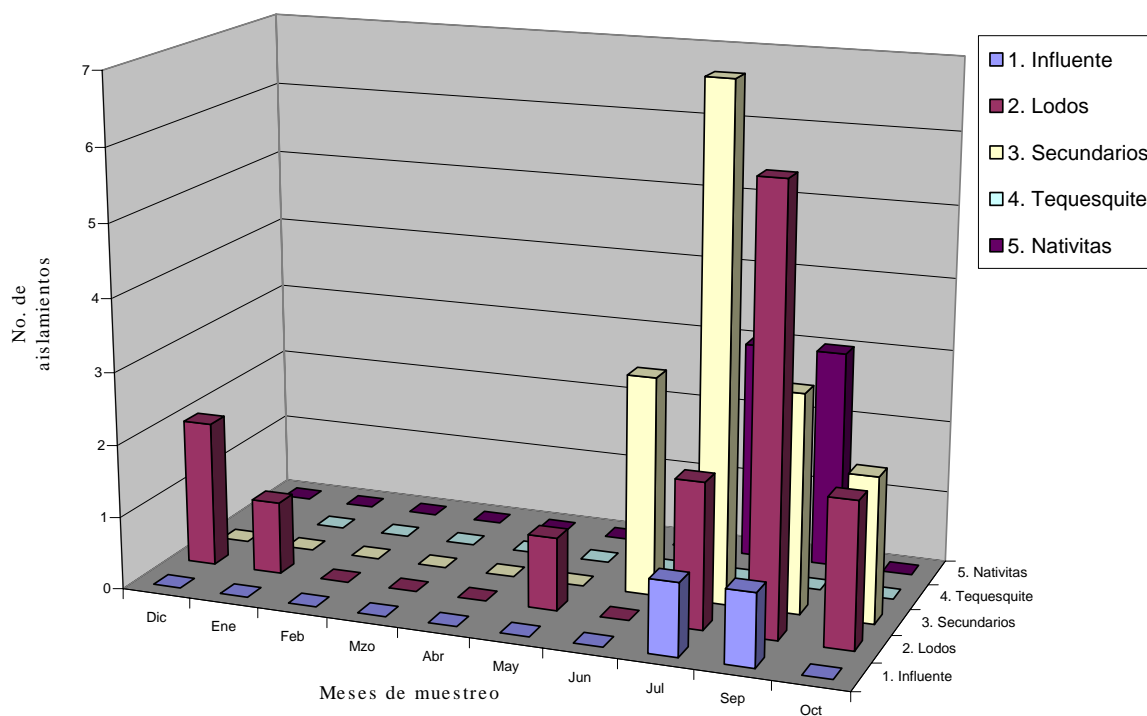
Sustrato Especies	Agua		Raíz	
	No. Aislamientos	%	No. Aislamientos	%
<i>Vibrio cholerae</i>	34/68	50	40/48	83.33
<i>Vibrio alginolyticus</i>	34/68	50	0	0

<i>Vibrio fluvialis</i>	0	0	2/48	4.17
<i>Aeromonas veronii</i>	0	0	2/48	4.17
No identificadas	0	0	4/48	8.33
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>100</b>	<b>48</b>	<b>100</b>

El análisis por período y sitio de muestreo en la planta de tratamiento mostró en los meses de julio y septiembre del 2004 y en las estaciones 2 (lodos activados), 3 (tanque sedimentador) y 5 (nativitas) el mayor número de aislamientos por *Vibrio cholerae* (Gráfica 3).



*Vibrio cholerae* en agua



Gráfica 3. Relación entre los meses de muestreo, sitios de muestreo y número de aislamientos de *Vibrio cholerae* aislado del agua de la Planta de Tratamiento.

Caracterización de las colonias de *Vibrio cholerae*

Se realizó la caracterización de las diferentes propiedades de las cepas aisladas tanto de las muestras de agua como de raíz de lirio. Al respecto se analizó la capacidad para producir hemolisinas, en esta prueba se observó que todas las cepas de agua presentaron hemólisis parcial de eritrocitos de carnero. El mismo ensayo con las cepas obtenidas de raíz de lirio mostró que el 82.5% de los aislamientos induce hemólisis parcial (Figura 11) y el 17.5% hemólisis completa (Figura 12).

También en el mismo medio de agar base sangre se identificó el tipo de morfología colonial que presentaban los aislados tanto de agua como de raíz de lirio. La mayoría de las cepas aisladas de agua (82.35%) mostraron colonias con morfología lisa (Figura 13), aunque se identificaron también aislados (17.65%) con un morfotipo arrugado (Figura 14), éste se presentó hasta los 7 días posteriores al inicio de la incubación (temperatura ambiente). En las cepas aisladas de raíz de lirio se observó un pequeño incremento (22.5%) de cepas con el fenotipo rugoso y un 77.5 % de morfotipos lisos, bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura de incubación.

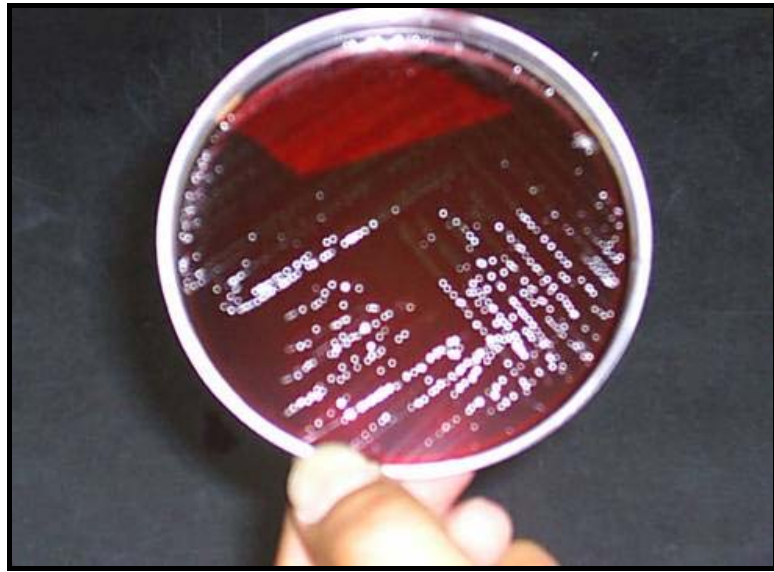


Figura 11. Hemólisis Parcial en cepas de *Vibrio cholerae*.



Figura 12. Hemólisis Completa en cepas de *Vibrio cholerae*.

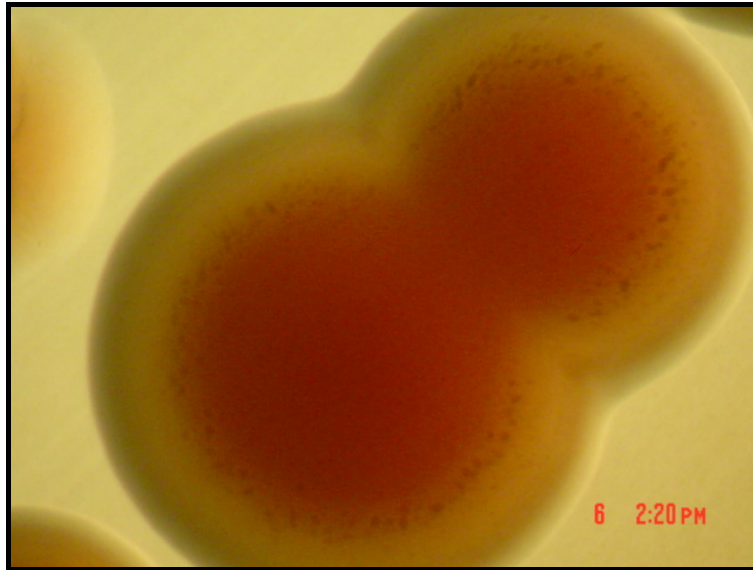


Figura 13. Morfotipo liso en cepas de *Vibrio cholerae* en cultivos de agar sangre e incubados por siete días a temperatura ambiente.

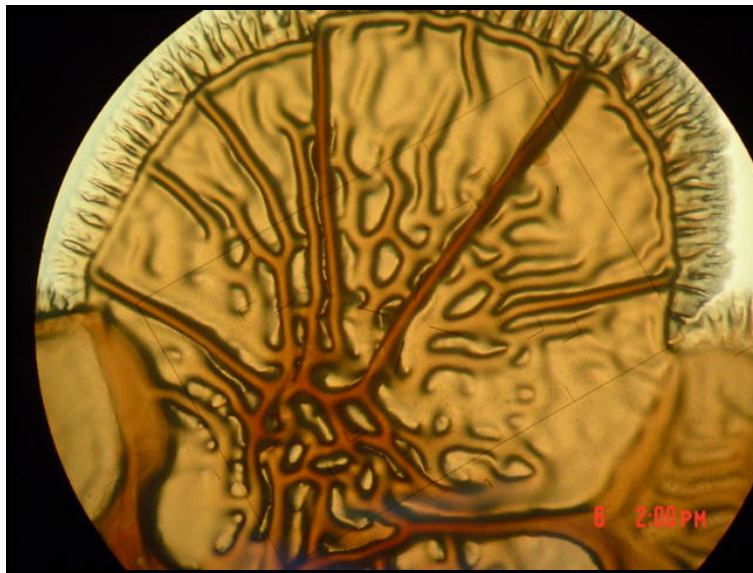


Figura 14. Morfotipo rugoso en cepas de *Vibrio cholerae* en cultivos de agar sangre e incubados por siete días a temperatura ambiente.

### Tipificación serológica de las cepas de *Vibrio cholerae*

La caracterización antigénica de las cepas identificadas como *Vibrio cholerae* se realizó utilizando 155 sueros de conejo. En esta fase del estudio, se tipificaron de 66 de las 74 cepas de *V. cholerae* identificadas por pruebas bioquímicas. Los resultados mostraron que en ambos sustratos la mayoría de los aislamientos (32%) no se pudieron identificar con los sueros utilizados, por lo que se definieron como O no determinados (OND). En frecuencia siguieron los serogrupos O34, O52 y O74 con 24%, 18% y 12% respectivamente (Cuadro 3). El análisis individual mostró una frecuencia similar de OND y O34 en agua y raíz de lirio; en agua O6 y O39 entre los más frecuentes y O52 y O74 en raíz de lirio (Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencia de serogrupos de *V. cholerae* identificados en las cepas aisladas de muestras de agua y raíz de lirio.

Serogrupo	Agua		Raíz	
	No. Aislamientos	%	No. Aislamientos	%
O ND	11	33.3	10	30.3
O2	1	3.0	0	0
<b>O6</b>	3	<b>9.0</b>	0	0
O16	2	6.0	0	0
O19	0	0	1	3.0
O20	1	3.0	0	0
<b>O34</b>	4	<b>12.1</b>	4	<b>12.1</b>
<b>O39</b>	3	<b>9.0</b>	1	3.0
O41	0	0	1	3.0
O51	1	3.0	0	0

<b>052</b>	0	0	6	<b>18.2</b>
O67	0	0	3	9.0
<b>074</b>	0	0	4	<b>12.1</b>
O83	1	3.0	0	0
O107	1	3.0	0	0
O108	1	3.0	0	0
O109	0	0	1	3.0
O126	2	6.0	0	0
O128	0	0	1	3.0
O135	0	0	1	3.0
O152	1	3.0	0	0
O154	1	3.0	0	0
Total	33	100	33	100

### Sensibilidad a Antimicrobianos

La prueba de sensibilidad a los antimicrobianos se aplicó a 74 cepas, en estas se observó que el 26% fueron susceptibles a por lo menos un antimicrobiano (Cuadro 4). En el 24% (8/34) de las cepas aisladas de agua se observó resistencia a más de un antimicrobiano, encontrándose a Amoxicilina y Trimetoprima-Sulfametoxazol como la combinación más frecuente (Cuadro 4). En las cepas de raíz de lirio se encontró que el 82.5% de los aislamientos resultaron resistentes a la Amoxicilina, en estas cepas no se observó resistencia a otros antimicrobianos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *V. cholerae* aisladas de muestras de agua y raíz.

Sensibilidad Antimicrobiana CMI mcg/ml	Agua		Raíz	
	No.	%	No.	%
R-Amoxicilina $\geq$ 32	8	23.53	29	72.50
R-Amoxicilina $\geq$ 32 / Trimeth-sulfa $\geq$ 320	4	11.76	0	0
R-Amoxicilina $\geq$ 32 / Trimeth-sulfa $\geq$ 320 / Ofloxacin $\geq$ 8	1	2.94	0	0

R-Amoxicilina >= 32 / Trimeth-sulfa >= 320 / Ciprofloxacín >= 4	1	2.94	0	0
R-Amoxicilina >= 32 / Cefazolin >= 32	1	2.94	0	0
R-Amoxicilina >= 32 / Ticarcilín >= 256	1	2.94	0	0
I-Amoxicilina 16	6	17.65	4	10.00
Susceptibles	12	35.29	7	17.50
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>100</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

## Discusión

En la persistencia e incremento de enfermedades infecciosas como es el caso del cólera, contribuyen diversos factores de los cuales muchos aún no se han identificado (Huq y Colwell, 1996). Con respecto a la supervivencia de *Vibrio cholerae*, se ha identificado que algunos de esos factores son el pH, la temperatura, la cantidad y disponibilidad de nutrientes y la salinidad entre otros, los cuales, sin embargo, no son los únicos ya que indudablemente son muchos otros los que contribuyen y aún no se han identificado.

Para conocer las características del agua de la planta de tratamiento y su posible impacto en la frecuencia de aislamiento de *Vibrio cholerae*, se analizaron diferentes parámetros que se determinaron *in situ*. Al respecto el oxígeno disuelto (OD) mostró

variaciones en las diferentes etapas del tratamiento, se encontró que el promedio anual de las diferentes etapas se incrementaba desde 0.8 mg/L<sup>-1</sup> en el influente hasta 3.5 mg/L<sup>-1</sup> en el efluente (Cuadro 1), lo anterior muestra que el proceso se está llevando de manera adecuada ya que el oxígeno se incrementa en el agua al ir pasando por las diferentes etapas del tratamiento.

Al realizar el análisis de los valores por mes se encontró que el promedio anual era de 2.2 mg/L<sup>-1</sup>, con los valores más bajos en julio (1.3 mg/L<sup>-1</sup>) y el más alto en octubre (3.4 mg/L<sup>-1</sup>) La última etapa del tratamiento que es la que descarga en Nativitas, hacia los canales de Xochimilco, mostró los valores más altos en los meses de marzo, abril, septiembre y octubre (2004). En los demás meses del estudio, diciembre (2003), enero, febrero, mayo, junio y julio los valores registrados fueron de 2.4 a 3.4 mg/L<sup>-1</sup>. Estos registros en la medición del OD no mostraron ninguna relación con el número de aislamientos de Vibrios.

En los ambientes naturales la temperatura del agua está determinada por los cambios climáticos, la magnitud de la masa de agua y la circulación de la misma (Ramírez-García *et al.*, 1995). Se ha establecido que la temperatura óptima para el crecimiento de *V. cholerae* 01 oscila entre 30° y 37°C y que las temperaturas menores a 15°C lo inhiben (Borroto, 1998). Las características del área de estudio son propicias para que la temperatura se mantenga estable, los datos obtenidos en el estudio mostraron que en todas las estaciones ésta se mantuvo entre los 19 y 20°C (Gráfica 2), situación favorable para el desarrollo de diferentes microorganismos incluido *V. cholerae* (Walter, 1999). Existen reportes que señalan que valores de pH de 7 a 8.5 es el óptimo para el desarrollo de la bacteria en el agua a 25°C cuando la salinidad es moderada



(Miller *et al.*, 1984) y de 7.5 a 9 en presencia de baja salinidad (Borroto, 1997). En este estudio los resultados al respecto mostraron valores de pH de 7.01 con un incremento de hasta 9.0 en el mes de octubre del 2004. Estos datos en conjunto con los de temperatura sugieren condiciones propicias para la supervivencia de diferentes microorganismos incluido *V. cholerae*. Aún cuando se registró un pH alcalino en el mes de octubre, lo cual favorecería el crecimiento de la bacteria, en este estudio no se obtuvo un mayor número de aislamientos. Sin embargo, se obtuvieron buenos aislamientos con pH neutro (7.0) como lo reporta Millar *et al.*, 1984 y Borroto, 1997. Por otra parte al realizar el análisis de los 10 meses de estudio entre estos datos y la frecuencia de aislamiento de *V. cholerae* (Gráfica 1 y 2), se observa la misma frecuencia, tal situación probablemente se relaciona con la estabilidad observada en los parámetros ambientales.

Para el aislamiento de bacterias se seleccionaron dos sustratos, agua para evaluar la forma planctónica de los microorganismos y la raíz de lirio para conocer la relevancia de éstas en la formación de biopelículas ó consorcios bacterianos. El estudio se orientó específicamente al aislamiento de integrantes de la familia *Vibrionaceae*. *Vibrio cholerae* fue el género y la especie que se identificó con mayor frecuencia principalmente de las muestras de raíz de lirio (Cuadro 2). Lo anterior pudiera estar relacionado con la capacidad que tienen estos microorganismos para constituir asociaciones comunitarias por medio de biopelículas. Las cuales están constituidas básicamente por polisacáridos que protegen a los microorganismos de situaciones poco favorables, asegurando además un suministro constante de nutrientes para la comunidad bacteriana, ya sea por la presencia de corrientes de agua que lleven los nutrientes necesarios a toda la biopelícula, o por el intercambio y utilización de

productos de desecho entre los miembros de la misma biopelícula (Kolter y Losick, 1998).

Otra de las especies identificadas en agua además de *V. cholerae* fue *Vibrio alginolyticus* (Cuadro 2), esta bacteria es de distribución cosmopolita, también de importancia clínica ya que es responsable de cuadros de conjuntivitis y de infección en heridas expuestas (Herrera y Esteve, 2001). Otras dos especies de la familia *Vibrionaceae*, pero identificadas en las muestras de raíz de lirio fueron *Vibrio fluvialis* y *Aeromonas veronii*, la primera tiene importancia clínica para humanos ya que se ha relacionado con cuadros de gastroenteritis asociada al consumo de alimentos marinos y las *Aeromonas* están asociadas con infecciones humanas debido al contacto con agua no tratada. (Murray et al., 1997).

Con relación a la importancia del período y sitios de muestreo se observó que en los meses de julio y septiembre del 2004, en las estaciones 2 (lodos activados), 3 (tanque sedimentador) y 5 (Nativitas) hubo un mayor número de aislamientos (Gráfica 3). En cuanto al periodo, un factor que probablemente contribuyó al incremento fue la presencia de la época de lluvias, estas arrastran desechos de todos tipos incluida la materia fecal. Lo anterior se puede corroborar por el hecho de que los sitios con mayor incremento de aislados corresponden a las etapas de concentración de la planta y Nativitas, que es el sitio en donde se descarga el agua para mantener los niveles del canal.

Los resultados de tipificación por serología mostraron la presencia de *V. cholerae* No O1/No O139, esto es coincidente con otros estudios realizados en la laguna costera de

Mecoacán, Tabasco (Ramírez-García *et al.*, 1995) y en tres localidades de Campeche (Isaac-Márquez *et al.*, 1998), que mostraron únicamente serogrupos No O1/No O139. Tal situación era esperada ya que es conocido que en los periodos no epidémicos, la presencia de *Vibrio cholerae* O1/O139 es negativa (SUIVE, 1998-2004). En México fue en el año 2000 y 2001 (cinco casos en el primero y uno solo en el segundo) cuando se reportaron los últimos casos de cólera, por lo que se puede considerar que estamos en la etapa en la que no se logran identificar estos serogrupos de muestras ambientales (Fuente: CNVE/DGE/SSA, citado por el Manual de Programa de Acción: cólera. Secretaria de Salud.). Aunque no se conoce de manera contundente qué influye para que en áreas no endémicas los serogrupos de *Vibrio cholerae* O1/O139 “desaparezcan”, se ha planteado que el cambio climático global (Colwell *et al.*, 2002), participa modificando las condiciones del ambiente (cambio de pH, temperatura, sustratos bióticos etc.). En México no existen estudios al respecto, sin embargo, el hecho de que otros serogrupos de la bacteria se mantengan sugiere que *Vibrio cholerae* O1/O139 se mimetiza expresando otro antígeno somático (Dumontier, 1998), o que pase al estado viable no cultivable (Colwell, 1994).

El esquema de tipificación por serología cuenta en la actualidad con más de 200 serogrupos, en el laboratorio sólo se cuenta con 155 sueros diferentes, esta podría ser una de las explicaciones por la que en los aislamientos de ambos sustratos (raíz y agua) no se logró determinar el serogrupo O ND. Sin embargo, también es factible que en nuestro país existan serogrupos autóctonos aún no reportados, lo anterior plantea la necesidad de trabajar más al respecto. Los serogrupos más comunes en muestras de agua fueron O6, O34 y O39 seguidos de O16 y O126. Es importante mencionar que en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo en Xochimilco (Solís-Sánchez,

2005), y otro realizado por Isaac-Márquez (1998) en pozos de agua para consumo humano en Campeche, los serogrupos O39 y O126 también fueron aislados. Aunque es necesario realizar más estudios al respecto, tal hecho plantea la posibilidad de que estos serogrupos son residentes habituales en nuestro país.

Con respecto a los serogrupos determinados en raíz de lirio el más común fue O52, seguidos por O34 y O74. De estos, O52 y O74 también fueron identificados en el trabajo de Solís-Sánchez (2005), este resultado propone que ambos serogrupos son habitantes permanentes en los canales de Xochimilco.

La resistencia de las bacterias a los antimicrobianos se ha convertido en un problema común y cada vez se observa un mayor incremento en muchas partes del mundo.

*Vibrio cholerae* no es la excepción y se ha considerado que la susceptibilidad de las cepas a los agentes antimicrobianos, debe ser determinada al principio de una epidemia y monitoreada periódicamente para administrar los antibióticos adecuados (Ajello *et al.*, 2003). Los resultados al respecto obtenidos en el estudio, mostraron que los aislados de agua presentaron resistencia a Amoxicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol, mientras que todos los aislados de raíz de lirio fueron resistentes a la Amoxicilina. Esta observación representa una alerta ante el uso indiscriminado de dichos antibióticos, principalmente porque al parecer se está dando una selección de cepas ambientales resistentes a los antimicrobianos prescritos tanto en la atención primaria como en los hospitales. Con base en los resultados obtenidos se hace necesario realizar una caracterización molecular de las cepas, para determinar en las mismas la presencia de integrones (cassettes de DNA con genes de resistencia) que pueden estar contribuyendo a la diseminación de genes involucrados con la resistencia a los antibióticos (Hall y Collis, 1995).

Las cepas de *Vibrio cholerae* O1 producen diversas exotoxinas con actividad enterotóxica, proteolítica, hemolítica y citolítica, mismos que se consideran como factores de virulencia (Kaper *et al.*, 1995; Guhathakurtaa *et al.*, 1999). La hemolisina es una enterotoxina de 65 kD con capacidad citolítica en eritrocitos y cultivos celulares, tradicionalmente es usada para distinguir entre los biotipos El Tor y El Clásico, ya que este último no producía la toxina (Kaper *et al.*, 1995). En este estudio, se identificó en las cepas de *Vibrio cholerae* No O1 aisladas, la capacidad para elaborar hemolisinas (Figuras 11 y 12). Previamente fue reportado por Eslava y cols. (Trabajo premio Glaxo, 2005), que cepas de *Vibrio cholerae* No O1/No O139, aisladas de los canales de Xochimilco (Solís-Sánchez, 2005) presentaban el gene *hlyU* relacionado con la expresión de hemolisinas. El que las cepas de *Vibrio cholerae* No O1/No O139 aisladas en ambos estudios tengan la capacidad para elaborar hemolisinas, indica que se trata de microorganismos con factores de virulencia con un gran potencial patogénico para la comunidad expuesta al contacto con el agua de los canales de Xochimilco.

*Vibrio cholerae* puede cambiar su fenotipo de liso a “rugoso” como resultado de la abundante producción de un exopolisacárido (EPS), el cual proporciona a las cepas persistencia y supervivencia en el ambiente (Alí *et al.*, 2002; Rashid *et al.*, 2003). En algunas de las cepas de *Vibrio cholerae* aisladas tanto de muestras de agua como en las de raíz de lirio se pudo observar este fenómeno. En los aislados de raíz de lirio se observó un pequeño incremento (22.5%) de las variantes rugosas, lo cual sugiere que estas bacterias lo utilizan como protección a los cambios adversos en el ambiente. Este tipo de fenotipo rugoso, ha sido observado tanto en cepas O1/O139 como en

cepas No O1/No O139 en aislamientos clínicos y ambientales, siendo más común en las cepas clínicas (Alí *et al.*, 2002; Rashid *et al.*, 2003). Este morfotipo también se relaciona con la resistencia al cloro libre (Morris *et al.*, 1996; Yildiz y Schoolnik, 1999) y la formación de biopelículas, las cuales son sintetizadas por la presencia de los genes *vps*. Además de que estas biopelículas están asociadas con la supervivencia de las bacterias en ambientes adversos, también son importantes para la bacteria como un factor para resistir la acción de los antibióticos (Kierek K. y Watnick P., 2003). El morfotipo arrugado que mostraron las cepas analizadas en este estudio, podría ser una de las posibilidades para explicar la persistencia de este organismo en el ambiente, su capacidad para resistir a los antimicrobianos y al tratamiento con cloro para la desinfección del agua.

Consideramos importante realizar estudios futuros sobre la importancia epidemiológica de *Vibrio cholerae* No O1/No O139, ya que como se observó en el estudio presentan propiedades de virulencia que los hacen potencialmente patógenos. Por otro lado es necesario mantener una vigilancia para detectar la posible emergencia de *Vibrio cholerae* O1, ya que aún cuando hace más de cinco años no se reportan casos de cólera, es factible que esté mimetizado y pueda hacerse aparente de nueva cuenta, debido a su presencia en estos ambientes y no podemos asegurar que se ha erradicado.

## Conclusiones

- Se determinó la presencia de *Vibrio cholerae* No O1/No O139 en el influente, tanque de salida de lodos activados, tanque sedimentador secundario y el efluente que llega a Xochimilco.
- No se determinó la presencia de *Vibrio cholerae* en el rebombeo.
- Los serogrupos O34, O6 y O39 pueden considerarse los más comunes en las muestras de agua de la Planta de Tratamiento “Cerro de la Estrella.”
- Los serogrupos O52, O34 y O74 fueron los más comunes en muestras de raíz de lirio de los canales de Xochimilco.
- No hubo relación con el número de aislamientos de *Vibrio cholerae* y los parámetros determinados *in situ* en la Planta de Tratamiento “Cerro de la Estrella”.
- Las cepas aisladas de muestras de agua de la planta de Tratamiento presentaron solo hemólisis tipo parcial, mientras que en los aislamientos de raíz de lirio, se presentó hemólisis parcial y completa.
- La presencia de fenotipos rugosos en cepas aisladas tanto de agua de la Planta de Tratamiento, como de raíz de lirio en los canales de Xochimilco, sugiere que *Vibrio cholerae* presenta mecanismos de resistencia a los antibióticos, a la desinfección y a la persistencia de estos microorganismos en los ambientes.
- Las cepas de *Vibrio cholerae* aisladas de muestras de agua de la Planta de Tratamiento mostró que el 64.65% de las cepas fueron resistentes a más de un

antimicrobiano, encontrándose la Amoxicilina y Trimetoprima-Sulfametoxazol como la combinación más frecuente.

- Las cepas de *Vibrio cholerae* en muestras aisladas de raíz de lirio de los canales de Xochimilco, mostró que el 100% fue resistente a la Amoxicilina. Esta observación representa una alerta ante el uso indiscriminado de dichos antibióticos, porque al parecer se está dando una selección de cepas ambientales resistentes a antimicrobianos prescritas tanto en la atención primaria como en los hospitales.
- Con base en estos puntos podemos concluir que la Planta de Tratamiento “Cerro de la Estrella” es posiblemente una de las fuentes de contaminación por este microorganismo hacia los canales de Xochimilco, aunque en el rebombeo después de la cloración no se pudieron aislar estos microorganismos. Sin embargo, en el trayecto del rebombeo hacia Nativitas, que es el efluente que llega a Xochimilco se aíslan nuevamente estas bacterias, esto posiblemente a que existen infiltraciones que estén contaminado el agua con este microorganismo, haciendo que este cuerpo de agua sea un posible reservorio de cepas patógenas y un posible vehículo de transmisión de *Vibrio cholerae* No O1/No O139.



---

---

## Anexo

### Medio de Transporte AMIES

Componentes:

Cloruro de Sodio	3.0g
Cloruro de Potasio	0.2g
Cloruro de Calcio	0.1g
Cloruro de Magnesio	0.1g
Fosfato de Monopotasio	0.2g
Fosfato Disódico	1.15g
Tioglicolato de Sodio	1.0g
Agar	4.0g
Agua Destilada	1000ml

Preparación:

Suspender 10g del medio deshidratado en 100ml de agua destilada y calentar hasta disolver completamente. Esterilizar a 121°C por 15 minutos, dejar enfriar y en condiciones de esterilidad distribuir volúmenes de 400ml en bolsas de polietileno de 20L.

### Agua Peptonada Alcalina (APA)

- Concentración Doble

Bactopeptona	20g
Cloruro de Sodio	20g
Agua destilada	1000ml
pH final $8.8 \pm 0.2$ a $25^{\circ}\text{C}$	

- Concentración Sencilla

Bactopeptona	10g
Cloruro de Sodio	10g
Agua destilada	1000ml
pH final $8.8 \pm 0.2$ a $25^{\circ}\text{C}$	

**Preparación:**

Las sales se disuelven en el agua destilada, dejando reposar 15 minutos, se ajusta el pH con Hidróxido de Sodio 1N (NaOH 1N) y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos, se deja enfriar y se conserva en refrigeración hasta su uso.

**Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa)****Componentes:**

Extracto de levadura	5.0g
Peptona proteasa	10.0g
Citrato de sodio	10.0g
Tiosulfato de sodio	10.0g
Bacto oxgall	8.0g
Sacarosa	20.0g
Cloruro de sodio	10.0g
Citrato ferrico	1.0g
Azul de bromotimol	0.04g

---

---

Azul de timol	0.04g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000ml

**Preparación:**

Resuspender 98.0g del medio deshidratado en 1000ml de agua destilada y dejar hidratar durante 15 minutos. Calentar con agitación constante hasta su completa disolución, sin dejar que alcance la ebullición. Distribuir sin esterilizar en cajas petri estériles; es conveniente preparar este medio el mismo día en que se empleará y remover la tapa durante el enfriado para evitar la acumulación de agua.

**Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI)****Componentes:**

---

Extracto de carne	3.0g
Extracto de levadura	3.0g
Bactopeptona	15.0g
Peptona proteasa	5.0g
Lactosa	10.0g
Dextrosa	1.0g
Sacarosa	10.0g
Sulfato ferroso	0.2g
Cloruro de sodio	5.0g
Tiosulfato de sodio	0.3g
Rojo de fenol	0.024g
Agar	12.0g
Agua destilada	1000ml

Preparación:

Resuspender 65g del medio en un litro de agua destilada, obteniendo un pH final de 7.4, mezclar bien y calentar a ebullición durante un minuto.

Distribuir en tubos y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Dejar solidificar en posición inclinada de tal forma que quede una columna de 3 cm y una superficie de aprox. 5 cm.

**Agar LIA (Agar de Lisina Hierro)**

## Componentes:

Extracto de levadura	3.0g
Bactopeptona	5.0g
Dextrosa	1.0g
Hidrocloreuro L-lisina	10.0g
Sulfato ferroso	0.2g
Citrato de amonio férrico	0.5g
Tiosulfato de sodio	0.04g
Púrpura de bromocresol	0.02g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000ml

## Preparación:

Disolver 34.5g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, obteniendo un pH final de 6.7, se calienta hasta su disolución y ebullición, se distribuye a tubos con alícuotas

de 3 a 4 ml. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 12 minutos, dejando que solidifiquen en forma inclinada.

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

Componentes:

Extracto de levadura	3.0g
Peptona de gelatina	10.0g
Peptona de caseína	10.0g
L-ornitina	10.0g
Dextrosa	1.0g
Púrpura de bromocresol	0.02g

Agar	2.0g
Agua destilada	1000ml

**Preparación:**

Disolver 31 g del medio en un litro de agua destilada, obteniendo un pH final de 6.4, se calienta hasta disolverse completamente, distribuir de 3 a 4 ml en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, enfriarlos y dejarlos en reposo en posición vertical hasta que solidifiquen.

**Agar de Manutención (Agar nutritivo modificado)****Componentes:**



---

---

Extracto de carne	4.0g
Peptona	10.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000ml

Preparación:

Se disuelven todos los componentes en un litro de agua destilada, dejando reposar 15 minutos. Calentar hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Esterilizar a 121°C por 15 minutos y vaciar en cajas petri estériles, esperando a que solidifique.

## Gelosa Especial, pH 8.6

### Componentes:

Agar bacteriológico	15g
Base de gelosa sangre	20g
Extracto de carne	1.5g
Cloruro de sodio	10g
Agua destilada	1000ml

### Preparación:

Se agregan todos los componentes a un litro de agua destilada y se mezcla perfectamente. Se calienta hasta su disolución cuidando de no llegar a la ebullición, después se vierten 5 ml a los viales estériles, se tapan y se les pone cinta adhesiva alrededor para asegurarlos bien. Se esterilizan a 121°C durante 15 minutos, pasado el tiempo se inclinan los viales y se espera a que solidifiquen.

A este medio no es necesario agregarle NaOH 1N, ya que el cloruro de sodio que se le agrega hace que el pH final sea de 8.6.

### **Solución Salina 0.85%**

Componentes:

Cloruro de sodio	8.5g
Agua destilada	1000ml

### **Solución Salina 0.45%**

Componentes:

Cloruro de sodio	4.5g
------------------	------

Agua destilada 1000ml

Preparación:

Se pesa la sal y se disuelven en un litro de agua destilada, y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

### **Formalina 0.6%**

Componentes:

Formaldehído HCHO

Preparación:

Para un litro, se prepara Solución salina al 0.85% y se le agregan 6ml de formaldehído.

### **Azida de Sodio 0.1% ( $\text{NaN}_3$ 0.1%) para 700ml.**

Componentes:

Azida de sodio PM = 65.02

Preparación:

Se preparan 700ml de Solución salina 0.85% y se esteriliza. Ya frío se pesan 0.7g de  $\text{NaN}_3$  y se le agregan a los 700ml de la Solución salina y se mezcla perfectamente.

Tabla de los antibióticos utilizados para el tratamiento del cólera en México.

En México, está normado el uso de los siguientes antibacterianos en el tratamiento del cólera de acuerdo a la siguiente tabla:

Edad	Antibacteriano	Dosis
< de 5 años	Eritromicina,	Suspensión 30 mg/kg de peso/día durante 3 días
5 - 9 años	Doxiciclina	Cápsulas 100 mg / una cápsula (DOSIS ÚNICA)
10 - 14 años	Doxiciclina	Cápsulas 100 mg / dos cápsulas (DOSIS ÚNICA)
> de 15 años	Doxiciclina	Cápsulas 100 mg / tres cápsulas (DOSIS ÚNICA)

Fuente: NOM-016-SSA2-1994 "Para la vigilancia, prevención, control, manejo y tratamiento del cólera".



## Literatura Citada

- Ajello, G., Bopp, C., Elliott, J. 2003. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. OMS. Atlanta, USA. 381pp.
- Ali, A., Rashid, M. H., Karaolis, K. R. 2002. High-Frequency Rugose Exopolysaccharide Production by *Vibrio cholerae*. Applied and Environmental Microbiology. 68:5773-5778.
- Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica del Cólera en México. Semana 52, 1992-1997. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. México.
- Borroto, J. R. 1997. Ecology of *Vibrio cholerae* serogroup O1 in aquatic environments. Rev. Pan Am Public Health. 1:3-8.
- Borroto, J. R. 1998. The survival of *Vibrio cholerae* O1 in surface freshwater and endemic cholera: A geocological hypothesis. Rev. Pan Am Public Health. 4(6):371-374.
- Colwell, R. R. Huq, A. 1994. Vibrios in the environment: Viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. American Society for Microbiology. 117-133.
- Colwell, R. R., Huq, A. and Lipp, E. K. 2002. Effects of Global Climate on Infectious Disease: The Colera Model. Clinical Microbiology Reviews. 15(4):757-770.

- Dumontier, S. y Berche, P. 1998. *Vibrio cholerae* O22 might be a putative source of exogenous DNA resulting in the emergente of the new strain of *Vibrio cholerae* O139. FEMS Microbiology Letters. 164:91-98.
- Faruque, S. M., John Albert, M., Mekalanos, J. J. 1998. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Molec. Rev. 62:1301-1314.
- Faruque, S. M., Kazi Mokim A., A. R. M. Abdul-Alim., Firdausi Qadri., Siddique, A. K. and Jonh Albert M. 1997. Emergente of a New Clone of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor Displacing *V. cholerae* Bengal in Bangladesh. Journal of Clinical Microbiology. 35(3):624-630.
- Garrity, G. M., Winters, M., Searles, D. B. 2001. Taxonomic outline of the prokaryotic genera: Bergey's Manual of the Systematic Bacteriology. 2<sup>a</sup> Ed. Springer-Verlag. USA. 39pp.
- Hall, R. M., Collis, C. M. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol. Microbiol. 15:593-600.
- Herrera, C. F. y Esteve, M. M. 2001. Vibrios Patógenos no coléricos. Gac. Med. Caracas. 109(2):217-221.
- Huq, A., Colwell, R. R. 1996. Environmental factors associated with emergente of disease with special reference to cholerae. East. Mediterran. Health. J. 2(1):37-45.
- Huq, A., Small, E., West, P. A., Huq, M. I., Rahman, R., Colwell, R. R. 1983. Ecological Relationships between *Vibrio cholerae* and Planktonic Crustacean Copepods. Applied and Environmental Microbiology. 45:275-283.
- Isaac-Márquez, A. P., Lezama-Dávila, C. M., Eslava- Campos, C., Navarro-Ocaña, A., Cravioto-Quintana, A. 1998. Serotypes of *Vibrio cholerae* Non-O1



isolated from water supplies for human consumption in Campeche. México and their antibiotic susceptibility pattern. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93:17-22.

- Jiménez Cisneros, B. E. 2001. La contaminación Ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. Limusa. México. 33-38 pp.
- Jonson, G., Svennerholm, A. M., Holmgren, J. 1989. *Vibrio cholerae* expresses cell surface antigens during intestinal infection which are not expressed during in vitro culture. Infect. Immun. 57:1809-1815.
- Juárez-Figueroa, L. A., Silva-Sánchez, J. Uribe-Salas, F. J., Cifuentes-García, E. 2003. Microbiological indicators of water quality in the Xochimilco Canals, México City. Salud Pública de México. 45(5):389-395.
- Kaper, B. J., Morris, G., Levine, M. M. 1995. *Cholerae*. Clinical Microbiology Reviews. 8(1):48-86.
- Kierek, K. & Watnick, P. 2003. Environmental Determinants of *Vibrio cholerae* Biofilm Development. Applied and Environmental Microbiology. 69(9):5079-5088.
- Kolter, R., Losick, R. 1998. One for all and all for one. Science. 280:226-7.
- Li, M., Shimada, T., Morris, G. Jr., Sulakvelidze, A., Sozhamannan, S. 2002. Evidence for the Emergence of Non-O1 and Non-O139 *Vibrio cholerae* Strains with Pathogenic Potential by Exchange of O-Antigen Biosynthesis Regions. Infection and Immunity. 70(5):2441-2453.
- Manual de Programa de Acción: cólera. Secretaría de Salud. Secretaría de Prevención y Protección de la Salud. 2001-2006. México.
- Miller, C., Drasar, B., Feachem, R. 1984. Response of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to physicochemical stress in aquatic environments. J. Hyg. 93:475-495.

- Morris, J. G. Jr., Sztein, M. B., Rice, E. W., Nataro, J. P., Losonsky, G. A., Panigrahi, P., Tacket, C. O., Jonson, J. A. 1996. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. *J. Infect. Dis.* 174:1364-1368.
- Ramírez y Pérez, M. 2003. Frecuencia de aislamiento de *Vibrio* spp; en muestras de agua, ostión y sedimento de la laguna de Mecocacán, Tabasco, Méx. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Ramírez-García, P., Cortés, M. J. E., Sánchez CH. J. J., Carlos, H. G. 1995. Nicho ecológico de *Vibrio cholerae* en el ambiente acuático vs. Un estudio experimental. IMTA. México. 117pp.
- Rashid, M. H., Rajanna, C., Ali, A., Karaolis, D. K. 2003. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letters.* 227:113-119.
- Raskin, D., Bina, J., Mekalanos, J. 2004. Genomic and Genetic Analysis of *Vibrio cholerae*. *ASM News.* 70(2):57-62.
- Sack, A. D., Sack, B. R., Nair, B. G., Siddique, K. A. 2004. Cholera. *The Lancet.* 363:223-233.
- Sánchez, P. 1991. Manual de Métodos de Aislamiento e Identificación de *Vibrio cholerae* en agua. CETESB. Sao Paulo, Brasil. 90pp.
- Sharma, S., Sachdeva, P., Viridi, J. S. 2003. Emerging water-borne pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:424-428.
- Shimada, T., Arakawa, E., Itoh, K., Okitsu, T., Matsushima, A., Asai, Y., Yamai, S., Nakazato, T., Nair, B. G., Albert, J., Takeda, Y. 1994. Extended Serotyping Scheme for *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology.* 28:175-178.

- Solís-Sánchez, A. 2005. Aislamiento y Caracterización de *Vibrio cholerae* de los canales de Xochimilco. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM., México.
- SUIVE, Sistema Único de Información Epidemiológica 1998-2003. Dirección general de Epidemiología, Secretaria de Salud. México.
- Thompson, L. F., Iida, T. & Swings, J. 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(3)403-431.
- Waldor M. K., Colwell, R. R., Mekalanos, J. J. 1995. The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigens an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants. *Microbiol*. 91:11388-11392.
- Waldor, K. M. & Mekalanos, J. J. 1996. Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science*. 272:1910-1914.
- Walter, T. 1999. *Microbiología*. Mc Graw-Hill. Interamericana. México. 274-283.
- Yildiz, F. H., Schoolnik, G. K. 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96:4028-4033.