



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES Y *Vibrio cholerae* EN LOS RÍOS
TIZATES Y AMANALCO, Y EN LAS ISLAS FLOTANTES DE MACRÓFITAS
EN EL EMBALSE DE VALLE DE BRAVO, MEX.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

MARIBEL ARIANA GRANADOS MONDRAGÓN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.

2013





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.



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.

Dedicatorias:

A mis padres, Juan Granados e Isabel Mondragón

por ser los pilares de lo que soy, por su apoyo incondicional, su empeño y por la fortaleza

transmitida para continuar con mis metas.

A mi hermano Luis y a mis hermanas Patty e Isabel por su fraternidad y gran amor.

Agradecimientos:

Gracias a mi familia que ha sido mi empuje y fortaleza para continuar creciendo profesional y personalmente ¡no sé qué haría sin ustedes!

Agradezco a mi padre Juan G.V., por brindarme los recursos para teminar mi carrera, así como su comprensión y paciencia; a mi madre Isabel M.C., por entregarme su confianza y la enseñanza de seguir adelante. Gracias a mis hermanas, amigas y confidentes: Patty y Gisela; siempre dandome fuerza para emprender un nuevo vuelo, suministrandome energía para continuar caminando. Gracias a mi hermano Luis por todos los favores, las atenciones y puntos de vista que me ha obsequiado. ¡Los amo!

De igual modo agradezco a mi director de tesis el Dr. Pedro Ramírez, por su apoyo académico y por todas esas enseñanzas profesionales, por todos esos consejos que me ayudaron a culminar mi trabajo de tesis.

A la M. en C. Martha Gaytán por proporcionarme nuevos conocimientos, por las platicas de ámbito profesional y personales que parecían interminables. Siempre alentándome a terminar, gracias por todo.

Gracias a: M. en C. Emelia Campoy, M. en C. Elizabeth Ramírez, Biol. Dolores Hurtado, Odon. Magarita Sermeño, Dr. Victor Martínez, M. en C. Alejandro Solís, Dra. Patricia Bonilla y Biol. Rocío Ibarra les agradezco a cada uno de ustedes toda su gran ayuda, cooperación, consejos, aportes y enseñanzas; sin ustedes no lo habría logrado.

Agradesco al apoyo otorgado a través del proyecto PAPCA-16 para la realizacion de este estudio; al Laboratorio del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina (UNAM) a cargo del Dr. Carlos Eslava y toda la atención recibida en mi estancia en el laboratorio; a proyecto CyMA por permitirme realizar en sus intalaciones del segundo piso (UIICSE) mi estudio.

Finalmente y no menos importante gracias a mis compañeros y amigos de generación, que estuvieron en el camino de mi formación profesional; en especial a ustedes “muñecas”: Osvelia (osito) te nos adelantaste, pero me has dejado un legado de amistad; mi confidente, nunca dejaras de ser mi caramelito, te extraño y te extrañare en demasía. Sé que en este momento nuestra alegría es mutua ¡por fin lo logre!. Ibet hermanita adoptiva, gracias por todos esos consejos y ánimos, por toda esa inmensa confianza y por ese lazo de amistad que nos une. Many gracias por todas esas platicas y tiempos compartidos; dentro de esa mujersota he podido conocer a la mujer sensible, gracias por brindarme tu amor y amistad. Rocío (Chio, tachita) gracias por todos esos momento que hemos compartido, los llevo en mi corazon. Yaz gracias por todo ese apoyo moral y de trabajo que me brindaste; por la compañía, amistad y confianza. Gracias por que a cada una de ustedes puedo llamarlas amigas, por su cariño y amor que es reciproco.

Y no podrian faltarme Erick, Axel, Sergio, Alex, Miguel, Fernando, Laura, Samanta; gracias de todo corazon por todas esas experiencias de vida y por todo el tiempo y espacio compartido.

Le doy gracias a Dios por permitirme conocer a tantas personas especiales, que me han ido moldeando y me han permitido llegar a ser la persona que hoy soy.

Índice

RESUMEN	8
1. Introducción	10
2. Antecedentes	13
2.1. Calidad Bacteriológica del agua	13
2.2. <i>Vibrio cholerae</i>	16
3. Justificación	19
4. Objetivos	19
4.1 General	19
4.2 Particulares	19
5. Métodos	20
5.1. Parámetros ambientales	22
5.2. Toma de muestra de Coliformes Totales y Fecales	22
5.3. Aislamiento de <i>V. cholerae</i>	22
5.4. Identificación bioquímica (API 20-E)	23
5.5. Análisis molecular	23
5.6. Hemólisis	24
5.7. Índice de correlación de Pearson	24
6. Resultados	25
6.1. Parámetros Físico-químicos	25
6.2. Coliformes Totales (CT)	28
6.3. Coliformes Fecales (CF)	31
6.4. Aislamiento e identificación bioquímica de <i>V. cholerae</i>	33
6.4.1. Hemólisis y morfología colonial	37
6.4.2. Análisis Molecular	41
7. Índice de Correlación de Pearson	41
8. Discusión	42
9. Conclusiones	46
10. Recomendaciones	47
11. Referencias	48
Anexo I	53
Anexo II	56
Anexo III	58

Índice de Figuras

Figura 1. Sitios de muestreo del embalse de VB, Estado de México.

Figura 2. IFM en el efluente del Río Tizates.

Figura 3. IFM en efluente del Río Amanalco.

Figura 4. Variación de la Temperatura del agua (°C), en las estaciones durante el periodo de muestreo.

Figura 5. Variación del pH (unidad) mensual *in situ*, de las estaciones de muestreo.

Figura 6. Variación del Oxígeno Disuelto (O.D., mg L⁻¹) en las estaciones de muestreo.

Figura 7. Variación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (D.B.O., mg L⁻¹) en las estaciones de muestreo.

Figura 8. Cuentas de CT en la estación TI en el periodo de muestreo.

Figura 9. Cuentas de CT en las estaciones del efluente del Río Amanalco.

Figura 10. Cuentas de CT en las estaciones de Centro y Cortina, en el periodo de muestreo.

Figura 11. Cuentas de CF de las estaciones de efluencia del río Tizates.

Figura 12. Cuentas de CF obtenidos en las tres estaciones de muestreo.

Figura 13. Cuentas de CF de las estaciones Centro y Cortina durante el periodo de muestreo.

Figura 14. Porcentaje de aislamientos de *V. cholerae* (presuntivo) en las estaciones TII y All en VB.

Figura 15. Diferencia del número de aislamientos en las estaciones TII y All donde desembocan los ríos hacia las IFM (antes) y hacia el embalse (después).

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de amplificados por PCR de *V. cholerae*: Amplificación del gen *toxR*. Carriles: 1) marcador de peso molecular 100 pb; 2) *V. cholerae* O139 El Tor; 3) *V. cholerae* O1 Clásico; 4) *Escherichia coli*; 5 al 20 cepas ambientales de *V. cholerae*.

Índice de Tablas

Tabla 1. Análisis del perfil bioquímico realizado para los aislamientos de *V. cholerae* en las estaciones de muestro antes y después de las IFM.

Tabla 2. Análisis general de los aislamientos de *V. cholerae*.

Tabla 3. Coeficiente de Correlación

Tabla 4. CT (NMP/100 mL) reportados para las estaciones Centro, Cortina y efluentes de los Ríos Tizates y Amanalco.

Tabla 5. CF (NMP/100 mL) reportados para las estaciones Centro, Cortina y efluentes de los Ríos Tizates y Amanalco.

Tabla 6. Promedios mensuales de los parametos realizados en las estaciones de muestreo.

RESUMEN

Se monitoreó la calidad bacteriológica del embalse de Valle de Bravo (VB) siendo este una de las principales fuentes de abasto de agua potable a la Ciudad de México, haciendo énfasis en la zona de afluencia de los ríos Tizates y Amanalco que descargan aguas residuales al sistema, así como en la zona de afluencia de estos ríos, donde se colocaron Islas Flotantes de Macrófitas (IFM) como un método de depuración del agua. Se realizaron muestreos de agua tomados a nivel superficial, en los meses de febrero a noviembre de 2010 y de marzo a junio de 2011 en 8 estaciones del embalse. Se cuantificaron los coliformes totales y fecales mediante la técnica del Número Más Probable (NMP). Para el aislamiento de *Vibrio cholerae* se colocaron hisopos de Moore antes y después de las estructuras de las IFM y en la desembocadura de los ríos Tizates y Amanalco. Se obtuvieron aislamientos de vibriones en muestras de zooplancton filtradas a través de una malla de 50 μ m de apertura. Para el aislamiento y determinación de *Vibrio cholerae* se utilizó el medio selectivo Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-Sacarosa (TCBS), tomando en cuenta las características de su morfología colonial en este medio; posteriormente se determinaron perfiles bioquímicos tradicionales y de virulencia por medio de la técnica de PCR.

Se determinaron parámetros fisicoquímicos: pH, O.D., temperatura del agua y DBO₅ de los sitios de muestreo. Los resultados de estos análisis mostraron que el pH tuvo una tendencia alcalina con rangos de 8.4 a 8.9 unidades; la temperatura no mostró una variación significativa en espacio y tiempo reportándose rangos entre 23 y 24 °C; el oxígeno disuelto (O.D.) fluctuó entre 7.26 mg L⁻¹ y 8.97 mg L⁻¹; la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) varió de 2.5 mg L⁻¹ a 3 mg L⁻¹. El efluente del Río Tizates mostró el promedio total más alto de contaminación bacteriológica, 6.9x10⁶ NMP/100 mL de coliformes totales (CT) y 1.4x10⁶ NMP/100 ml de coliformes fecales (CF). Se aislaron 63 cepas de *Vibrio cholerae*, de las cuales se trabajaron 25. Fueron seleccionadas a partir de criterios bioquímicos y características morfológicas. Para realizar en ellas una identificación complementaria, mediante el sistema estandarizado API[®] 20 E (bioMérieux[™]). El ensayo por PCR mostró la presencia del gen *toxR*. Se analizó la capacidad de las cepas para producir hemolisina, observándose que el 99% de los aislados presentó hemólisis total (β); en donde la mayoría las de cepas (84%) presentó morfología lisa y un 16% de las mismas cambio la morfología de sus colonias de lisas a rugosas.

1. INTRODUCCIÓN

Históricamente, el abastecimiento del agua se ha obtenido a partir de recursos hídricos tanto subterráneos como superficiales; estos últimos generalmente son vulnerables a agentes contaminantes de todo tipo (CNA•OAVM/UNAM•FES I, 2010).

Algunos de los principales problemas a los que están expuestos los ecosistemas acuáticos, se deben a las descargas industriales o bien a las aguas de drenaje procedentes de zonas urbanas o escurrimientos de campos agropecuarios que llegan, ya sea por fuentes puntuales o difusas (Rodríguez *et al.*, 1987). Las aguas de drenaje transportan heces humanas y de animales de sangre caliente que pueden contener agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, protozoos y hongos, estos agentes llegan a provocar enfermedades gastrointestinales graves como el cólera, la fiebre tifoidea, la disentería, la poliomielitis, la meningitis y las hepatitis A y B entre otras, y tiene la característica que pueden transmitirse por del agua.

Un parámetro muy utilizado para determinar en primera instancia la calidad del agua en cuanto a contaminación fecal es el grupo coliforme, constituido por bacterias indicadoras, que presentan las siguientes características: son bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporógenos, fermentan lactosa a temperaturas de 37°C entre 24 a 48 horas y producen ácido láctico y gas. La información proporcionada por este análisis es importante, pues advierte sobre un posible riesgo a la salud de la población que utiliza el agua (García-González *et al.*, 1982).

Los altos niveles de contaminación fecal que pueden llegar a tener los efluentes de los sistemas de agua ocurren debido a, que no tienen un previo tratamiento (Rodríguez *et al.*, 1987). Dentro de los géneros de bacterias patógenas más comunes en los desechos urbanos encontramos a: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Arizona*, *Erwinia*, *Streptococcus*, *Pasteurella* y *Vibrio* (Castro *et al.*, 1992).

Aun cuando una cuenta alta de coliformes se relaciona con una mayor probabilidad de que se presenten patógenos, existen microorganismos que no están relacionados directamente con la presencia del grupo coliforme, pero que son patógenos y que prosperan en ambientes acuáticos, tal es el caso de *Vibrio cholerae* que desarrolla estrategias de supervivencia, formando asociaciones comunitarias por medio de biopelículas con miembros de su misma especie o con organismos de

especies diferentes, entre los que se encuentran a los integrantes del zooplancton, peces, mariscos y raíces de plantas acuáticas como el lirio (*Eichornia crassipes*), en donde encuentra sitios de refugio para protegerse de los factores adversos del medio acuático (Luna, 2006; Solís, 2005).

Vibrio cholerae es el agente causal del cólera, descrito por primera vez por Paccinni en 1854 en Italia, ese mismo año John Snow demostró que el agua era el vehículo de diseminación de la enfermedad, y desde entonces se considera a esta bacteria como la tipo de las enfermedades hidrotransmisibles. Esta enfermedad se presenta como una infección intestinal aguda, la cual tiene un periodo de incubación de uno a cinco días, induciendo una intensa diarrea acuosa que se caracteriza por evacuaciones inodoras llamadas de “agua de arroz”, que pueden ocasionar deshidratación severa hasta la muerte del paciente, si no se trata rápida y adecuadamente (Karper *et al.*, 1995).

El manual de Bergey de bacteriología sistemática ubica a *V. cholerae* dentro del dominio Bacteria, Phyllis BXII Proteobacteria, clase III gamaproteobacteria, Orden XI Vibrionales, Familia I Vibrionales. Morfológicamente son bacilos curvos en forma de coma, Gram negativos, anaerobios y aerobios facultativos, que presentan gran movilidad debido a un flagelo polar, que miden de 1.5 a 2.5 μm de largo y 0.5 a 0.8 μm de ancho, y no forman endosporas, son anaerobios y aerobios facultativos (Karper *et al.*, 1995). A la fecha se han reportado más de 200 serogrupos, de los cuales solo dos: O1 y O139 son los que presentan un alto potencial patógeno y epidémico para los humanos. En *V. cholerae* O1 se han identificado los biotipos: El Tor y El Clásico que además se dividen en las variedades antigénicas Inaba, Ogawa e Hikojima. Así mismo, este microorganismo es capaz de recibir y transferir genes relacionados con la producción de toxinas, factores de colonización, resistencia a antibióticos, mientras que los polisacáridos de la cápsula le confieren resistencia al cloro (Solís, 2005).

Por estas características de importancia ecológica-salud hacen necesario realizar un monitoreo constante y tratamiento de los sistemas de agua destinados a diversos usos como, fuente de abastecimiento de agua potable, uso recreativo, recarga de mantos freáticos y aquella que se destina para el riego de cultivos y también particularmente en la reutilización del agua.

Debido a la importancia del agua, es necesario contribuir al mantenimiento de la calidad de la misma; para esto, existen varias tecnologías alternativas que contribuyen a mejorar su calidad y que han demostrado ser eficientes en la remoción de contaminantes. Tal es el caso del sistema de Islas Flotantes de Macrófitas (IFM) conformado por carrizos (*Phragmites* spp.), que consisten en una estructura flotante rectangular de unicel con perforaciones las cuales se llenan de fibra de coco como sustrato que alberga al carrizo. Dichas plantas reaccionan progresivamente a los cambios en la concentración de nutrientes, son capaces de depurar el agua, al eliminar grandes cantidades de materia orgánica, compuestos nitrogenados, fosforados, sólidos y en algunos casos hasta productos tóxicos. Las estructuras flotantes les permite sortear la variabilidad en el nivel del agua, así como, contribuir con su cobertura vegetal al paisaje donde se localizan, sirviendo además como importante refugio para las aves, alevines de peces, invertebrados acuáticos y microorganismos (CNA•OAVM/UNAM•FES I, 2010).

Uno de los sistemas hidráulicos más grandes del centro del país, se localiza en el Estado de México y es conocido como Sistema Cutzamala, que abastece de agua potable a la zona metropolitana sur poniente de la Ciudad de México y a la de Toluca, dicho sistema está a cargo de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). Este sistema hidráulico brinda 5 mil 920 litros por segundo para el Estado de México y 9 mil 716 litros por segundo para el Distrito Federal, lo cual equivale al 40% del agua potable consumida en estas áreas metropolitanas ($15.6 \text{ m}^3/\text{s}$ en total). La primera etapa del Sistema comenzó en 1982 con la integración de la Presa Villa Victoria y su segunda etapa en 1985 con la integración de la presa Valle de Bravo (VB) (<http://www.cuencaamanalcovalle.org>).

La Presa VB aporta el 38% del agua total del Sistema ($6 \text{ m}^3/\text{s}$), es la más grande y relevante del mismo; además, su belleza escénica ha permitido un desarrollo turístico muy relevante para la región. Se localizan en el municipio del mismo nombre en el Estado de México, a $19^{\circ}21'30''$ latitud norte y $100^{\circ}11'00''$ longitud oeste. Cuenta con una capacidad de 394 hm^3 , abarca una superficie de $61,548.71 \text{ h}$ y está ubicada a una altitud de $1,768 \text{ msnm}$. El clima es templado subhúmedo y semicálido con temperatura media anual mayor de 18°C y la del mes más frío menor a 18°C y una precipitación

invernal menor al 5% anual; el suelo dominante es acrisol órtico y andosol húmico de textura media con lecho rocoso entre 10 y 50 cm de profundidad y el relieve se constituye de lomeríos con mesetas (Pulido, 1997).

En esta presa desembocan 6 principales ríos, Tizates, Amanalco, González, Carrizal, Molino, Santa Mónica y algunos arroyos cuyo cauce pasa por varios centros de poblaciones que se asientan en sus márgenes en la parte media y alta de la cuenca, aportando contaminación por aguas residuales. Los más caudalosos son, también, los más contaminados, uno de ellos, el Río Amanalco, requirió la construcción de tres plantas de tratamiento a lo largo de su curso para disminuir la contaminación. Otro, el Río Tizates, requirió la construcción de un dren paralelo a lo largo de casi todo su trayecto para evitar que sea usado como canal de desagüe (<http://www.cuencaamanalcovalle.org>).

2. ANTECEDENTES

2.1. Calidad bacteriológica del agua.

En 1982, García *et al.* realizaron un estudio bacteriológico del agua para determinar el índice de la contaminación fecal en una comunidad en Tlaxacla, empleando la técnica del número más probable (NMP) por tubos múltiples, con el interés de aislar bacilos de *Salmonella* y *Shigella*. Identificaron en su mayoría a miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, encontrando a géneros como *Escherichia* y *Shigella*, en donde obtuvieron cuentas superiores a las recomendadas por la OMS.

Barrera-Escorcia *et al.* (1998) realizaron un estudio sobre la contaminación bacteriológica de la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz. En mayo y septiembre de 1994 y marzo de 1995 tomaron muestras de agua superficial, sedimento y ostión en cuatro estaciones de colecta relacionadas con aportes de agua residual. Analizaron 45 muestras (24 de agua, 12 de sedimento y 3 de ostión) por el método NMP. En el análisis de las muestras de agua encontraron que esta era inadecuada para el uso recreativo de contacto directo y para la protección de la vida acuática, reportando valores de 1.1×10^4 NMP/100 mL de CT y 2.4×10^4 NMP/100 mL de CF en mayo; mientras que en septiembre se presentaron concentraciones de 2.4×10^3 NMP/100 mL de CT. La contaminación fue atribuida a las descargas directas de agua residual

proveniente de los asentamientos humanos y a los aportes de contaminación que arrastra el río hacia la laguna, por lo que existe un riesgo asociado a estos.

Namihira-Santillán *et al.* (2002), evaluaron la contaminación por bacterias fecales en el Lago de Huayamilpas, Distrito Federal, realizando muestreos mensuales de agua superficial y sedimento, durante un año (1997-1998) en seis sitios ubicados en el lago. La técnica utilizada fue la del NMP; el mayor número de coliformes fecales y totales se presentaron en los meses con temperaturas más altas (abril a julio) obteniendo un 83% de las muestras analizadas se encontraban contaminadas por estos microorganismos, y el menor número de coliformes lo registraron en los meses fríos del periodo de estudio. Debido a la variación encontrada y a la fuerte contaminación en algunos sitios, recomendaron tomar medidas de sanidad en el uso del recurso especialmente para el contacto directo.

Barrera-Escorcia *et al.* (2004) llevaron a cabo un análisis bimestral de la concentración de bacterias coliformes en agua y sedimentos en la laguna de Akumal, Quintana Roo. Realizaron colectas de agua superficial y de sedimento en el año 2001; para las muestras de agua utilizaron el método NMP y un kit de SimPlate con medio lauril triptosa con 4-metil-umbeliferil- β -D-glucorónico (MUG) para los sedimentos. Los niveles de bacterias detectados en el agua no representaron un riesgo sanitario para los usuarios, excepto en el verano, cuando se incrementan las actividades turísticas. Con respecto al sedimento, obtuvieron altas concentraciones de bacterias, llegando a miles de bacterias/100 mL.

En 2006, Álvarez *et al.* realizaron un estudio en la cuenca del río Amajac, Hidalgo, utilizando un método estandarizado para obtener el Índice de calidad del agua (ICA) y poder predecir el grado de contaminación, así como establecer estrategias para el manejo de los recursos hídricos de dicha cuenca. Seleccionaron 17 sitios representativos, empleando un Geoposicionador portátil (GPS) y en cada uno de los sitios determinaron: Turbidez, pH, Oxígeno Disuelto, Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), Bacterias Coliformes Fecales, Nitrógeno (NO₃), Fósforo total (Pt) y Solidos Totales Disueltos (STD). De los datos que obtuvieron realizaron un análisis de regresión múltiple entre el ICA contra los ocho parámetros de calidad de agua que midieron, también realizaron diagramas de dispersión de las variables estudiadas con relación al

ICA. La calidad del agua se clasificó como calidad media en el 29% de los sitios muestreados, el 59% se encontraron en la categoría de contaminados y 12% se encontraron altamente contaminados. El rango de Coliformes Fecales fue de 1.2×10^5 hasta 2.4×10^5 NMP/100 mL. El porcentaje de saturación de O.D. fluctuó desde 0 hasta 115%, así mismo, obtuvieron que la contaminación del agua aumentaba cuando el pH disminuía. La DBO_5 fue de 20.34 mg L^{-1} ; los valores más altos de Nitratos fueron de 19.67 mg L^{-1} ; el fósforo se presentó en 50% de las muestras, con valores entre los 0.22 mg L^{-1} a 13.59 mg L^{-1} ; para la turbidez reportaron valores desde 7.52 NTU hasta 76.33 y finalmente los SDT reportaron rangos entre 6.81 mg L^{-1} a 8.35 mg L^{-1} , concluyendo que la calidad del agua fue media y que los componentes que más influencia tuvieron en la contaminación del agua fueron el O.D. y los Coliformes Fecales.

Guzmán-Quintero *et al.* (2007) realizaron un muestreo durante 2004-2005 para evaluar la calidad y el grado de contaminación del agua superficial en Texcoco, Edo. de México. También analizaron la conductividad eléctrica, sólidos totales disueltos, temperatura y pH. Para determinar coliformes totales (CT) utilizaron la técnica del número más probable (NMP). La concentración de CF resultó elevada (5.6×10^7 NMP/100 mL) superando los límites permisibles de la norma NOM-001-ECOL-1996, evidenciando una contaminación severa. En el mismo periodo pero en los ríos de la zona, Rivera-Vázquez *et al.* (2007), efectuaron 10 muestreos para cuantificar contaminantes químicos y biológicos: analizaron coliformes totales (CT), fecales (CF) por NMP utilizaron la técnica del NMP y realizaron una identificación morfológica para los huevos de helminto. Encontraron elevadas concentraciones de CF 1.1×10^5 NMP/100 mL, superando el Límite Máximo Permissible (LMP) de la norma NOM-001-SEMARNAT y para CT 1.9×10^5 NMP/100 mL. Concluyeron que las descargas de aguas residuales no tratadas contaminan los causes principalmente con CF, lo que constituye un problema para la región.

En 2009, Martínez-Romero *et al.* realizaron un estudio para determinar la calidad del agua en la cuenca del río Nazas, seleccionaron ocho sitios de muestreos localizados a los largo del río a nivel superficial. Para el análisis de las muestras utilizaron el método del Sustrato Definido (Método Oficial AOAC 991.15). En sus resultados obtuvieron contaminación por coliformes totales en el 100% y algunos sitios

mostraron niveles ligeramente elevados comparados con la norma NOM-001-ECOL-1996, también encontraron presencia de *Escherichia coli*, pero esta no sobrepasó el límite máximo permitido que indica la norma. Si bien, los coliformes totales y fecales no sobrepasaron los límites, enfatizaron que para evitar la contaminación del agua por estos microorganismos se deben aplicar las normas donde se establecen los rangos permisibles de contaminación ya que el agua es un recurso escaso y vulnerable.

Chávez-Alcántara *et al.* (2011), realizaron una evaluación de la calidad del agua en la Ciénega de Chapala, Michoacán en abril de 2008, diciembre de 2008 y mayo de 2009 seleccionando 16 sitios de muestreo. Realizaron análisis químicos y bacteriológicos e hicieron una descripción estadística de los valores obtenidos, calcularon el índice de Calidad del Agua (ICA). Los resultados que obtuvieron con respecto al ICA mostraron que el 44.5% tuvo buena calidad de agua, 53.3% tuvo calidad moderada y el 2.2% fue de baja calidad, observando que el incremento de la temperatura del suelo y aire causó una significativa degradación de la calidad del agua, atribuyendo esto a la liberación y transporte de contaminantes hacia los cuerpos de agua, relacionados con el volumen de escorrentía. Concluyeron que la concentración de contaminantes en las aguas superficiales de la Ciénega de Chapala se incrementa debido al vertimiento de drenajes agrícolas y aguas residuales; recomiendan el tratamiento de ambas así como la protección de las fuentes de buena calidad.

2.2. *Vibrio cholerae*.

El primer caso reportado en México de una cepa de *V. cholerae* O1 biotipo el Tor, serotipo Inaba, fue en junio de 1991, en un paciente del sexo masculino en la sierra de Goleta, en el Estado de México. En 1995 Ramírez *et al.* realizaron un estudio ecológico de *V. cholerae* en la laguna de Mecocacán, en Tabasco, donde demostraron que *V. cholerae* O1 es una especie endémica que forma parte de la micro-biota de la laguna y que presenta un patrón estacional con incrementos en la época de lluvias y disminución en la época de secas; ellos no encontraron una relación con bacterias indicadoras de contaminación fecal. En 1997, en el mismo sitio, Ramírez-Pérez realizó un estudio en donde aisló *V. cholerae* de muestras de agua, ostión y sedimento, encontrando solo cepas de serogrupos no O1/no O139, y aisló también otras especies (*V. alginolyticus* y

V. parahemoliticus), observó una relación significativa entre la temperatura y la presencia del microorganismo en la laguna. En 1998, Isaac, *et al.* realizaron análisis de muestras de agua para consumo humano obtenidas de diferentes pozos en el estado de Campeche. Encontraron presencia de *V. cholerae* no O1 y los serogrupos que predominaron fueron: O14, O155 y O112 mostrando además, la existencia de cepas resistentes a ampicilina y a carbenicilina. Solís (2005) realizó un estudio para determinar la presencia de *V. cholerae* en Xochimilco, Ciudad de México. Efectuó muestreos mensuales de marzo 2002 a marzo 2003 seleccionando cuatro puntos de muestreo, dos en áreas urbanas y dos en el área de reserva ecológica; determinó parámetros fisicoquímicos (DBO₅, oxígeno disuelto, pH) y biológicos (Clorofila-a y zooplancton). Para los aislamientos de *V. cholerae* utilizó la técnica descrita por Sánchez *et al.* (1991) y la de Gutiérrez (1992); para la identificación bioquímica utilizó el sistema automatizado Vitek con tarjetas de identificación GNI+ y para la sensibilidad a antimicrobianos utilizó el mismo sistema automatizado con tarjetas para sensibilidad de Gram-negativos GNS-604k. Realizó también una tipificación serológica a partir de cultivos en medio Agar Soya-Trypticaseína (TSA). También realizó un análisis molecular siguiendo la técnica por extracción de Fenol/Cloroformo descrita por Maloy y la técnica de PCR de tipo multiplex. Concluyó que el pH alcalino que presentaron los canales favorecía la supervivencia de *V. cholerae* y que la concentración de zooplancton y los aislamientos de *V. cholerae* tuvieron una relación directa. Encontró también cepas con resistencia a antimicrobianos comunes usados en el tratamiento del cólera, y el gen relacionado con virulencia que encontró fue *toxR*. Concluyó que los canales de Xochimilco son un reservorio de cepas de *V. cholerae* virulentas y potencialmente patógenas, haciendo de estos canales un posible vehículo de transmisión hacia la población humana.

Luna (2006), realizó un muestreo mensual por un periodo de 10 meses, de diciembre 2003 a octubre 2004 en la planta de tratamiento “Cerro de la Estrella”, en Iztapalapa, en el cual determinó los parámetros fisicoquímicos de Oxígeno Disuelto, Temperatura y pH; para los aislamientos bacterianos de *V. cholerae* en agua utilizó el hisopo de Moore y medio de transporte AMIES, también tomó muestras de raíz de lirio (20 g), y continuo con la técnica de Sánchez *et al.*, (1991). Para la identificación de las

cepas y susceptibilidad a antimicrobianos utilizó el sistema automatizado VITEK; para la tipificación serológica utilizó medio TSA, solución salina al 0.85% y formalina en solución salina. Los resultados obtenidos revelaron que el pH y la temperatura favorecieron la presencia de la familia *Vibrionaceae*, mientras que las concentraciones de oxígeno disuelto no mostraron ninguna relación con el número de aislamientos. La frecuencia de aislamientos fue mayor en las raíces de lirio y las especies identificadas fueron: *Vibrio cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* y *Aeromonas veronii*. Se concluye que la planta de tratamiento “Cerro de la Estrella” es una fuente de contaminación patógena y posiblemente se deba al aporte de agua de desecho de las zonas que confluyen y que llegan a la planta de tratamiento, contribuyendo en cierta medida con cargas de ese microorganismo.

En 2009, Castañeda realizó un estudio de 128 cepas de *V. cholerae* aisladas por Solís Sánchez durante los años (2002-2003), utilizando el medio AS (Agar Sangre) en la recuperación de las cepas para verificar sus características y la pureza con medio TCBS, como medio diferencial usó Mac Conkey. Posteriormente seleccionó 53 cepas al azar tomando en cuenta las cuatro estaciones de muestreo y características como: serogrupo, morfología y hemolisis. El resultado que obtuvo fue una recuperación del 90% del total de las cepas, aunque la pérdida del 10% indica que no es tan viable el procedimiento del almacenamiento y significa pérdida de información genética de los microorganismos. Las cepas recuperadas mostraron un alto grado de similitud con cepas epidémicas de *V. cholerae* O1/O139 por lo que concluyó que es importante mantener vigilancia epidemiológica y estudios en pacientes con diarrea que vivan en el área de la delegación de Xochimilco y así determinar si las cepas pudieran estar involucradas en la etiología de los cuadros clínicos que presentan los pacientes enfermos y detectar oportunamente la reemergencia de cepas epidémicas de *V. cholerae* causantes de cólera.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que tiene el embalse de VB como fuente de abastecimiento de agua potable y como sitio de recreación y tomando en cuenta que recibe descargas de agua residual a través de sus efluentes, el presente trabajo tomo como finalidad determinar la calidad bacteriológica de este cuerpo de agua con base en la determinación del grupo coliforme y la presencia de *V. cholerae* por la particularidad de esta bacteria de permanecer refugiada en microambientes acuáticos tales como el caparazón quitinoso del zooplancton y proliferar rápidamente, bajo periodos de intensas lluvias, con el riesgo de desencadenar epidemias.

Aprovechando un proyecto de Biorremediación del agua en el embalse, con base en el uso de IFM para remoción de P y N, también se tomaron muestra en los lugares antes y después de la estructuras para ver si hay un efecto de remoción de vibriones o de las coliformes.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la calidad bacteriológica y presencia de *Vibrio cholerae* en los afluentes de los ríos Tizates y Amanalco en el embalse y en relación a las IFM de Valle de Bravo, Estado de México.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar algunos parámetros ambientales que se sabe influyen en la presencia de las bacterias de interés.
- Determinar la presencia de *V. cholerae* mediante pruebas bioquímicas y el sistema estandarizado API 20E.
- Determinar la capacidad hemolítica y tipo de morfología que presenten los aislamientos.
- Determinar la presencia de genes de virulencia de los vibriones aislados en el estudio, que puedan representar un riesgo para la salud humana.

5. MÉTODOS

Para el presente estudio se diseñó un programa de muestreo que abarcó los meses de febrero a noviembre de 2010 y de marzo a junio de 2011 en donde se seleccionaron 8 estaciones de muestreo para el análisis bacteriológico del agua: Tizates I, II, III; Amanalco I, II, III; Centro y Cortina. Entre las estaciones de TI, TII y AI, AII se encuentran posicionadas las IFM (Figura 1). Cabe señalar que las estaciones del río Amanalco se comenzaron a muestrear desde junio de 2010. Para determinar a *V. cholerae*, se eligieron las estaciones de Tizates II y Amanalco II, y por su cercanía a la desembocadura de los ríos Tizates y Amanalco, en posiciones dentro y fuera de las IFM (Figuras 1, 2 y 3).



Figura 1. Sitios de muestreo del embalse de VB, Estado de México.



Figura 2. IFM en el efluente del Río Tizates.



Figura 3. IFM en efluente del Río Amanalco.

5.1. PARÁMETROS AMBIENTALES

En la capa superficial del agua (0.5 m) se determinaron los siguientes parámetros *in situ*: **Temperatura del agua** (°C) y **Oxígeno Disuelto** (O.D., mg L⁻¹), se determinaron con un Oxímetro (YSI 85, Ohio, USA), **pH** (unidades) se determinó con un potenciómetro digital (HANNA HI 9126 pH/ORP) y para **Demanda Bioquímica de Oxígeno** (DBO₅, mg L⁻¹) se tomaron 2 L de agua que se transportaron en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio, continuando con el método descrito en A.P.H.A. (1989).

5.2. TOMA DE MUESTRA PARA COLIFORMES TOTALES Y FECALES

Se colectaron muestras de agua a nivel superficial utilizando bolsas estériles y se transportaron bajo las condiciones requeridas de refrigeración hacia el laboratorio, se procesaron antes de las 24 h mediante la técnica del NMP por tubos múltiples, utilizando caldo lactosado (Difco^{MR}) como medio de cultivo en la fase presuntiva y para la fase confirmativa se empleó el medio de cultivo caldo lactosado bilis verde brillante (Difco^{MR}). Para la determinación de coliformes fecales se utilizó caldo EC (Difco^{MR}) a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva (A.P.H.A., 1989).

Se obtuvieron los resultados del análisis utilizando las tablas del número más probable NMP/100 mL y finalmente se comparó con la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMRNAT-1996.

5.3. AISLAMIENTO DE *Vibrio cholerae*

Se realizaron concentraciones bacterianas utilizando hisopos de Moore (Gutiérrez, 1992), colocados antes y después de las IFM, sumergiéndolos en el agua durante 24 h. Transcurrido ese tiempo los hisopos se colocaron en bolsas estériles con medio de transporte AMIES (Anexo I) y fueron transportados a temperatura ambiente hasta su análisis.

Se continuó con la técnica (Sánchez *et al.*, 1991) que consiste en homogenizar la muestra y transferir 10 ml del medio de transporte AMIES modificado homogenizado a un matraz de 125 ml con 50 ml de agua peptonada alcalina a doble concentración (APA) (Anexo II), después se deja incubar por un periodo de 6 h, para tener un primer

enriquecimiento y formación de biopelícula; se tomó dicha biopelícula con un asa de siembra y se pasó a placas de agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS, Bioxon) y 5 ml de la misma biopelícula se inoculó en 50 ml de agua peptonada alcalina a concentración sencilla, dejándolas incubando por un periodo de 18 a 24 h, obteniendo así un segundo enriquecimiento para posteriormente realizar una toma con asa de siembra de la biopelícula para sembrar en placas de agar TCBS. De las placas de TCBS se seleccionaron cinco colonias típicas (redondas, convexas, de color amarillo y consistencia viscosa) y posteriormente se identificaron con pruebas bioquímicas tradicionales: Triple azúcar y hierro (TSI, Difco), movilidad-indol-ornitina (MIO, Difco), lisina-hierro-arginina (LIA, Bioxon) y tiras de Oxidasa (Bactident; Merk). Dichas técnicas fueron aplicadas a las muestras analizadas en el estudio.

5.4. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA (API® 20 E)

Diseñado para la identificación de *Enterobacteriaceae*, y otros bacilos Gram negativos no exigentes; este sistema se compone de 20 microtubos que contienen substratos deshidratados. La preparación de la galería consistió en repartir 10 ml de agua destilada estéril en los alvéolos de las cámaras de incubación utilizadas para cada tira reactiva, para crear una atmósfera húmeda, después se realizaron suspensiones bacterianas de colonias aisladas, en tubos con 5 ml de suero fisiológico estéril, se homogenizó e inoculó la suspensión bacteriana en cada microtubo de la galería con ayuda de una pipeta Pasteur, evitando la formación de burbujas, después se incubaron las cámaras cerradas a 36°C durante un periodo de 18 a 24 horas. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación, se interpretaron mediante cambios de color espontáneos y mediante la adición de reactivos. Para la lectura de las reacciones se utilizó la Tabla de Lectura, y la identificación se obtuvo con ayuda del Catálogo Analítico a partir de un perfil numérico.

5.5. ANÁLISIS MOLECULAR

Para el análisis genético se obtuvo ADN genómico mediante calentamiento de las cepas aisladas. Como controles positivos se utilizaron cepas de *V. cholerae* N16961 El Tor y C19385 El Clásico y como control negativo HB101, *Escherichia coli*. Se utilizaron

6 secuencias específicas para el análisis de genes relacionados con virulencia en *V. cholerae* (Anexo III) empleando la técnica de PCR. Las condiciones del termociclador fueron: una fase inicial de desnaturalización 94°C, 2 min, una fase de alineamiento 59°C, 30 seg., 30 ciclos 2 min / 72°C (desnaturalización), 30s / 94°C (alineamiento de los oligos), 30s / 72°C (extensión de los oligos), y finalmente el ciclo de extensión duró 5 min / 72°C. Los productos de PCR fueron revelados en geles de agarosa al 1.2% en 100 mL de TBE 1x a 170 V, visualizados en un transiluminador UV.

5.6. HEMOLISIS

Para obtener la capacidad hemolítica de las cepas de *V. cholerae*, fueron sembradas en Agar base Sangre (AS, Difco) con 5% de sangre desfibrinada de carnero (Hemoprovedores, México) incubando a 35°C por 24 h.

5.7 ÍNDICE DE CORRELACIÓN

Se realizó un índice de correlación de Pearson con el programa de Excel/office2011, de los parámetros ambientales, las cuentas de Coliformes y el número de aislamientos de *V. cholerae*.

6. RESULTADOS

6.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

La Temperatura del agua mostró un promedio de 23-24°C y un rango de 18.5 a 25.0 °C. Las temperaturas mayores se presentaron en los meses de mayo a julio alcanzando los 25°C en las estaciones de TII y AIII, mientras que la temperatura descendió en los meses de febrero y noviembre alcanzando los 19 °C (Figura 4), dichos valores se encuentran normalmente en la región de VB por su tipo de clima.

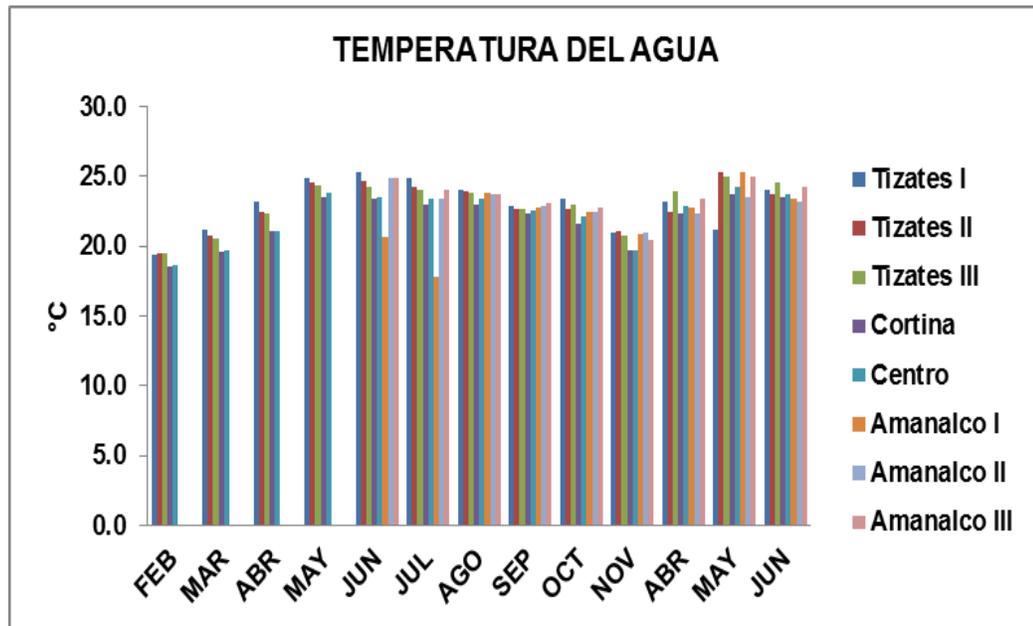


Figura 4. Variación de la Temperatura del agua (°C), en las estaciones durante el periodo de muestreo.

El análisis de pH mostró una tendencia general alcalina en los sitios de muestreo, encontrándose un rango de 7.02 a 9.6; los meses que fueron presentando elevaciones en los rangos de pH fueron mayo y junio, siendo estos parte de los periodos calurosos del año (Figura 5) y, el mes de noviembre presentó una disminución encontrando rangos de 7.08 a 7.32.

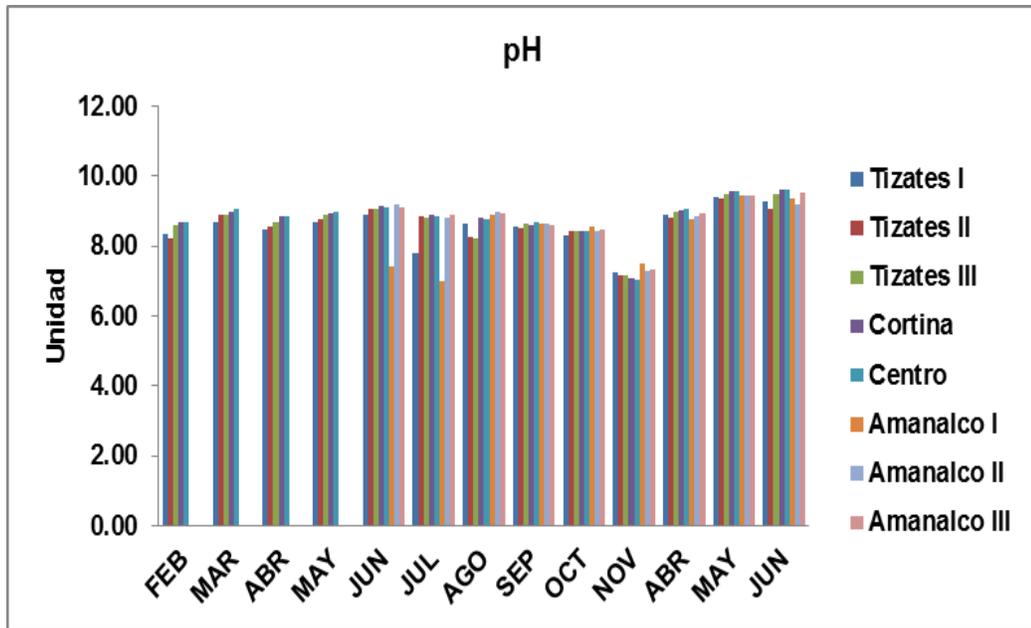


Figura 5. Variación del pH (unidad) mensual *in situ*, de las estaciones de muestreo.

Las concentraciones de Oxígeno Disuelto (O.D.) oscilaron entre 5.00 mg L^{-1} y 12.07 mg L^{-1} . Cabe señalar que los meses en donde los valores de O.D. disminuyeron fueron en septiembre-2010 donde se encontraron valores desde 5.96 mg L^{-1} en la estación de TII a 7.70 mg L^{-1} en la estación Centro. El mes de noviembre-2010 mostró valores bajos de 3.48 mg L^{-1} en la estación Cortina y 6.84 mg L^{-1} en la estación de AI. Mientras que el mes que mostró los valores más elevados fue julio en donde oscilaron entre 9.41 mg L^{-1} en TIII hasta 12.07 mg L^{-1} en la estación de AII (Figura 6).

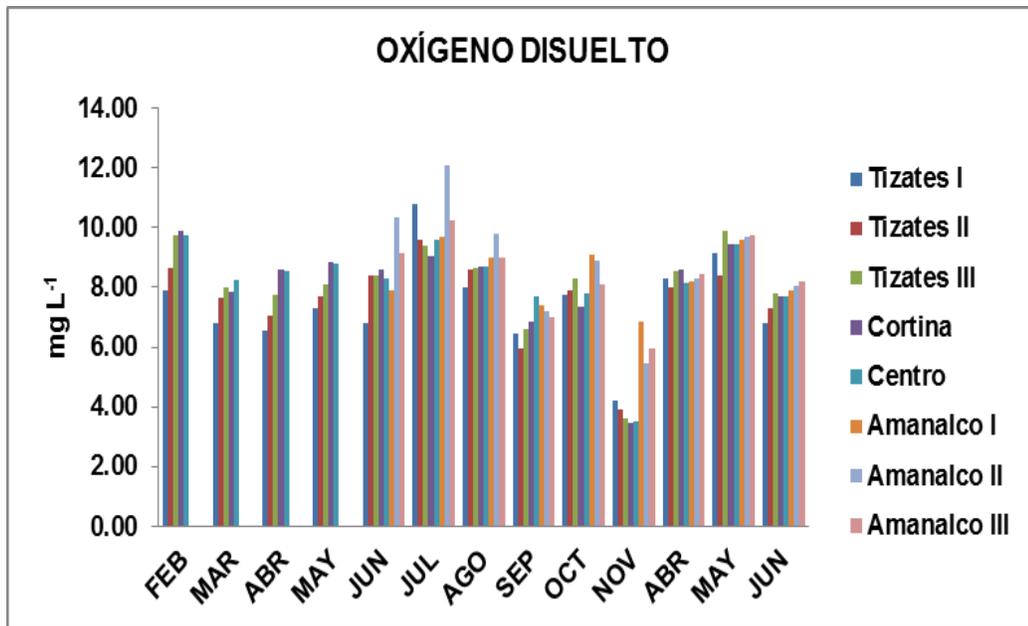


Figura 6. Variación del Oxígeno Disuelto (O.D., mg L⁻¹) en las estaciones de muestreo.

La DBO₅ en los sitios de muestreo no presentó valores que sobrepasaran los límites que marca la NOM-001-SEMARNAT-1996 de 30 mg L⁻¹ para uso público urbano, además de que hay que recordar que el agua que es extraída del embalse pasa por una planta potabilizadora.

Los niveles de DBO₅ oscilaron de 1.06 mg L⁻¹ a 3.98 mg L⁻¹ para las estaciones situadas en el efluente del río Tizates y para el efluente del río Amanalco se presentaron valores mínimos de 0.96 mg L⁻¹ y máximo de 4.44 mg L⁻¹. La estación Cortina presentó valores de 3.23 mg L⁻¹ a 1.46 mg L⁻¹ y los de Centro oscilaron entre 3.33 mg L⁻¹ y 1.20 mg L⁻¹ (Figura 7).

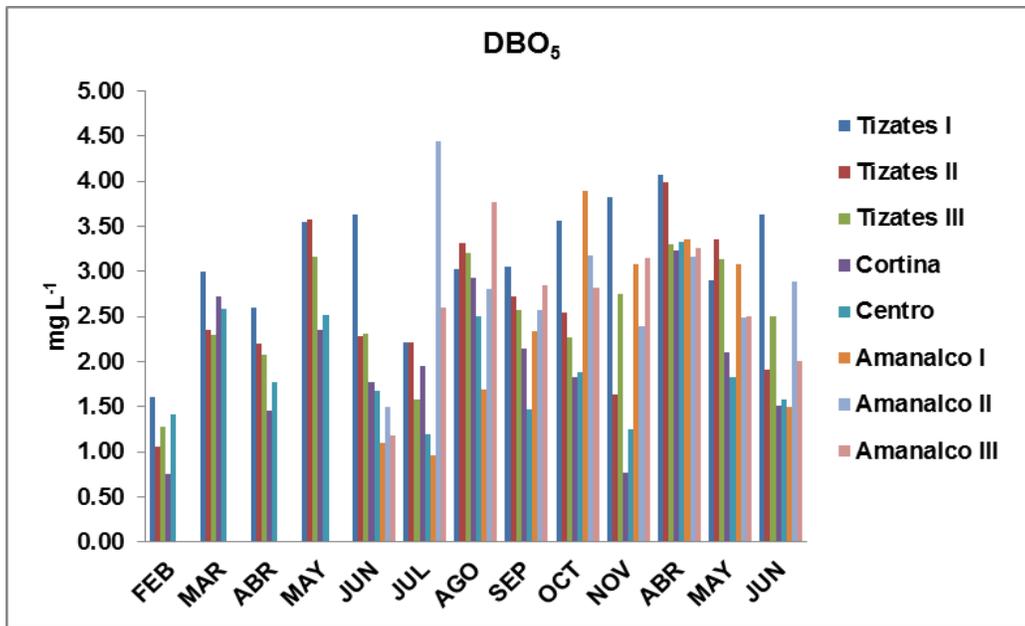


Figura 7. Variación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (D.B.O., mg L⁻¹) en las estaciones de muestreo.

6.2. COLIFORMES TOTALES (CT)

Los resultados de las cuentas se presentaron desde valores bajos hasta valores de miles por lo que se graficaron en escala logarítmica base 10.

Un 99% de las muestras dio positivo para la presencia de CT, las estaciones de la desembocadura del río Tizates mostraron cuentas que sobrepasaron los límites permisibles de la NOM-001-SEMARNAT-1996 utilizada para las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, dicha norma solo permite cuentas de 1,000 NMP/100 mL como promedio mensual y 2,000 NMP/100 mL como promedio diario.

La estación de TI mostró las cuentas mas elevadas de las tres estaciones situadas en el efluente del río Tizates, donde se encontraron valores de 3.5×10^5 NMP/100 mL correspondiente el mes de febrero-2010 y 7.9×10^6 NMP/100 mL en abril-2011. Las cuentas mas relevantes que se encontraron en las estaciones de TII y TIII se presentaron en el mes de abril-2011 de 3.9×10^4 NMP/100 mL en la estación TII y para TIII en febrero-2010 con 9.2×10^4 NMP/100 mL. Los meses que presentaron temperaturas mas bajas (septiembre a octubre) mostraron una disminución en las cuenta de estos microorganismos (Figura 8).

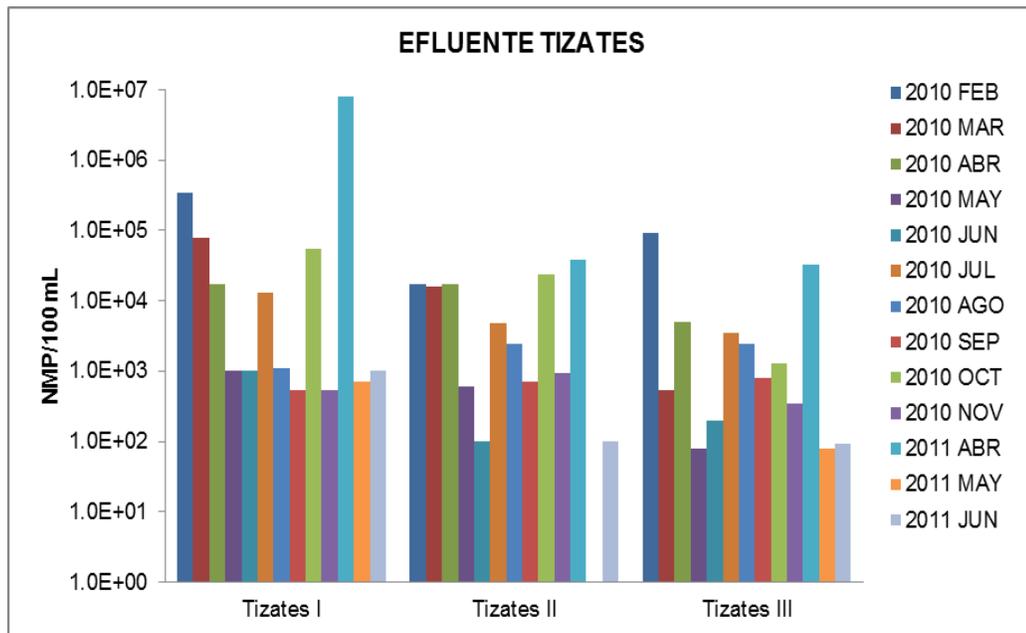


Figura 8. Cuentas de CT en la estación TI en el periodo de muestreo.

Cabe señalar, que el efluente del río Amanalco fue muestreado a partir del mes de junio de 2010 por lo que una comparación entre ambos ríos no puede ser clara, ya que ambos presentaron contaminación por coliformes. Aunque, los muestreos por mes no hayan comenzado simultáneamente, dichos datos encontrados en este estudio muestran las condiciones en que se encuentran ambos efluentes.

Las cuentas en las estaciones del efluente del río Amanalco, que sobrepasaron los límites de la norma antes mencionada, reportaron un mayor número de organismos en AI con 9.2×10^4 NMP/100 mL en julio-2010 y AIII en junio-2011 con el mismo número de organismos, otra estación que mostró contaminación por coliformes fue AIII con una cuenta de 2.2×10^4 NMP/100 mL en abril-2011, la estación AII solo mostró altas concentraciones en el mes de julio-2010 con 2.4×10^3 NMP/100 mL (Figura 9).

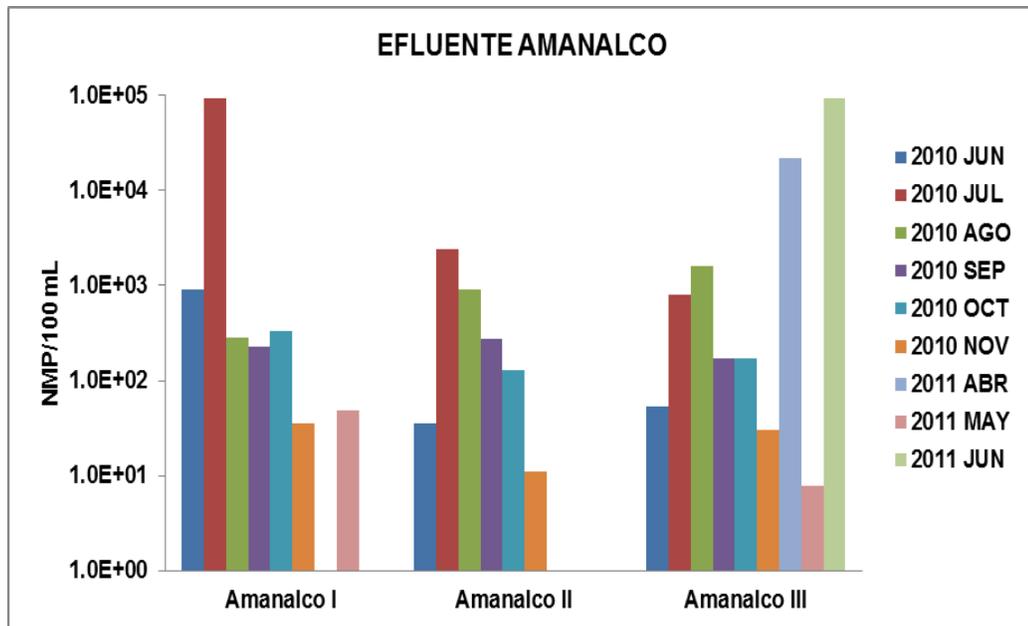


Figura 9. Cuentas de CT en las estaciones del efluente del Río Amanalco.

Las estaciones Centro y Cortina mostraron una menor contaminación de coliformes totales; para la estación Centro los meses que presentaron mayor número de organismos fueron febrero con 5.4×10^2 NMP/100 mL, abril y mayo con 7.0×10^2 NMP/100 mL, en la estación Cortina se registrarón valores de 3.5×10^6 en el mes de febrero y 8.0×10^4 en el mes de abril, siendo estos los registros mas altos reportados durante el estudio, para esas estaciones (Figura 10 y Tabla 4 en Anexo 1). Respecto a la temporalidad, se observó menor cantidad de coliformes totales en temporada de lluvias (junio a agosto) y en los últimos meses del año (septiembre a noviembre).

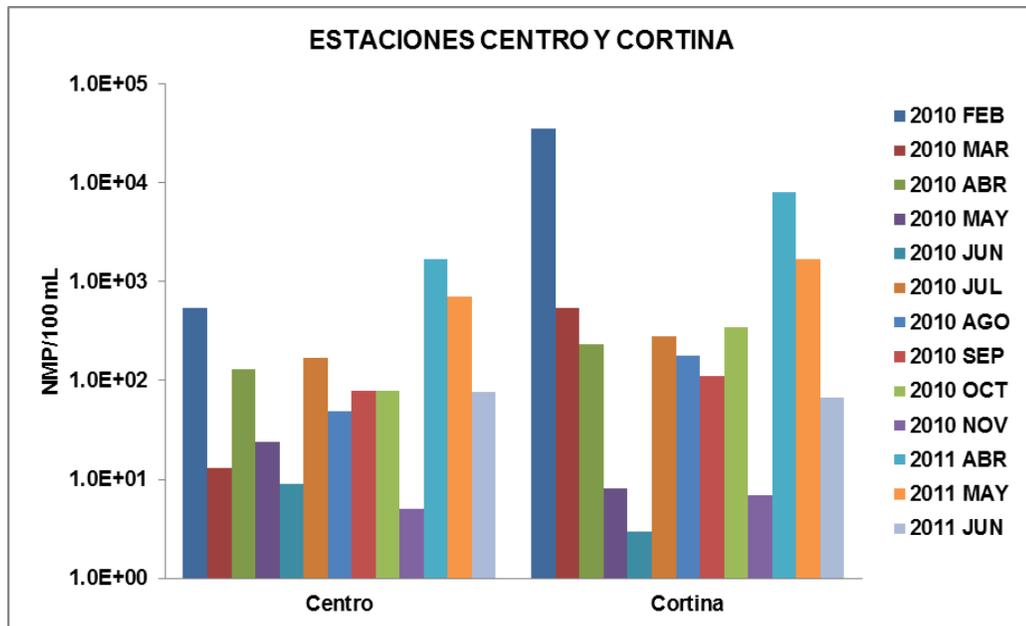


Figura 10. Cuentas de CT en la estaciones de Centro y Cortina, en el periodo de muestreo.

6.3. COLIFORMES FECALES (CF)

El 99 % de las muestras analizadas dio positivo para CF. La estación más contaminada del área del río Tizates fue TI donde los valores más altos registrados fueron de 3.5×10^6 NMP/100 mL en el mes de febrero de 2010 y 1.3×10^7 NMP/100 mL en el mes de abril de 2011 (Figura 11). La estación de TII mostró cuentas menores encontrando 790 NMP/100 mL en mayo de 2011 y la mas alta fue el abril-2011 con 2.6×10^4 NMP/100 mL la cual sobrepasó los límites permitidos por la norma oficial utilizada para el presente estudio que es de 1,000 NMP/100 mL. Mientras que TIII tuvo cuentas de 600 NMP/100 mL en el mes de mayo de 2010, hasta 2.8×10^4 NMP/100 mL en el mes de febrero del mismo año, considerando dicho mes de febrero como parte de la época fría del año probablemente hubo una mayor incidencia de desechos a los que se pudieron atribuir las cuentas altas encontradas en dicha estación (Figura 11 y Tabla 5 en Anexo 1).

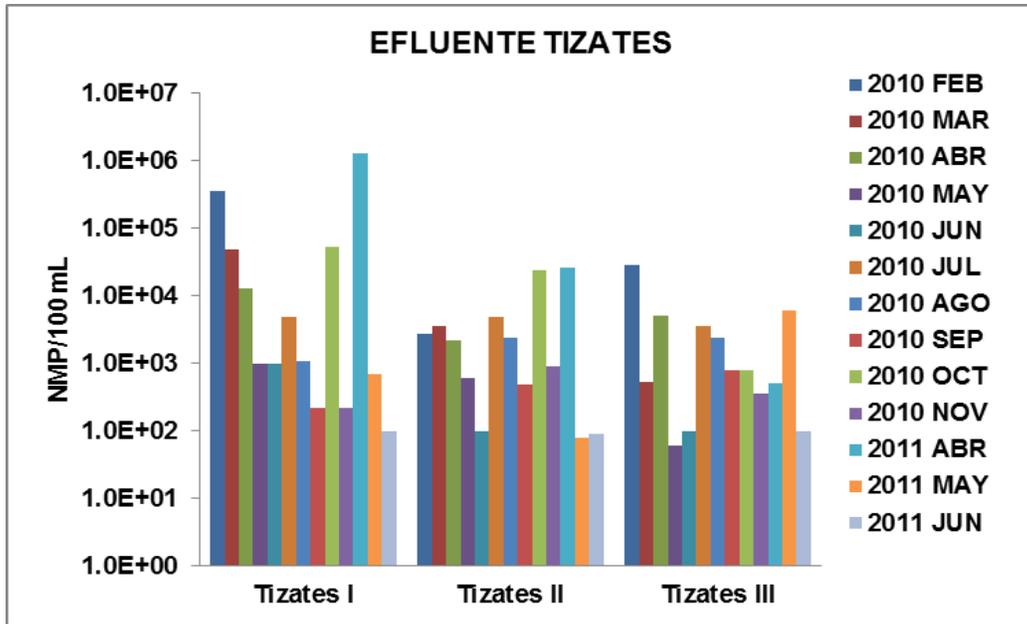


Figura 11. Cuentas de CF de las estaciones de efluencia del río Tizates.

Por otra parte en el área de efluencia del río Amanalco, la estación AI presentó las cuentas mas altas en el mes de julio-2010 encontrandose 3.5×10^4 NMP/100 mL y las cuentas mas bajas por coliformes fecales las tuvo la estación de AII en septiembre y AIII en noviembre de 2010 con 200 NMP/100 mL (Figura 12).

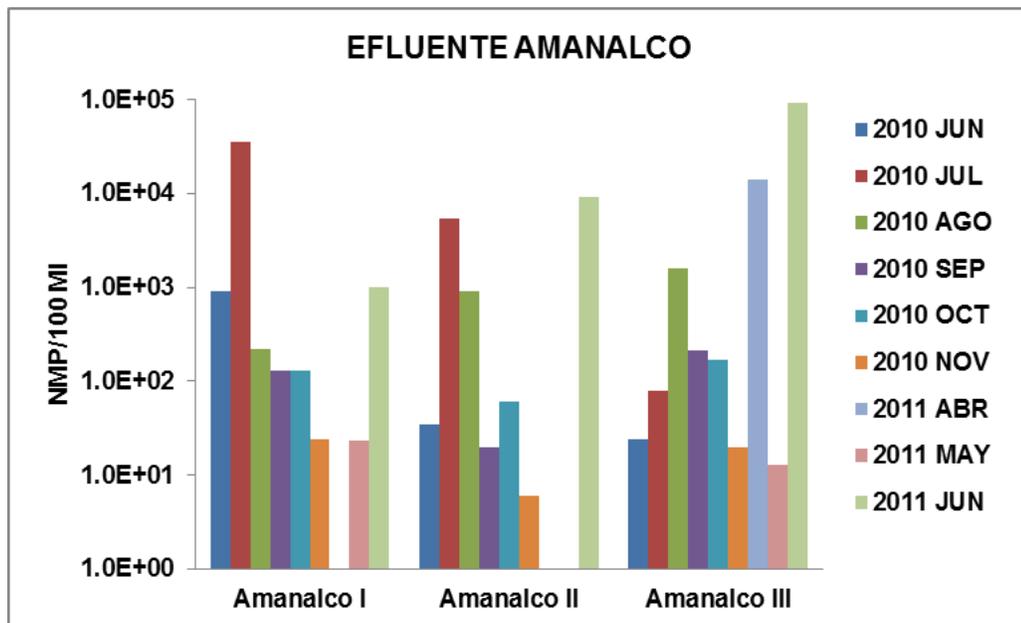


Figura 12. Cuentas de CF obtenidos en las tres estaciones de muestreo.

La estación Centro mostró bajas cuentas por CF, sin embargo el mes de abril-2011, presentó cuentas de 1.7×10^3 NMP/100 mL que sobrepasaron los límites permitidos por la norma oficial mexicana mencionada con anterioridad, mientras que la estación Cortina mostró cuentas altas en varios meses del periodo de muestreo como la del mes de febrero-2010 donde se encontraron cuentas de 1.7×10^4 NMP/100 mL y en abril-2011 de 8.0×10^3 NMP/100 mL, siendo estas las cuentas que muestran mayor contaminación en estos puntos de muestreo (Figura 13). Ambas estaciones se encuentran ubicadas lejos de los puntos de vertimiento de los efluentes de los ríos Tizates y Amanalco, por lo que es interesante observar como aún alejadas presentan contaminación por estos microorganismos y cuentas que llegan a superar los límites máximos permitidos por la norma consultada en este estudio.

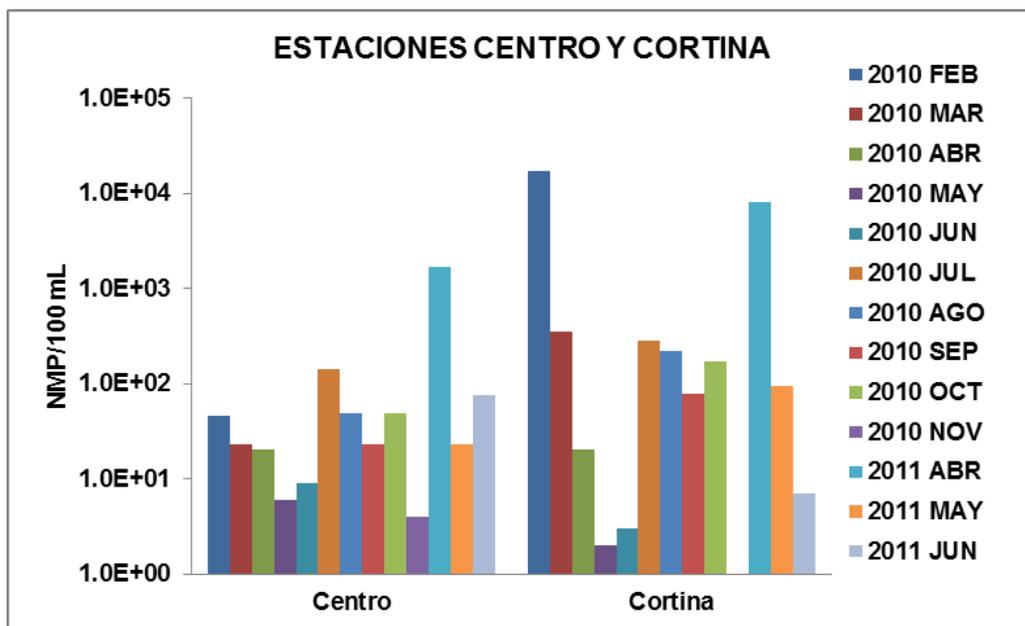


Figura 13. Cuentas de CF de las estaciones Centro y Cortina durante el periodo de muestreo.

6.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Vibrio cholerae*.

El estudio se orientó al aislamiento de integrantes de la familia Vibrionaceae y *V. cholerae* fue la especie que se identificó con mayor frecuencia en las muestras analizadas, hecho que pudiera estar relacionado con la capacidad que tienen estos microorganismos de formar asociaciones comunitarias por medio de biopelículas.

Se analizaron un total de 76 hisopos de Moore durante 10 meses de muestreo (agosto 2010 a junio 2011) y 16 muestras de zooplancton durante los meses de agosto-noviembre 2010. Se aislaron un total de 110 cepas a las que se les realizaron pruebas bioquímicas (TSI, LIA, MIO, Oxidasa, Citrato, Mac Conkey) se descartaron las que no presentaron el perfil bioquímico para *V. cholerae* y solo 63 fueron los presuntivos Vibrios, 52 correspondieron a agua y 11 a zooplancton.

De las estaciones TII y AII, ubicadas cada una en los respectivos efluentes de los Río Tizates y Amanalco, AII fue la que presentó un mayor porcentaje de aislamientos (62.2 %) de cepas presuntivas para *V. cholerae* que la estación de TII (54.5 %) (Figura 14).

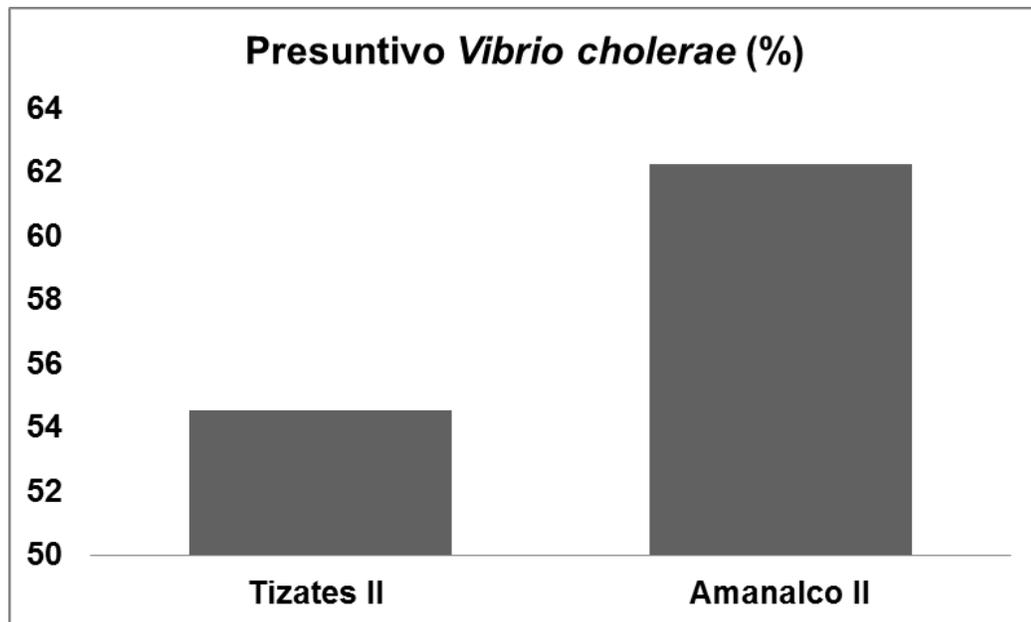


Figura 14. Porcentaje de aislamientos de *V. cholerae* (presuntivo) en la estaciones TII y AII en VB.

Con respecto a los aislamientos antes y después de las IFM, se encontró que en la estación TII donde se ubican las IFM, se presentó un número mayor de aislamientos antes de la IFM. Mientras que en la estación AII no se presentó una diferencia entre el número de aislamientos antes y después de la IFM (Figura 15).

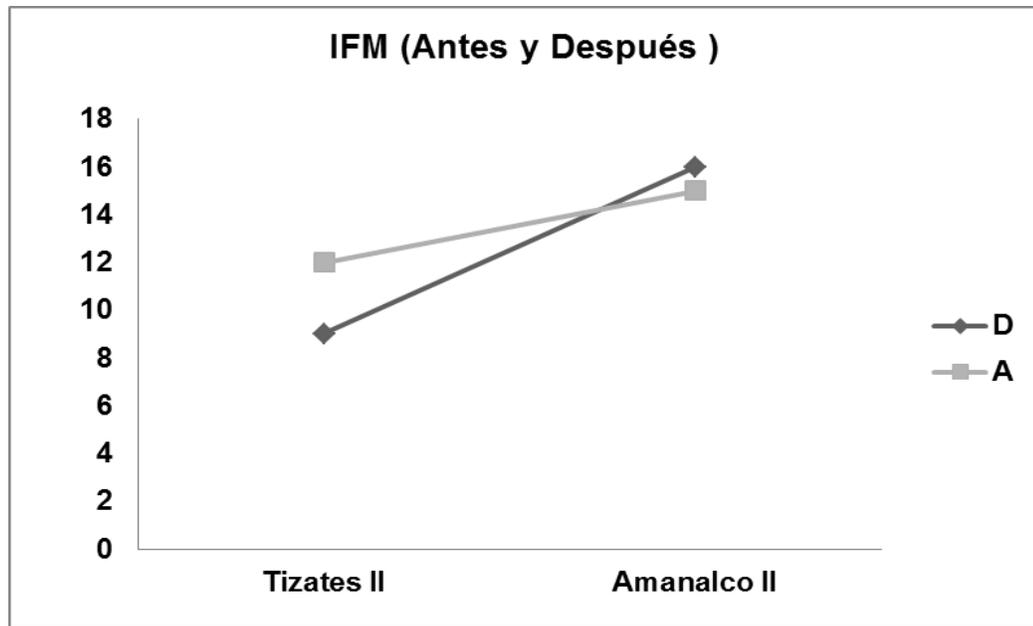


Figura 15. Diferencia del número de aislamientos en las estaciones TII y AII donde desembocan los ríos hacia las IFM (antes) y (después) hacia el embalse.

De las 63 cepas que se determinaron como presuntivos vibrios, se seleccionaron solo 25 con base en criterios bioquímicos y las características morfológicas típicas que presentaron y se les realizó un perfil bioquímico mediante el sistema estandarizado (BioMérieuxTM) API[®] 20 E, donde se obtuvo la siguiente interpretación (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis del perfil bioquímico realizado para los aislamientos de *V. cholerae* en las estaciones de muestro antes y después de las IFM.

SISTEMA ESTANDARIZADO API-20 E				
CEPA	FECHA	SITIO (RÍO)	CÓDIGO	INTERPRETACIÓN
1	28-sep-10	TII zooplancton	7347124	<i>V. cholerae</i>
2	24-ago-10	TII zooplancton	7347124	<i>V. cholerae</i>
3	24-ago-10	All después	6347104	<i>V. cholerae</i>
4	24-ago-10	All después	7345125	<i>V. cholerae</i>
5	24-ago-10	All antes	7347124	<i>V. cholerae</i>
6	28-sep-10	TII después	7347124	<i>V. cholerae</i>
7	28-sep-10	TII antes	5346124	<i>V. cholerae</i>
8	28-sep-10	All después	7346124	<i>V. cholerae</i>
9	28-sep-10	All después	7347124	<i>V. cholerae</i>
10	28-sep-10	All después	7347124	<i>V. cholerae</i>
11	26-abr-11	All antes	5347124	<i>V. cholerae</i>
12	26-abr-11	All antes	5347124	<i>V. cholerae</i>
13	26-abr-11	All antes	5347124	<i>V. cholerae</i>
14	26-abr-11	All antes	5347124	<i>V. cholerae</i>
15	26-abr-11	All después	5347124	<i>V. cholerae</i>
16	26-abr-11	All después	5347124	<i>V. cholerae</i>
17	24-may-11	All antes	5347125	<i>V. cholerae</i>
18	24-may-11	All antes	5347125	<i>V. cholerae</i>
19	24-may-11	All después	5147124	<i>V. cholerae</i>
20	24-may-11	All después	5147124	<i>V. cholerae</i>
21	24-may-11	All antes	5347124	<i>V. cholerae</i>
22	24-may-11	All después	7347134	<i>V. cholerae</i>
23	24-may-11	All después	5347124	<i>V. cholerae</i>
24	28-jun-11	All antes	5147124	<i>V. cholerae</i>
25	28-jun-11	All antes	5147124	<i>V. cholerae</i>

6.4.1. HEMOLISIS Y MORFOLOGIA COLONIAL

Después del análisis de API[®] 20 E estas cepas de sometieron a un análisis para determinar si presentaban la capacidad de producir hemolisinas. El 99% de los aislados presentaron hemolisis total (β hemolisis) de eritrocitos de carnero (Tabla 2). Posteriormente se les realizó un análisis para observar el tipo de morfología colonial que presentaban los aislamientos después de incubarlos 24 h a 23°C y dejándolos de 5 a 7 días posteriores a la incubación a temperatura ambiente, donde se observó que la mayoría (84 %) presentaron morfología lisa y solo un 16 %, de las colonias cambiaban su morfología de lisa a colonias con surcos, que se define como rugosas. Después del tiempo transcurrido los aislamientos ya no presentaron ningún cambio en su morfología.

Tabla 2. Análisis general de los aislamientos de *V. cholerae*.

AISLAMIENTOS DE <i>Vibrio cholerae</i>																
				BIOQUIMICAS												
				TSI					LIA							
CEPA	FECHA	SITIO (RÍO)	TCBS	Acido	Gas	H2S	M	I	O	Lisi	Desa	OX	Citrato	Mac Conkey	Hemolisis	Tipo de colonia
2010																
1	SEP	TII zooplancton	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	β	lisa
2	AGO	TII zooplancton	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	β	lisa
3	AGO	All antes	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	β	lisa
4	AGO	All antes	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	β	lisa
5	AGO	All después	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	β	lisa
6	SEP	TII antes	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	β	lisa
7	SEP	TII después	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	β	lisa
8	SEP	All antes	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	β	lisa
9	SEP	All antes	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	α	lisa
10	SEP	All antes	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	β	lisa
2011																
11	ABR	All después	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	β	lisa
12	ABR	All después	+	+	-	-			-	-	-	+	+	-	β	lisa

								+	+							
13	ABR	All después	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	β	rugosa
14	ABR	All después	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	β	lisa
15	ABR	All antes	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	β	lisa
16	ABR	All antes	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	β	lisa
17	MAY	All después	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	β	rugosa
18	MAY	All después	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	β	lisa
19	MAY	All antes	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	β	lisa
20	MAY	All antes	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	β	rugosa
21	MAY	All después	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	β	rugosa
22	MAY	All antes	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	α	lisa
23	MAY	All antes	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	β	lisa
24	JUN	All después	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	α	lisa
25	JUN	All después	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+		-	β	lisa

Continuación de la Tabla 2.

AISLAMIENTOS DE <i>Vibrio cholerae</i>						
	PCR / Gene (s)					
	ctxA	toxR	tcpA	hlyA	O139	O1
Tinción GRAM	564 bp	779 bp	C-451/ET620 bp	ET-482 bp	449 bp	192 bp
2010						
bacilos	-	+	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	+	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	+	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	+	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	+	-	-	-	-
bacilos	-	+	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	+	-	-	-	-
bacilos	-	+	-	-	-	-
bacilos	-	+	-	-	-	-
bacilos	-	-	-	-	-	-
2011						
bacilos, cocos	-	+	-	-	-	-
bacilos	-	-	-	-	-	-
bacilos	-	+	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	+	-	-	-	-
bacilos	-	+	-	-	-	-
bacilos	-	+	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	+	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	+	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	-	-	-	-	-
bacilos, cocos	-	-	-	-	-	-
cocos	-	-	-	-	-	-
bacilos	-	-	-	-	-	-
bacilos	-	+	-	-	-	-
bacilos	-	+	-	-	-	-
bacilos	-	+	-	-	-	-

6.4.2. ANÁLISIS MOLECULAR

Los ensayos de PCR múltiplex para determinar la presencia de genes relacionados con la virulencia mostraron que las cepas analizadas carecen de los genes *ctxA*, *tcpA*, *hlyA* y solamente mostraron la amplificación del gen *toxR* (Figura 4 y Tabla 3), el cual fue determinado en 19 (76%) de las 25 cepas analizadas; mostrándose un amplicón de 300pb en la cepa aislada del efluente del río Amanalco dentro de la IFM.

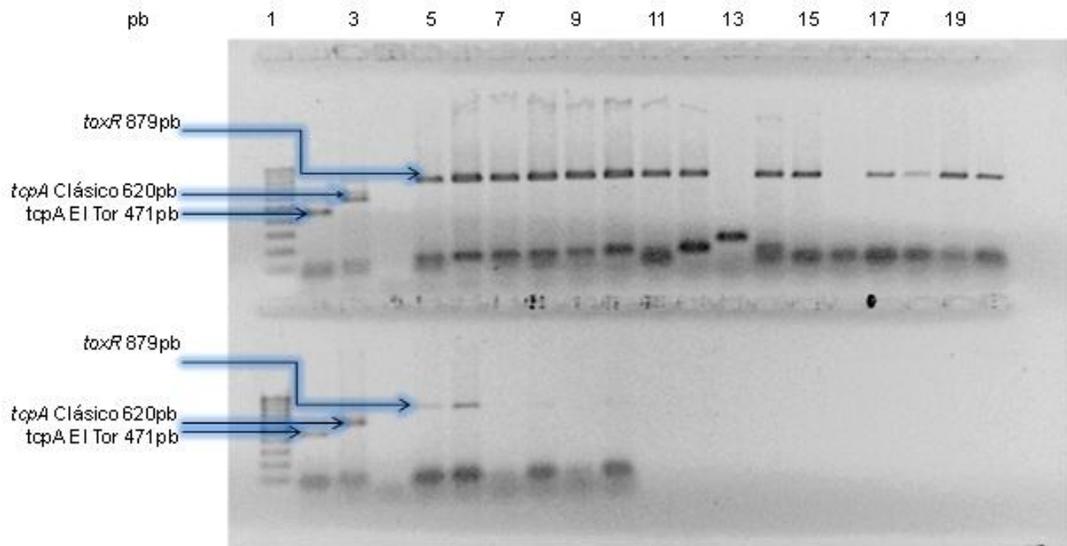


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de amplificadores por PCR de *V. cholerae*: Amplificación del gen *toxR*. Carriles: 1) marcador de peso molecular 100 pb; 2) *V. cholerae* O139 El Tor; 3) *V. cholerae* O1 Clásico; 4) *Escherichia coli*; de 5 al 20 cepas ambientales de *V. cholerae*.

7. COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON

En el coeficiente de correlación realizado, los índices muestran que los parámetros fisicoquímicos, los coliformes y *V. cholerae* no presentan entre ellos una correlación significativa.

Tabla 3. Coeficiente de Correlación

	TEM	pH	O.D	DBO ₅	CT	CF	<i>V. cholerae</i>
TEM	1						
pH	0.569338824	1					
O.D	0.308402687	0.56990525	1				
DBO ₅	0.368861298	0.11656519	0.002126	1			
CT	-0.07496919	0.06610713	0.107663	-0.02772	1		

CF	0.004988016	0.0487821	0.070607	0.047701	0.969022	1	
<i>V. cholerae</i>	-0.10174366	0.29830679	0.0822	0.043125	-0.122	-0.26317	1

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinaron los parámetros ambientales y físico-químicos que se presentan y comentan a continuación.

La temperatura del agua, juega un papel importante en la distribución, periodicidad y reproducción de los organismos así como en los procesos químicos y bioquímicos. El promedio mensual en el embalse, fue de 23°C, y los ámbitos de temperatura registrados en el embalse no representan riesgo para el riego, uso público urbano, actividades recreativas y vida acuática (Guzmán-Quintero, 2006). El rango registrado en el embalse (18.5-25 °C) no sobrepasa el límite máximo establecido en la NOM-001-SEMARNAT-1996 de 40 °C para protección de la vida acuática. El rango encontrado más bien es favorable para el desarrollo de las coliformes y *V. cholerae* (Luna, 2006)

La variación del pH del agua se debe al equilibrio carbónico y a la actividad vital de los microorganismos acuáticos; la secuencia de equilibrios de disolución de CO₂ en el agua y la disolución de carbonatos e insolubilización de bicarbonatos, influyen drásticamente en el pH de cualquier sistema de agua, sobre todo en los continentales (Álvarez, 2006). El rango de pH observado en VB (7.08-9.61) está dentro del rango de pH óptimo para el grupo coliforme (6.5-9.0 APHA, 1986) y para *V. cholerae* (5.6-9.0 Borroto, 1998). Aunque la mayor parte del periodo de estudio el pH fue alcalino (8.4-8.9), esto parece no afectar la presencia de las bacterias de acuerdo a los coeficientes de correlación encontrados entre este parámetro y las cuentas obtenidas (Tabla 3); sin embargo se sabe que un pH alcalino es más favorable para la proliferación de *V. Cholerae* (Borroto, 1998).

En la mayoría de las aguas superficiales, el oxígeno elemental proviene de la atmósfera que contiene 20.95% de oxígeno por volumen de aire seco, por ende, la capacidad del agua de re-oxigenarse ella misma por el contacto con la atmósfera es una característica importante (Castillo-Arriaga, 2009). De acuerdo a los valores de baja correlación obtenidos de O.D. y las bacterias (Tabla 3), las coliformes no se ven afectadas ni la presencia del patógeno *V. cholerae*, ya que son organismos que pueden

vivir en un medio aerobio o en condiciones anaeróbicas. La presencia de bacterias en el agua con bajos niveles de oxígeno podría indicar la incorporación de materia orgánica en el sistema (Barrera-Escorcia, 2004).

La Demanda Bioquímica de Oxígeno no sobrepasó los niveles permitidos por la NOM-001-SEMARNAT-1996 de 30 mg L^{-1} , lo cual indica que la carga de materia orgánica no es muy alta. Los mayores valores registrados en mayo y los de agosto a noviembre del 2010 y en los primeros meses del 2011 (abril-junio) no corresponden a los mayores cuentas de las bacterias, lo que puede explicar los bajos valores de correlación entre la DBO_5 y los microorganismos (Tabla 3). Sin embargo, los valores promedio de los efluentes (3.13 mg L^{-1} en TI y 2.33 mg L^{-1} en AI) explican la mayor cantidad de coliformes en la descarga de los ríos (Tabla 6 en Anexo I).

Con respecto a los resultados de coliformes en el embalse, las cuentas mas altas y que sobrepasaron los límites de 1000 NMP/100 mL que menciona la norma oficial se reportaron en las estaciones de TI y TIII, de igual forma en las estaciones de AI y AIII, esto se puede asociar a desechos urbanos vertidos en las corrientes y a la presencia de pequeños hatos de ganado que pastan en los alrededores de los cuerpos de agua que se desarrollan en el lugar y que contribuyen a la contaminación por estos microorganismos (Castillo-Arriaga, 2009). Además de que en las estaciones de TII y AII se encuentran situadas las IFM, a las que se les atribuye un trabajo de depuración alrededor de su área de influencia. Mientras que, la estación Centro mostró una menor cuenta de coliformes totales y fecales que no rebasaron los límites de la norma oficial mexicana probablemente, por la lejanía de las fuentes contaminantes y los efectos depurativos naturales como los rayos UV, aereación y dilución ya que presentó una baja y/o casi nula contaminación bacteriológica. Solo en los meses de febrero y abril la estación Cortina presentó cuentas altas de coliformes (3.5×10^6 NMP/100 mL y 8.0×10^4 NMP/100 mL), situación que se puede atribuir al movimiento de masas de agua derivados de las corrientes y de la existencia de canales y profundidad en el sistema de agua, entre otros factores; de manera que no sólo es un proceso de difusión simple.

Asimismo, se observó que los coliformes totales tanto en temporada de lluvias junio y agosto como en los últimos meses del año, de septiembre a noviembre se redujeron las cuentas, esto probablemente debido a que en temporada de lluvias se

presenta el efecto de dilución y en los últimos meses del año, aunque el clima se vuelve más frío los días tiene mayor incidencia de radiación solar.

También, se observó un comportamiento constante en todas las estaciones, una mayor cuenta en los meses de febrero y abril que corresponde a periodos de secas y tendiendo a temperaturas más altas. Las cuentas disminuyeron en los meses de lluvias, probablemente debido a una dilución por el aumento del volumen de agua pero y al parecer esta dilución se sostiene aún cuando cesan las lluvias; al menos hasta el mes de agosto. Este comportamiento concuerda con el reportado para estos organismos en varios cuerpos de agua en México (Guzmán-Quintero *et al.*, 2006; Namihira-Santillán *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2006).

En lo que respecta a la presencia de *V. cholerae*, la temperatura y pH del embalse lo favorecen, aunque el coeficiente de correlación es bajo entre la DBO₅ y *V. cholerae*, los valores promedio de DBO₅ en los efluentes de los ríos Tizates y Amanalco (Tabla 6) influyen en la presencia de tales organismos, pues hay mayor materia orgánica que puedan degradar. Aunque hubo mayor materia orgánica en el efluente del río Tizates, el mayor porcentaje de aislamientos se presentó en el efluente de Amanalco, esto no se puede explicar del todo ya que aún cuando los procesos de autodepuración o tratamiento biológico son efectivos (hay que recordar que hay 3 plantas de tratamiento en su cauce) al parecer no impactan las poblaciones de *V. cholerae* posiblemente por su estrategia de aglutinarse en el ambiente en forma de biopelículas, las cuales están constituidas por polisacáridos que protegen a los microorganismos de factores ambientales poco favorables, a su vez los vibriones obtienen un suministro constante de nutrientes, ya sea por la presencia de corrientes de agua las cuales transportan nutrientes necesarios a toda la biopelícula o bien por el intercambio y utilización de productos de desecho entre los miembros de la misma biopelícula (Solís, 2005; Rivera *et al.*, 2001).

También, por las asociaciones que tiene con otros organismos como el refugiarse en el caparazón quitinoso del zooplancton el cual queda demostrado por los aislamientos obtenidos a partir de estos organismos, la exitosa supervivencia que tienen en este tipo de sistema de agua como lo es VB. Como ya se han mencionado, las ventajas que obtiene *V. cholerae* al adherirse a varios tipos de sustratos sobre todo en

copépodos al usar la quitina de su caparazón como sustrato y fuente de carbono por lo que pudiera constituir un posible reservorio.

Así mismo los aislados presentaron hemolisis (β hemolisis), esta prueba se relaciona a microorganismos con factores de virulencia con un gran potencial patogénico (Solís, 2005; Luna, 2006). La hemolisina es una enterotoxina de 65 kD con capacidad citolítica en eritrocitos y en cultivos celulares, tradicionalmente es usada para distinguir entre los biotipos El Tor y Clásico (Karper *et al.*, 1995). Hecho que pudiera ser relevante ya que la expresión de hemolisinas es mayor en cepas clínicas que ambientales, la cual es común en el serogrupo O1 biotipo El Tor y poco común en el biotipo Clásico. Aunque la hemolisina no juega un papel importante en la respuesta del sistema sectorial inicial que presentan las bacterias como *V. cholerae* son necesarios varios tipos de ensayos que demuestren el papel que tiene la hemolisina en las infecciones diarreicas (Solís, 2005).

Como ya se había mencionado *V. cholerae* puede cambiar su fenotipo de liso a “rugoso” como resultado de la abundante producción de un exopolisacárido (EPS). Se ha relacionado esta morfología con la resistencia al cloro libre de hasta 2 mg/L de cloro libre por 30 min y también a la formación de biopelículas. En los aislamientos se observó que las colonias cambiaban su morfología, sin embargo, muy pocas mostraron el fenotipo “rugoso”, el cual podría ser una posible explicación de la supervivencia y persistencia de este microorganismo y por otra parte estudios realizados retando cepas arrugadas de *V. cholerae* O1 El Tor en voluntarios mostraron que tanto el síndrome clínico del cólera como la respuesta inmunológica son comparables con los mostrados por el fenotipo liso, lo que sugiere que el fenotipo arrugado también se relaciona con virulencia en humanos (Solís, 2005, Luna, 2006, Morris *et al.*, 1996). Este fenotipo arrugado mostrado en pocas de las cepas analizadas podría suponer, que estas presentan cierta resistencia a las condiciones ambientales, una característica que les permite su persistencia en el embalse.

Los ensayos de PCR múltiple reportaron la presencia del gen *toxR* determinado en 19 de las cepas analizadas (76%), este gen *toxR* controla la expresión de otros genes como CT (*ctxA*) que codifica a la toxina colérica; el gen *tcpA* que codifica para la biogénesis del pilus, principal factor de anclaje y colonización del hospedero, además

de distintos genes relacionados con factores de virulencia en cepas de *V. cholerae* O1 y O139 (Gosh *et al.*, 1997). Estos resultados coinciden con los observados en cepas ambientales de serogrupos provenientes de aislamientos obtenidos de Xochimilco, los cuales mostraron una alta prevalencia del gen *toxR* en varios serogrupos como O7, O14, O18 y O19 (Solís, 2006; Rivera *et al.* 2001). Asimismo el gen *toxR* forma parte de los diferentes sistemas de regulación en *V. cholerae*, como es la variación en la expresión de los genes de virulencia optimizando su permanencia en diferentes ambientes tales como el intestino humano y el hábitat acuático (Rosas *et al.*, 2004). La presencia del gen *toxR* en los microorganismos aislados representa un riesgo para las comunidades que están expuestas directamente al agua del embalse y de igual forma si no se le da una adecuada desinfección en el proceso de potabilización al agua que es extraída del mismo, puede llegar a ocasionar una problemática en la salud de los consumidores.

Respecto al funcionamiento de las IFM se mostró una disminución en el número de aislamientos después de que pasa el agua por las IFM, en el área de Amanalco no fue muy evidente la disminución de aislamientos debido a que hubo un número menor de estructuras flotantes de IFM para dicho efluente.

Sería entonces muy satisfactorio que los efluentes de aguas contaminadas fueran tratadas antes de ser arrojados a los cuerpos de agua receptores, o bien se implementen sistemas de depuración como las IFM, ya que estos permitirían reducir el contenido de microorganismos patógenos, así como el contenido de nutrientes necesarios para su persistencia en el medio acuático (Rodríguez, 1987). Cabe señalar que después de varios años no se habían realizado aislamientos ambientales de este microorganismo en el embalse, sólo se tenían reportados los de un estudio anterior en el cual los aislamientos provenían de peces de la localidad de Valle de Bravo realizado por Pulido en el año de 1997.

9. CONCLUSIONES

- La mayor contaminación por coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) se presentó en el efluente del río Tizates.

- Los números de CT y CF, en las estaciones de los ríos Tizates y Amanalco sobrepasaron los límites permisibles de las normas oficiales mexicanas.
- El sistema de IFM presenta un probable efecto de depuración por lo que se deberían continuar con la implementación de estos sistemas en VB.
- Se determinó la presencia de *Vibrio cholerae* en los efluentes tanto del Río Tizates como del Amanalco en el embalse de Valle de Bravo, México.
- De los genes de virulencia que se utilizaron para la prueba de PCR, sólo amplificó el gen *toxR* en las cepas de *V. cholerae* de los efluentes de los ríos Tizates y Amanalco.
- La presencia de fenotipos rugosos en las cepas aisladas de Valle de Bravo, México indican que *V. cholerae* presenta mecanismos de resistencia.
- En las cepas aisladas tanto de agua como de zooplancton, se presentó (β -hemolisis).
- Por antecedentes bibliográficos se conoce de la contaminación de la cuenca y de los cauces, sin embargo a la fecha no hay evidencia de acciones de saneamiento, ya que se pudo observar en los punto de muestreo la presencia de desechos sólidos y de basura que afectan la calidad de agua del embalse.
- La presencia de *V. cholerae* en VB hace del cuerpo de agua un posible vehículo de transmisión de la bacteria, que en condiciones propicias pudiera poner en riesgo a la población humana que vive en los alrededores.

10. RECOMENDACIONES

Para disminuir la mala calidad del agua y presencia de *V. cholerae* en el embalse de Valle de Bravo, México se recomienda:

- Concientizar a la población a través de campañas serias para proteger las fuentes de abastecimiento así como hacer un uso más eficiente del agua y descargar a drenajes o a sistema de tratamiento.
- Promover la investigación y el desarrollo de proyectos que busquen nuevas alternativas tecnológicas de tratamiento de aguas que sean de bajo costo y de

requerimientos sencillos de operación y mantenimiento aplicables a la cuenca en donde se localiza el embalse de VB.

- Establecer programas de monitoreo del cuerpo de agua y hacer seguimiento de la eficacia de los procesos de tratamiento para mantener limpio el sistema y garantizar la salud ambiental en la región.

11. REFERENCIAS

- Alvarez A, Rubiños JE, Gavi F, Alarcón JJ, Hernández E, Ramírez C, Mejía E, Pedrero F, Nicolás E, Salazar E, **Índice de calidad del agua en la cuenca del río Amajac, Hidalgo, México: Diagnóstico y Predicción.** ΦYTON. 2006; 75: 71-83.
- APHA-AWWA-WEF 1985. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington D.C.
- Barrera-Escorcia G, Wong-Chang I, Sobrino-Figueroa AS, Guzmán-García X, Hernández-Galindo F, Saavedra-Villeda F. **Estudio preliminar de Contaminación Bacteriológica en la laguna Pueblo Viejo, Veracruz, México.** Rev. Int. Contam. Ambient. 2004, 14 (2) 63-68.
- Borroto R, **Supervivencia de *Vibrio cholerae* O1 en agua dulce superficial y cólera endémico: una hipótesis geoecológica.** Rev. Panam Salud Pública. 1998, 4 (6) 371-373.
- Castañeda H ME, 2009. **Caracterización por métodos Moleculares de *Vibrio cholerae* aislados en México.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.
- Chávez-Alcántara A, Velázquez-Machuca M, Pimentel-Equihua JL, Venegas-González J, Montañez-Soto JL, Vázquez-Gálvez G. **Hidroquímica de las aguas superficiales de La Ciénega de Chapala e Índice de la Calidad de Agua.** Terra Latinoamericana. 2011, 29(1): 83-94.
- CNA-OAVM-DT-MEX-10-440-RF-CC. 2010. **Establecimiento de Islas Flotantes de Macrófitas en áreas con descargas no puntuales del Embalse de Valle de Bravo y evaluación de su efecto en la calidad del agua.** - Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM. Noviembre 2010.

- García GR, Taylor ML, Alfaro G, **Estudio bacteriológico del agua de consumo en una comunidad mexicana**. Bulletin of the Pan American Health Organization. 1982, 93 (2): 127-141.
- Ghosh C, Nandy RK, Dasgupta SK, Nair GB, Hall RH, Ghose AC. 1997. **A search for cholera toxin (CT), toxin coregulated pilus (TCP), the regulatory element *toxR* and other virulence factors in Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae***. Microb. Pathogen. 22: 199-208.
- Gutiérrez E, García J, Saldaña P, Moreno F, Sánchez M, López. 1992. **Colección manuales: Organización del Trabajo de Campo y Muestreo ambiental de *Vibrio cholerae***. Vol. 4. 2ª Ed. IMTA. México.
- Guzmán-Quintero A, Palacios-Vélez OL, Carrillo-González R, Chávez-Morales J, Nikolskii-Gavrilov L, **La contaminación del agua superficial en la cuenca del Río Texcoco, México**. Agrociencia. 2007, 41: 385-393.
- Hoshino, K., Yamasaki, S., Mukhopadhyay, A. K., Chakraborty, S., Basu, A., Bhattacharya, S. K., Nair, G. B., Shimada, T. & Takeda, Y. 1998. **Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139**. FEMS Immunol Med Microbiol **20**, 201–207.
- Karpér JB, Morris GJr., Levine MM, 1995. **Cholera**. Clin. Microbiol. Rev. 8 (1): 48-86.
- Luna F KA, 2006. **Aislamiento y caracterización serológica de *Vibrio cholerae*, aislado de la Planta de Tratamiento Cerro de la Estrella y de la raíz de lirio en los canales de Xochimilco**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.
- Isaac MA, Lezama DC, Eslava CA, Navarro OA, Cravioto QA. 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. 30: 17-22.
- Martínez-Romero M, Fonseca-Gómez K, Ortega-Sánchez JL, García-Luján C, **Monitoreo de la calidad microbiológica del agua en la cuenca hidrológica del Río Nazas, México**. QuímicaViva. 2009, 8 (1).

- Martínez PMA. 2003. **Frecuencia de aislamiento de *Vibrio sp.* en muestras de agua, ostión y sedimento de la laguna de Mecocacán, Tabasco, México.** Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Moreno J, Colín A, Vázquez O, **Remoción de fenoles, detergentes y coliformes presentes en aguas residuales por medio de irradiación.** Rev. Int. Contam. Ambient. 1992; 8 (1): 29-35.
- Morris J, Sztein M, Rice E, Nataro J, Losonsky G, Panigrahi P, Tacket C, Jonson J, ***Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans.** J. Infect. Dis. 1996; 174: 1364-8.
- Namihira-Santillán P, Barrera-Escorcia G, Márquez-García A, **Contaminación por bacterias fecales en el Lago Huayamilpas, México, D.F.** 2002; 12 (2): 129-136.
- NOM-001-SEMARNAT-1996. **Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.** Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de Los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- NOM-112-SSA1-1994. **Determinación de bacterias coliformes técnica del número más probable.** Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de Los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- NOM-181-SSA1-1998. **Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que deben cumplir las sustancias germicidas para tratamiento de agua, de tipo doméstico.** Diario Oficial de la Federación. Gobierno Constitucional de Los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- NOM-127-SSA-1-1994. **Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.** Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de Los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- Ramírez E, Robles E, Sainz MG, Ayala R, Campoy E, **Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México.** Rev. Int. Contam. Ambient. 2009, 25 (4): 247-255.

- Ramírez GP, Cortés MJ, Sánchez ChJ, Carlos HG. 1997. **Nicho ecológico de *Vibrio cholerae* en el ambiente acuático vs. Un estudio ambiental.** IMTA. México. 117pp.
- Ramírez-Pérez M, **Frecuencia de aislamiento de *Vibrio cholerae* spp; en muestras de agua, ostión y sedimento en la laguna de Mecoacán, Tabasco; México.** Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Rentería-Delmar, Guillermo-Cota, Rubén G. Comisión de la cuenca Amanalco. Valle de Bravo(2005).<http://www.cuencaamanalcovalle.org/index.php?obj=secciones&IdMostrar=115>. 06/mayo/2012.
- Rivera ING, Chun J, Huq A, Sack B, Colwell RR. 2001. **Genotypes associated with virulence in environmental isolated of *Vibrio cholerae*.** App. Environ. Microbiol. 67: 2421-2429.
- Rivera-Vázquez R, Palacios-Vélez OL, Chávez-Morales J, Belmont MA, Nikolskii-Gavrilov L, De la Isla de Bauer ML, Guzmán-Quintero A, Terrazas-Onofre L, Carrillo-González R, **Contaminación por coliformes y helmintos en los Ríos Texcoco, Chapingo y San Bernardino tributarios de la parte oriental de la cuenca del Valle de México.** Rev. Int. Contam. Ambient. 2007, 23 (2): 69-77.
- Rodríguez SH, Botello VA, **Contaminación enterobacteriana en la red de agua potable y en algunos sistemas acuáticos del sureste de México.** Rev. Int. Contam. Ambient. 1987; 3: 37-56.
- Rosas I, Cravioto A, Ezcurra E, **Microbiología ambiental.** 1ª. ed. México. INE-SEMARNAT. 2004. 47- 61. ISBN: 968-817-707-5.
- Sánchez P, **Manual de métodos de aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en agua.** 1991. CETESB. Sao Paulo, Brasil. 90 p.
- Sánchez-Pérez HJ, Vargas-Morales MG, Méndez-Sánchez JD, **Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas.** Salud pública de México. 2000, 42 (5): 397-405.
- Solís S GA, 2005. **Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* de los canales de Xochimilco.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.

Maribel Ariana Granados Mondragón

Vega M, Jiménez M, Salgado R, Pineda G, **Determinación de bacterias de origen fecal en hortalizas cultivadas en Xochimilco de Octubre de 2003 a Marzo de 2004**. Investigación Universitaria Multidisciplinaria. 2005, 4: 21-25.

Anexo I

Tabla 4. CT (NMP/100 mL) reportados para las estaciones Centro, Cortina y efluentes de los Ríos Tizates y Amanalco.

COLIFORMES TOTALES (NMP/100 mL)										
Mes		Estación								
Año		Centro	Cortina	Tizates I	Tizates II	Tizates III	Amanalco I	Amanalco II	Amanalco III	PROMEDIO
2010	FEB	5.4x10 ²	3.5x10 ⁴	3.5x10 ⁵	1.7x10 ⁴	9.2x10 ⁴	*	*	*	9.9x10 ⁴
	MAR	13	5.4x10 ²	7.9x10 ⁴	1.6x10 ⁴	5.4x10 ²	*	*	*	1.9x10 ⁴
	ABR	1.3x10 ²	2.3x10 ²	1.7x10 ⁴	1.7x10 ⁴	5.0x10 ³	*	*	*	7.9x10 ³
	MAY	24	8	1.0x10 ³	6.0x10 ²	80	*	*	*	3.4x10 ²
	JUN	9	30	1.0E+03	1.0x10 ²	2.0x10 ²	9.0x10 ²	35	54	2.9x10 ²
	JUL	1.7x10 ²	2.8x10 ²	1.3x10 ⁴	4.9x10 ³	3.5x10 ³	9.2x10 ⁴	2.4x10 ³	7.9x10 ²	1.5x10 ⁴
	AGO	49	1.8x10 ²	1.1x10 ³	2.4x10 ³	2.4x10 ³	2.8x10 ²	9.2x10 ²	1.6x10 ³	1.1x10 ³
	SEP	79	1.1x10 ²	5.4E+02	7.0x10 ²	8.0x10 ²	2.3x10 ²	2.7x10 ²	1.7x10 ²	3.6x10 ²
	OCT	79	3.5x10 ²	5.4x10 ⁴	2.4x10 ⁴	1.3x10 ³	3.3x10 ²	1.3x10 ²	1.7x10 ²	1.0x10 ⁴
	NOV	5	70	5.4x10 ²	9.2x10 ²	3.5x10 ²	35	11	30	2.4x10 ²
2011	ABR	1.7x10 ³	8.0x10 ³	7.9x10 ⁶	3.9x10 ⁴	3.3x10 ⁴	N.D.	N.D.	2.2x10 ⁴	1.0x10 ⁶
	MAY	7.0x10 ²	1.7x10 ³	7.0x10 ²	N.D.	79	49	N.D.	79	4.0x10 ²
	JUN	76	68	1.0x10 ³	1.0x10 ²	92	N.D.	N.D.	9.2x10 ⁴	1.2x10 ⁴
	PROMEDIO	2.7x10 ²	3.6x10 ³	6.5x10 ⁵	9.4x10 ³	1.1x10 ⁴	1.0x10 ⁴	4.2x10 ²	1.3x10 ⁴	

* El efluente del río Amanalco se comenzó muestrear apartir de junio de 2010, por lo que en dichos espacios no hay cuentas de coliformes. N.D. No se determinó.

Tabla 5. CF (NMP/100 mL) reportados para las estaciones Centro, Cortina y efluentes de los Ríos Tizates y Amanalco.

		COLIFORMES FECALES (NMP/100 mL)								
		Mes	Estación							
Año		Centro	Cortina	Tizates I	Tizates II	Tizates III	Amanalco I	Amanalco II	Amanalco III	PROMEDIO
2010	FEB	46	1.7x10 ⁴	3.5x10 ⁵	2.7x10 ³	2.8x10 ⁴	*	*	*	8.0x10 ⁴
	MAR	23	3.5x10 ²	4.9x10 ⁴	3.5x10 ³	5.4x10 ²	*	*	*	1.1x10 ⁴
	ABR	20	20	1.3x10 ⁴	2.2x10 ³	5.0x10 ³	*	*	*	4.0x10 ³
	MAY	6	2	1.0x10 ³	6.0x10 ²	60	*	*	*	3.3x10 ²
	JUN	9	3	1.0x10 ³	1.0x10 ²	1.0x10 ²	9.0x10 ²	35	24	2.7x10 ²
	JUL	1.4x10 ²	2.8x10 ²	4.9x10 ³	4.9x10 ³	3.5x10 ³	3.5x10 ⁴	5.4x10 ³	80	6.8x10 ³
	AGO	49	2.2x10 ²	1.1x10 ³	2.4x10 ³	2.4x10 ³	2.2x10 ²	9.2x10 ²	1.6x10 ³	1.1x10 ³
	SEP	23	79	2.2x10 ²	4.9x10 ²	8.0x10 ²	1.3x10 ²	20	2.1x10 ²	2.5x10 ²
	OCT	49	1.7x10 ²	5.4x10 ⁴	2.4x10 ⁴	7.9x10 ²	1.3x10 ²	60	1.7x10 ²	9.9x10 ³
	NOV	4	1	2.2x10 ²	9.2x10 ²	3.5x10 ²	24	6	20	1.9x10 ²
2011	ABR	1.7x10 ³	8.0x10 ³	1.3x10 ⁶	2.6x10 ⁴	5.0x10 ²	N.D.	N.D.	1.4x10 ⁴	1.7x10 ⁵
	MAY	23	94	7.0x10 ²	79	6.0x10 ³	23	N.D.	13	8.7x10 ²
	JUN	76	7	1.0x10 ²	92	1.0x10 ²	1.0x10 ³	9.0x10 ³	9.2x10 ⁴	1.3x10 ⁴
	PROMEDIO	1.7x10 ²	2.0x10 ³	1.4x10 ⁵	5.2x10 ³	3.7x10 ³	4.2x10 ³	1.7x10 ³	1.2x10 ⁴	

* El efluente del río Amanalco se comenzó muestrear apartir de junio de 2010, por lo que en dichos espacios no hay cuentas de coliformes. N.D. No se determinó.

Tabla 6. Promedios mensuales de los parámetros realizados en las estaciones de muestreo.

PROMEDIOS MENSUALES DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES				
	Temp del agua (°C)	pH (unidad)	O.D. (mg L⁻¹)	DBO₅
Tizates I	23.0	8.6	7.45	3.13
Tizates II	22.9	8.6	7.63	2.55
Tizates III	23.0	8.7	8.06	2.49
Cortina	21.9	8.8	8.07	1.96
Centro	22.2	8.8	8.17	1.92
Amanalco I	22.2	8.4	8.40	2.33
Amanalco II	23.0	8.8	8.87	2.83
Amanalco III	23.5	8.8	8.44	2.68

Anexo II

MEDIO DE TRANSPORTE AMIES

Tioglicolato de sodio	1.5 g
Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na ₂ HPO ₄)	1.1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar bacteriológico	4.0 g
Agua destilada	991 mL

Preparación:

Pesar 12.6 g de medio deshidratado AMIES y agregar 991 mL de agua destilada fría dejándolo en reposo durante aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta disolverlo completamente y sin llegar a la temperatura de ebullición. Estabilizar en baño maría a 50°C. Agregar asépticamente 9 mL de una solución de cloruro de calcio al 1% (estéril). Homogenizar y estabilizar el medio en vapor efluente durante 15 min o en baño maría, dejando el recipiente medio abierto, cerrándolo inmediatamente después de esterilizarlo y se ajusta el pH a 8.8 con hidróxido de sodio 1N. Distribuir asépticamente 300 mL en bolsas plásticas de 20 L. Sellar y almacenar en la oscuridad a una temperatura de 2 a 8°C.

Agua peptonada alcalina (APA)

Concentración simple

Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 8.8 ± 0.2 a 25°C	

Concentración doble

Peptona	20.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	20.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 8.8 ± 0.2 a 25°C	

Preparación:

Pesar la peptona y el cloruro y agregar 1000 mL de agua destilada, calentar agitando frecuentemente hasta que el medio se disuelva completamente, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 50 mL en matraces de 125 mL. Ajustar el pH y esterilizar a 121°C durante 15 min.

Anexo III. Secuencia de genes de virulencia (*V. cholerae*) utilizadas para el análisis.

Nombre Oligo	Secuencia	Número de bases	Temperatura de lineamiento	Tiempo de extensión	Referencia
			°C	min	
<i>ctxA-F</i>	CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G	22	60	1	Rivera et al 2001
<i>ctxA-R</i>	CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC	23	60	1	Rivera et al 2001
<i>Tox-F</i>	CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C	22	60	1	Rivera et al 2001
<i>Tox-R</i>	AGG GTT AGC AAC GAT GCG TAA G	22	60	1	Rivera et al 2001
<i>tcpA-F</i>	CAC GAT AAG AAA ACC GGT CAA GAG	24	60	1	Rivera et al 2001
<i>tcpA-ET-R</i>	CGA AAG CAC CTT CTT TCA CGT TG	23	60	1	Rivera et al 2001
<i>tcpA-CL-R</i>	TTA CCA AAT GCA ACG CCG AAT G	22	60	1	Rivera et al 2001
<i>hlyA-ET-F</i>	GGC AAA CAG CGA AAC AAA TAC C	22	60	1	Rivera et al 2001
<i>hlyA-ET/CL-F</i>	GAG CCG GCA TTC ATC TGA AT	20	60	1	Rivera et al 2001
<i>hlyA-R</i>	CTC AGC GGG CTA ATA CGG TTT A	22	60	1	Rivera et al 2001
O139-F	AGC CTC TTT ATT ACG GGT GG	20	55	1	Hoshino et al 1998
O139-R	GTC AAA CCC GAT CGT AAA GG	20	55	1	Hoshino et al 1998
O1-F	GTT TCA CTG AAC AGA TGG G	19	55	1	Hoshino et al 1998
O1-R	GGT CAT CTG TAA GTA CAA C	19	55	1	Hoshino et al 1998