UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *Vibrio cholerae* AISLADO DE ZOOPLANCTON DE LOS CANALES DE XOCHIMILCO, D. F., EN EL AÑO 2005

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA:

ALAN GERARDO ROLDÁN BLANCAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.

2014

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 mi director de tesis, el **Dr. Pedro Ramírez García**, por recibirme en su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo de trabajo, pero sobre todo por nunca frenar mi conocimiento.

Al **Dr. Carlos Alberto Eslava Campos**, del laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina, por su apoyo incondicional tanto moralmente como en la realización de este trabajo, pero sobre todo le agradezco por ser un gran ejemplo para mí no sólo académicamente, si no como persona.

A la **M. en C. María Dolores Hurtado Bocanegra**, porque usted me inspiró a seguir el camino en el que ahora ando, por sus siempre acertadas enseñanzas tanto académicas como personales, pero sobre todo por brindarme su amistad.

A la **M. en C. Martha Gaytan Herrera** por su minuciosidad en la revisión y realización de este trabajo, sus múltiples enseñanzas académicas, pero más aún por siempre impulsarme a seguir adelante y tener esas palabras de aliento cuando llegaban a mí momentos de frustración.

A la **Dra. Nandini Sarma** por sus acertadas observaciones sobre el trabajo.

Al **Dr. Armando Navarro Ocaña** y al laboratorio de Bacteriología del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su ayuda en la tipificación serológica.

Al **Dr. Ulises Hernández Chiñas**, por su ayuda en la estandarización de la técnica de PCR.

A **Victor Adrián Gallardo Gómez** por su trabajo en la elaboración del mapa.

A **Lourdes Estrada "Lula"**, por las interminables charlas que amenizaban mi día, pero sobre todo por haberme recibido con tanto cariño y hacerme sentir como en casa.

A la **Biol. Saharay Cruz Miranda** por sus enseñanzas en el aula y por sus consejos tanto en mi vida académica como personal, es usted una gran amiga.

A mis amigas y compañeras **Karina Julián y Jessica Merino** del laboratorio de Bacteriología del proyecto CyMA-UIICSE gracias por permitirme entrar en sus vidas y confiar en mí para orientarlas en sus proyectos.

A todos los porfesores que he tenido en mi vida, sin duda me han dejado alguna enseñanza y son parte fundamental de la persona que ahora soy.

A todos ustedes MUCHAS GRACIAS

.

Dedicatoria

A mi mamá **Luz Raquel Blancas Ramírez**, a ti más que a nadie le dedico este trabajo, gracias por ser el pilar de mi vida, por ser tan luchona y demostrarme que cuando se quiere, no hay imposibles. Eres la persona que más admiro, gracias por tu amor incondicional y ser siempre ese hombro en el que he podido recargarme a lo largo de estos 22 años. Porque gracias a ti soy quien soy, recuerda que en cada triunfo mío es tuyo también. No alcanzan las palabras para expresar lo agradecido que estoy contigo así que simplemente te diré que eres la mejor, te amo.

A mi abuelo **Carlos Blancas Gómez,** porque sé que tú, al igual que yo, estarías disfrutando este logro, tu confianza en mis capacidades me impulsó a salir adelante, Siempre me harás falta, te quiero mucho.

A mi hermana, **Jacqueline Valeria Garrido Blancas**, por ser mi amiga, mi cómplice, mi confidente, mi chicote, por siempre apoyarme y estar ahí para mí. Con mucho orgullo puedo decir que gran parte de lo que soy ahora te lo debo a ti ¡**muchas gracias!** este triunfo también es tuyo ¡te quiero mucho "manita"!.

A mis sobrinas **Rachel, Andrea y… al pequeñito que viene en camino**, espero que este trabajo les motive a nunca detenerse, gracias por siempre recibirme con un beso, un abrazo o un simple "¡Tío Alan!" que me hiciera el día. Ustedes son mi inspiración para ser mejor cada día. Las quiero mucho.

A mi hermano **Edgar Alberto Garrido Blancas** y mi tío **Antonio Carlos Blancas Ramírez** porque siempre estuvieron ahí para mí. Los quiero.

A todos mis compañeros del **grupo 53** de la generación **2010 de Biología**, por su confianza ciega y por acompañarme en este largo viaje.

A mis amigos **Alejandra Angel, Gabriela Morales, Graciela Ramos, Diana Medina., Mahelet Lozada, Mauricio Santiago, Daniel Sánchez, Daniel Castillo, Francisco Amador y Moisés Crùz**. ¿Qué hubiera sido de mi vida académica sin ustedes? Gracias por soportar mi carácter, pero más que eso, gracias porque ustedes me ayudaron a ser mejor persona, incluso sin que se dieran cuenta, sin duda son como mi segunda familia.

A mis "tutorados" **Javier Alonso Carrillo Longoria, Carolina Rodríguez Ibarra y Luis Adrian Sumano Hernández** porque ustedes me enseñaron de lo que puedo ser capaz, gracias por confiar en mí para resolver sus dudas. Espero pronto verlos concluir sus metas. ¡No se rindan!.

A la memoria de mi abuelo

Carlos Blancas Gómez

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.

(Mahatma Gandhi)

Índice

	Pág.
Resumen	
1. Introducción…….....	1
1.1 *Vibrio cholerae* ……	1
1.2 Factores de virulencia ..……	2
1.3 Epidemiología de *Vibrio cholerae* …….....	4
1.4 La ecología de *Vibrio cholerae* y su relación con el zooplancton ……..	6
2. Antecedentes……..	8
2.1 Internacionales ……	8
2.2 Nacionales ……..	9
3. Justificación ……..	11
4. Objetivos……...	13
5. Material y **M**étodos ……	14
5.1 Área de estudio……	14
5.2 Muestras y fisicoquímicos del agua ..……	14
5.3 Recuperación y evaluación de los aislados……	16
5.4 Tipificación serológica ……	16
5.5 Capacidad hemolítica y formación de biopelículas ……..	17
5.6 Identificación de genes de virulencia ……..	18
5.7 Confirmación de vibriones e Identificación de zooplancton ……	19
5.8 Análisis estadístico ……..	21
6. Resultados ……..	19
6.1 Recuperación y evaluación de los aislados de de *Vibrio cholerae*……	20
6.2 Tipificación serológica ……	20
6.3 Capacidad hemolítica y formación de biopelículas ……	22
6.4 Identificación de genes de virulencia ……...	24
6.5 Confirmación de virbiones e identificación de zooplancton ……..	24
6.6 Fisicoquímicos del agua ……..	26
6.7 Análisis estadístico ……	30
7. Discusión ……	34
8. Conclusiones ……..	39
9. Literatura **C**itada……	41
10. Anexos ……	47
10.1 Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de zooplancton……..	47
10.2 Medios de Cultivo……..	48
10.3 Mezclas de reacción para la detección de genes de virulencia de *Vibrio cholerae*……..	49

Índice De Cuadros Y Figuras

Cuadros

		Pág.
Cuadro 1.	Coordenadas de ubicación de los sitios de muestreo……..	16
Cuadro 2.	Características de los oligonucleótidos utilizados para la identificación de genes de virulencia……..…	18
Cuadro 3.	Condiciones del termociclador……..…	19
Cuadro 4.	Distribución de los serogrupos por sitio de muestreo……..……	22
Cuadro 5.	Distribución del Zooplancton a lo largo de los meses de muestreo…….....	25
Cuadro 6.	Frecuencia de serogrupos por mes de muestreo……..……	32
Cuadro 7.	Frecuencia de las características fenotípicas y genotípicas de *V. cholerae* aislado de zooplancton en los años 2005 y 2006……...	33

Figuras

		Pág.
Figura 1.	Mapa con la ubicación de los sitios de muestreo……..……	15
Figura 2.	Crecimiento de *Vibrio cholerae* en agar TCBS, colonias amarillas debido a la acidez producto de la fermentación de la sacarosa……...	20
Figura 3.	Numero de serogrupos encontrados por sitio de muestreo……..	21
Figura 4.	Hemólisis tipo beta generada por aislados de *Vibrio cholera.* Izquierda reverso de la caja, derecha vista frontal del crecimiento……...	23
Figura 5.	Formación de Biopelículas por parte de una cepa O27 en agar sangre, se amplifican las colonias rugosas típicas de esta formación……...	23
Figura 6.	Electroforesis en gel de agarosa (1.2%)……..	24
Figura 7.	Integrantes del Zooplancton identificados. A) Organismo del orden Ciclopoyda juvenil. B) Ciclopoyda macho. C) *Alona sp.* (Cladócera). D) *Bosmina sp.* (Cladócera……..	25
Figura 8.	Organismo del orden Cyclopoida teñido con DAPI, se observan los vibriones en su caparazón……...	26
Figura 9.	Concentraciones de oxígeno disuelto en los sitios de muestreo……..	27
Figura 10.	Concentración de oxígeno disuelto producto de la demanda bioquímica de oxígeno……..……..……	27
Figura 11.	Concentración de clorofila-a a lo largo del estudio…….....	28
Figura 12.	Registros de temperatura del agua de Xochimilco en los años 2005 y 2006……..	29
Figura 13.	pH registrado en los canales de Xochimilco en los años 2005 y 2006…….....	29
Figura 14.	Conductividad eléctrica del agua de Xochimilco en los diferentes puntos de muestreo……..……	30
Figura 15.	Análisis de correspondencia canónica realizado con el software CANOCO (Versión 4.5)……..	31

Resumen

El cólera es una enfermedad diarreico-infecciosa causada por la bacteria *Vibrio cholerae*, microorganismo típicamente hidrotransmisible de origen marino/estuarino que ha cobrado un gran número de vidas al ser causante de 7 pandemias y diversas epidemias. A diferencia de otros agentes bacterianos, tiene la capacidad de permanecer en el cuerpo de agua durante largos periodos interepidémicos gracias a diversas estrategias, como la formación de biopelículas o su adhesión y colonización de integrantes del zooplancton. El presente trabajo tuvo como objetivo tipificar fenotípicamente y genotípicamente aislamientos de *Vibrio cholerae*, provenientes del zooplancton de Xochimilco, D.F. en el año 2005 así como la identificación del serogrupo al que pertenecen. Se buscó relacionar los serogrupos encontrados con la composición zooplanctónica y variables físico-químicas y ambientales (Conductividad, pH, temperatura, DBO_5 y Oxígeno disuelto y clorofila-a) del sitio. Se tipificaron 155 aislamientos, encontrando 21 serogrupos NoO1/NoO139 siendo O135 y O127 los más frecuentes. Se obtuvo que la mayoría de las cepas (93.28%) presentaron hemólisis completa, un bajo porcentaje de las mismas (26.87%) la capacidad de formar biopelículas y en cuanto a la identificación de genes de virulencia, se observó la presencia de los genes *hlyA y toxR* en el 89.55% *y* 82.84% de las cepas respectivamente. Se identificó a los copépodos en mayor abundancia que cladóceros, además mediante la tinción con DAPI y se observaron bacilos curvos adheridos a los mismos. El análisis de correspondencia canónica, reflejó una estrecha relación entre las variaciones fisicoquímico-ambientales y la migración de *V. cholerae* a integrantes del zooplancton siendo la temperatura y la cantidad de materia orgánica presente en el agua las determinantes para la mayoría de los serogrupos. Se obtuvieron 10 registros serológicos nuevos para Xochimilco y 6 para México. Las condiciones fisicoquímicas y ambientales del sitio de estudio permiten la permanencia de la bacteria tanto como organismo de vida libre como para su adherencia al zooplancton, sin embargo son las variaciones en las mismas las que determinan la adhesión. La producción de hemolisinas, la capacidad de formación de biopelículas, y la presencia del regulador de la toxina colérica, hace de los aislados asociados a zooplancton un organismo potencialmente patógeno, siendo los serogrupos O135, O127 y O35 quienes presentaron la dominancia en todas las características, por lo que se sugiere profundizar en los estudios con éstos por su posible importancia epidemiológica.

1. Introducción

El agua es uno de los recursos naturales fundamentales para mantener la vida dentro de la Tierra, además de ser uno de los cuatro recursos básicos en que se apoya el desarrollo de cualquier país junto con el aire, la tierra y la energía (Nebel, 1999). Sin embargo, por el mal manejo que se hace de la misma, se ha visto relacionada con enfermedades debido a que puede albergar una gran cantidad de microorganismos, muchos de ellos patógenos, tales como virus, hongos y bacterias (Jiménez, 2001).

Se han descrito un gran número de enfermedades en las que el agua se encuentra relacionada de manera directa o indirecta, siendo muchas de ellas de gran importancia en términos de mortalidad y morbilidad (Díaz, 2003). Particularmente diversos integrantes de la biota bacteriana acuática pueden producir enfermedades gastrointestinales que pueden transmitirse de múltiples formas e introducirse en nichos diferentes y, con el paso del tiempo, colonizar los mismos. Tal es el caso de *Vibrio cholerae,* bacteria de origen marino que también se encuentra en aguas medianamente salinas, típicas de estuarios y pantanos costeros, el cual es responsable de causar la enfermedad llamada “Cólera” (Drasar y Forrest, 1996). El cólera es una enfermedad diarreico-infecciosa, produce evacuaciones acuosas que pueden desencadenar una deshidratación severa y culminar en la muerte; ha cobrado un gran número de vidas debido a que ha sido causante de siete pandemias y diversas epidemias (Sánchez et al, 2000).

1.1 Vibrio cholerae

Vibrio cholerae es un bacilo curvo, gramnegativo, con una longitud aproximada de 1.4-2.6µm, no esporulado, móvil mediante un flagelo polar, presenta metabolismo anaerobio facultativo y es oxidasa positivo. Fermenta la glucosa, sacarosa y el manitol. Su crecimiento se estimula con la presencia de iones sodio por lo tanto, se le considera halofílico, además de ser susceptible a la desecación, la ebullición, el cloro y a antibióticos como la tetraciclina (Giono y Arellano, 2010).

Expresa dos antígenos, el flagelar (H) que es igual en todos los miembros de la especie y el antígeno somático (O) o lipopolisacárido, que de acuerdo a las variaciones en su composición glucídica se pueden clasificar en diferentes serogrupos. En la actualidad se han descrito más de 200 variedades antigénicas de la bacteria, aunque, únicamente los serogrupos O1 y O139 son responsables de las epidemias de cólera, existen reportes de la participación de otros serogrupos en la etiología de enfermedades gastrointestinales menos graves (Sakazaki, 1992). Dentro del serogrupo O1 existen dos biotipos, el Clásico y El Tor, que se diferencian entre sí bioquímicamente y porque el segundo no produce hemolisinas y por lo tanto es menos virulento; estos a su vez se dividen en tres serotipos con base en la composición del antígeno somático: Ogawa (AB), Inaba (AC) e Hikojima (ABC) (Mata, 1992).

V. cholerae reside habitualmente en aguas marinas y continentales, encontrando las condiciones óptimas en sitios con niveles moderados de salinidad, alto contenido de nutrientes, temperaturas cálidas y pH neutro o ligeramente alcalino. Bajo estas condiciones, *Vibrio* puede encontrarse como un organismo autóctono y de vida libre (Borroto, 1997).

1.2 Factores de virulencia

El proceso Infeccioso causado por *Vibrio cholerae* es multifactorial involucrando varios genes que expresan factores de colonización que le permiten establecerse y colonizar el epitelio intestinal del hospedero. Con anterioridad se creía que todos los factores de virulencia formaban parte del genoma bacteriano pero estudios recientes han demostrado que algunos son parte del genoma de fagos filamentosos que entran a la bacteria mediante transducción (Eslava et al., 2008; Fernández y Alonso, 2009).

Algunos de los factores relacionados con la virulencia de *Vibrio cholerae* son:

1) Toxina Colérica (TC): Toxina termolábil que en el hospedero altera el transporte activo de electrolitos a través de la membrana celular impidiendo la adsorción de líquidos y la secreción de ellos por el intestino delgado. Dicha toxina está compuesta por dos subunidades: A y B (en proporción 1A:5B), que son codificadas por los genes *ctxA* y *ctxB* respectivamente, que a su vez son parte del operón *ctxAB* que forma parte del genoma del bacteriófago filamentoso CTXØ el cual una vez lisogenizado en la bacteria puede integrarse al cromosoma o quedarse en forma de plásmido (Fernández y Alonso, 2009).

2) Toxina Zonula occludens (Zot): codificada por el gen *zot*, aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal rompiendo las uniones estrechas (*zona occludens*) que mantienen a las células de la mucosa unidas y preservan la integridad de la membrana. Estas uniones actúan como una barrera para que los iones no puedan atravesar directamente por lo que tienen que ser transportados a través de la membrana celular del enterocito mediante bombas específicas. La toxina Zot destruye estas uniones y no sólo permite la fuga del contenido luminal sino que también altera el equilibrio iónico, ocasionando el cuadro de diarrea (Castañeda, 2009).

3) Hemaglutinina/proteasa: codificada por *hapA*, es una metaloproteasa que actúa sobre las proteínas asociadas a la *zona occludens*, si bien no es un factor esencial de virulencia, es necesaria para la expresión total de la enterotoxicidad (Fernández y Alonso, 2009).

4) Pili corregulado por toxina (TCP): Es un tipo de pili que está involucrado en la adherencia específica de *Vibrio cholerae* a la mucosa intestinal además de que se ha comprobado que es el receptor del fago CTXØ. La proteína estructural de este pili se encuentra codificado en el gen *tcpA* (Karolis et al. 1999; Silva, 2005).

5) Citolisinas (hemolisinas): codificada por el gen *hlyA,* como su nombre lo indica tiene capacidad hemolítica, pero además se ha comprobado su capacidad citotóxica y cardiotóxica. Por otra parte, esta proteína es biológica, fisicoquímica e inmunológicamente indistinguible en todas las cepas, sugiriendo que contribuye en el desarrollo de la gastroenteritis generada por cepas que carecen de los genes codificantes para la toxina colérica (Castañon, 2005)

6) Regulón *toxR-toxT*: Si bien no es un factor de virulencia, es determinante para la expresión de la toxina colérica (TC), TCP y de por lo menos 17 genes más involucrados con el proceso de virulencia de *Vibrio cholerae* (Eslava, 2008).

1.3 Epidemiología de *Vibrio cholerae*

En los siglos recientes, *V. cholerae* ha llamado la atención por ser la causante de 7 pandemias, cobrando una gran cantidad de vidas, presentándose la última en el año 1991 y a pesar de que han pasado más de 20 años, existen países como Cuba en los que la enfermedad no cesa (González, 2011).

La primera pandemia tiene su origen en Calcuta (1817-1824), a partir del festival tradicional Kumbh, celebrado en el delta del río Ganges. La enfermedad se propagó a toda la India y se estima que ocasionó cientos de miles de muertes, desde ahí se extendió por Rusia y Europa del Este y para el año 1827 se presentan los primeros casos en Europa Occidental (Lafuente, 2006).

La segunda pandemia fue considerada como la más devastadora. Tuvo lugar entre 1826 y 1837, extendiéndose a prácticamente toda Europa, Asia, Africa y hace su aparición por primera vez en el continente Americano, afectando gran parte de E.U.A. y apareciendo los primeros casos en México en el año 1833 (Lafuente, 2006; Castañeda, 2009).

Para el año 1848 se presenta la tercera pandemia llevando el cólera a Grecia y Turquía, a México llega el 23 de diciembre de 1848, sin embargo la enfermedad se mantuvo endémica en el estado de Sonora, donde se presentaron algunos brotes entre abril de 1849 y finales de 1850, terminando la pandemia en el año 1862 (Castañeda, 2009). Es en esta época, en la que John Snow descubre que el agente etiológico de esta enfermedad es un microorganismo hidrotransmisible (Lafuente et al., 2006).

La cuarta pandemia (1864-1875) comenzó dos años después de que culminara la tercera, tuvo su origen en Bengal y se extendió a través de la India, alcanzando Bombay por la costa oeste y es por medio del tráfico de esclavos que llega a países del medio oriente y el golfo pérsico. Alcanza México a través de Sudamérica afectando personas en el sureste de México en el año 1864. Para entonces la enfermedad ya había alcanzado todo Sudamérica, afectando a Brasil en 1867 y Paraguay en 1869, teniendo una duración total de 11 años, concluyendo en 1875 (Hays, 2005; Castañeda, 2009).

Es durante la quinta pandemia (1881-1896) que Paccini descubre el agente etiológico del cólera al observar un gran número de bacterias curvas en el contenido intestinal de personas con esta patología y Robert Koch lo describe a partir de las heces acuosas de pacientes enfermos de cólera. Esta pandemia afectó de sobremanera Sudamérica, con un gran número de casos registrados en Argentina, Chile y Perú donde cobró muchas vidas (Lafuente et al., 2006; Castañeda, 2009).

La sexta pandemia (1899-1923) se origina en Bengal, afecta a Asia, Africa, el sudeste europeo y Rusia y se mantuvo ausente en los países europeos muy industrializados. En el año 1905 en una estación de cuarentena se aisló una cepa O1 diferente a la causante de las otras cinco pandemias y se le designó con el nombre El Tor y al primero como el clásico, ambos presentan características antigénicas similares pero se diferencian metabólicamente (Lafuente, et al., 2006).

Finalmente y para el año 1962 inicia la séptima pandemia en el sur de Asia, desde donde se disemina a otros continentes, apareciendo en América en el año 1991 cuando las investigaciones epidemiológicas mostraron que el agente causal fue nuevamente *Vibrio cholerae* O1-El Tor, sin embargo en 1992, en el sur de la India aparece una nueva clona epidémica que fue determinada como O139 y se comprobó que esta cepa era portadora del gen codificante para la toxina colérica (Castañeda, 2009).

1.4 La ecología de *Vibrio cholerae* y su relación con el zooplancton

A diferencia de otros agentes bacterianos causantes de enfermedades diarreicas, *V. cholerae* tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes acuáticos durante grandes periodos interepidémicos, gracias a que puede presentar dos comportamientos estrechamente relacionados con las condiciones de temperatura, pH y materia orgánica del ambiente (Sakazaki, 1992. Marrero y Fando, 2011). El primero se presenta cuando estas condiciones se ven disminuidas, la bacteria adopta un cambio morfológico, disminuyendo su tamaño (a dimensiones menores a 2µm) y reduciendo su metabolismo al mínimo, permaneciendo en un estado que se conoce como viable no cultivable (VNC); sin embargo si las condiciones se tornan favorables, *V. cholerae* recupera su estructura y metabolismo y permanece en el cuerpo de agua como organismo de vida libre sin perder los genes causantes de la toxicidad. El segundo comportamiento ocurre si las condiciones ambientales no son extremas, sucediendo todo lo contrario, en exceso favorables y la bacteria adopta una forma “epibionte” en la cual se adhiere mediante la elaboración de biofilms a integrantes tanto del zooplancton como del fitoplancton e incluso a plantas superiores como la raíz de lirio (Eslava, 2008).

En episodios de estrés, las formas viables pero no cultivables de *V. cholerae* se adhieren a ciertos organismos para utilizarlos como reservorios, siendo los artrópodos (crustáceos e insectos) el grupo más importante que cumple está función, ya que la quitina que forma su exoesqueleto es un sustrato apropiado para la adhesión, dado que la bacteria posé una enzima (Quitinasa) que degrada el exoesqueleto y le permite alojarse dentro del artrópodo (Locascio et al., 2010).

Este comportamiento sugiere una posible explicación sobre la emergencia de la bacteria y la permanencia de los genes de virulencia a lo largo de los siglos, postulando que el carácter endémico y estacional del cólera depende de la supervivencia de las cepas de *V. cholerae* virulentas en forma VNC en reservorios acuáticos durante episodios interepidémicos.

2. Antecedentes

2.1 Internacionales

Colwell y colaboradores en 1980, realizaron aislamientos de *Vibrio cholerae* a partir de muestras de plancton en agua de Bangladesh y de la Bahía de Chesapeake, sugiriendo una posible relación entre la quitina del plancton y la presencia de *V. cholerae.* Estos mismos aislamientos fueron utilizados por Huq et al. en 1983, montaron experimentos con los que lograron demostrar que esta bacteria se internaliza en copépodos mediante una enzima (Quitinasa), además establecieron que el tracto digestivo y el saco ovígero son los sitios de mayor almacenamiento.

En Suecia, Johnson y colaboradores realizaron en 1989 un estudio comparativo sobre el proceso infeccioso de *Vibrio cholerae* en un modelo animal y un cultivo celular, y determinan que la bacteria expresa antígenos de superficie durante el proceso infeccioso, mismos que no son expresados en un modelo *In vitro*, además reportan la similitud antigénica de cepas El Clásico y El Tor.

En 1990 en un estudio realizado en Bangladesh por Tamplin *et al.* se encontró que existe una relación entre *Vibrio cholerae*, el zooplancton y los factores físico-químicos. Al analizar muestras clínicas y ambientales identificaron cinco cepas diferentes de O1, de las cuales cuatro fueron encontradas en las mudas de copépodos, esto refuerza que la relación existente entre *V. cholerae* y el zooplancton es altamente importante para la comprensión de su ecología y epidemiología.

Shimada y colaboradores (1994) en Japón, publican un esquema para la serotipificación de *Vibrio cholerae* con 140 serogrupos y reportan la presencia de antígenos rugosos en esta bacteria.

En el año 1996 Huq y Colwell examinan los factores ambientales que generan la emergencia del cólera, encontrando que la luz del sol, la humedad, la

1. Introducción

El agua es uno de los recursos naturales fundamentales para mantener la vida dentro de la Tierra, además de ser uno de los cuatro recursos básicos en que se apoya el desarrollo de cualquier país junto con el aire, la tierra y la energía (Nebel, 1999). Sin embargo, por el mal manejo que se hace de la misma, se ha visto relacionada con enfermedades debido a que puede albergar una gran cantidad de microorganismos, muchos de ellos patógenos, tales como virus, hongos y bacterias (Jiménez, 2001).

Se han descrito un gran número de enfermedades en las que el agua se encuentra relacionada de manera directa o indirecta, siendo muchas de ellas de gran importancia en términos de mortalidad y morbilidad (Díaz, 2003). Particularmente diversos integrantes de la biota bacteriana acuática pueden producir enfermedades gastrointestinales que pueden transmitirse de múltiples formas e introducirse en nichos diferentes y, con el paso del tiempo, colonizar los mismos. Tal es el caso de *Vibrio cholerae,* bacteria de origen marino que también se encuentra en aguas medianamente salinas, típicas de estuarios y pantanos costeros, el cual es responsable de causar la enfermedad llamada “Cólera” (Drasar y Forrest, 1996). El cólera es una enfermedad diarreico-infecciosa, produce evacuaciones acuosas que pueden desencadenar una deshidratación severa y culminar en la muerte; ha cobrado un gran número de vidas debido a que ha sido causante de siete pandemias y diversas epidemias (Sánchez et al, 2000).

1.1 Vibrio cholerae

Vibrio cholerae es un bacilo curvo, gramnegativo, con una longitud aproximada de 1.4-2.6µm, no esporulado, móvil mediante un flagelo polar, presenta metabolismo anaerobio facultativo y es oxidasa positivo. Fermenta la glucosa, sacarosa y el manitol. Su crecimiento se estimula con la presencia de iones sodio por lo tanto, se le considera halofílico, además de ser susceptible a la desecación, la ebullición, el cloro y a antibióticos como la tetraciclina (Giono y Arellano, 2010).

Expresa dos antígenos, el flagelar (H) que es igual en todos los miembros de la especie y el antígeno somático (O) o lipopolisacárido, que de acuerdo a las variaciones en su composición glucídica se pueden clasificar en diferentes serogrupos. En la actualidad se han descrito más de 200 variedades antigénicas de la bacteria, aunque, únicamente los serogrupos O1 y O139 son responsables de las epidemias de cólera, existen reportes de la participación de otros serogrupos en la etiología de enfermedades gastrointestinales menos graves (Sakazaki, 1992). Dentro del serogrupo O1 existen dos biotipos, el Clásico y El Tor, que se diferencian entre sí bioquímicamente y porque el segundo no produce hemolisinas y por lo tanto es menos virulento; estos a su vez se dividen en tres serotipos con base en la composición del antígeno somático: Ogawa (AB), Inaba (AC) e Hikojima (ABC) (Mata, 1992).

V. cholerae reside habitualmente en aguas marinas y continentales, encontrando las condiciones óptimas en sitios con niveles moderados de salinidad, alto contenido de nutrientes, temperaturas cálidas y pH neutro o ligeramente alcalino. Bajo estas condiciones, *Vibrio* puede encontrarse como un organismo autóctono y de vida libre (Borroto, 1997).

1.2 Factores de virulencia

El proceso Infeccioso causado por *Vibrio cholerae* es multifactorial involucrando varios genes que expresan factores de colonización que le permiten establecerse y colonizar el epitelio intestinal del hospedero. Con anterioridad se creía que todos los factores de virulencia formaban parte del genoma bacteriano pero estudios recientes han demostrado que algunos son parte del genoma de fagos filamentosos que entran a la bacteria mediante transducción (Eslava et al., 2008; Fernández y Alonso, 2009).

Algunos de los factores relacionados con la virulencia de *Vibrio cholerae* son:

1) Toxina Colérica (TC): Toxina termolábil que en el hospedero altera el transporte activo de electrolitos a través de la membrana celular impidiendo la adsorción de líquidos y la secreción de ellos por el intestino delgado. Dicha toxina está compuesta por dos subunidades: A y B (en proporción 1A:5B), que son codificadas por los genes *ctxA* y *ctxB* respectivamente, que a su vez son parte del operón *ctxAB* que forma parte del genoma del bacteriófago filamentoso CTXØ el cual una vez lisogenizado en la bacteria puede integrarse al cromosoma o quedarse en forma de plásmido (Fernández y Alonso, 2009).

2) Toxina Zonula occludens (Zot): codificada por el gen *zot*, aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal rompiendo las uniones estrechas (*zona occludens*) que mantienen a las células de la mucosa unidas y preservan la integridad de la membrana. Estas uniones actúan como una barrera para que los iones no puedan atravesar directamente por lo que tienen que ser transportados a través de la membrana celular del enterocito mediante bombas específicas. La toxina Zot destruye estas uniones y no sólo permite la fuga del contenido luminal sino que también altera el equilibrio iónico, ocasionando el cuadro de diarrea (Castañeda, 2009).

3) Hemaglutinina/proteasa: codificada por *hapA*, es una metaloproteasa que actúa sobre las proteínas asociadas a la *zona occludens*, si bien no es un factor esencial de virulencia, es necesaria para la expresión total de la enterotoxicidad (Fernández y Alonso, 2009).

4) Pili corregulado por toxina (TCP): Es un tipo de pili que está involucrado en la adherencia específica de *Vibrio cholerae* a la mucosa intestinal además de que se ha comprobado que es el receptor del fago CTXØ. La proteína estructural de este pili se encuentra codificado en el gen *tcpA* (Karolis et al. 1999; Silva, 2005).

5) Citolisinas (hemolisinas): codificada por el gen *hlyA,* como su nombre lo indica tiene capacidad hemolítica, pero además se ha comprobado su capacidad citotóxica y cardiotóxica. Por otra parte, esta proteína es biológica, fisicoquímica e inmunológicamente indistinguible en todas las cepas, sugiriendo que contribuye en el desarrollo de la gastroenteritis generada por cepas que carecen de los genes codificantes para la toxina colérica (Castañon, 2005)

6) Regulón *toxR-toxT*: Si bien no es un factor de virulencia, es determinante para la expresión de la toxina colérica (TC), TCP y de por lo menos 17 genes más involucrados con el proceso de virulencia de *Vibrio cholerae* (Eslava, 2008).

1.3 Epidemiología de *Vibrio cholerae*

En los siglos recientes, *V. cholerae* ha llamado la atención por ser la causante de 7 pandemias, cobrando una gran cantidad de vidas, presentándose la última en el año 1991 y a pesar de que han pasado más de 20 años, existen países como Cuba en los que la enfermedad no cesa (González, 2011).

La primera pandemia tiene su origen en Calcuta (1817-1824), a partir del festival tradicional Kumbh, celebrado en el delta del río Ganges. La enfermedad se propagó a toda la India y se estima que ocasionó cientos de miles de muertes, desde ahí se extendió por Rusia y Europa del Este y para el año 1827 se presentan los primeros casos en Europa Occidental (Lafuente, 2006).

La segunda pandemia fue considerada como la más devastadora. Tuvo lugar entre 1826 y 1837, extendiéndose a prácticamente toda Europa, Asia, Africa y hace su aparición por primera vez en el continente Americano, afectando gran parte de E.U.A. y apareciendo los primeros casos en México en el año 1833 (Lafuente, 2006; Castañeda, 2009).

Para el año 1848 se presenta la tercera pandemia llevando el cólera a Grecia y Turquía, a México llega el 23 de diciembre de 1848, sin embargo la enfermedad se mantuvo endémica en el estado de Sonora, donde se presentaron algunos brotes entre abril de 1849 y finales de 1850, terminando la pandemia en el año 1862 (Castañeda, 2009). Es en esta época, en la que John Snow descubre que el agente etiológico de esta enfermedad es un microorganismo hidrotransmisible (Lafuente et al., 2006).

La cuarta pandemia (1864-1875) comenzó dos años después de que culminara la tercera, tuvo su origen en Bengal y se extendió a través de la India, alcanzando Bombay por la costa oeste y es por medio del tráfico de esclavos que llega a países del medio oriente y el golfo pérsico. Alcanza México a través de Sudamérica afectando personas en el sureste de México en el año 1864. Para entonces la enfermedad ya había alcanzado todo Sudamérica, afectando a Brasil en 1867 y Paraguay en 1869, teniendo una duración total de 11 años, concluyendo en 1875 (Hays, 2005; Castañeda, 2009).

Es durante la quinta pandemia (1881-1896) que Paccini descubre el agente etiológico del cólera al observar un gran número de bacterias curvas en el contenido intestinal de personas con esta patología y Robert Koch lo describe a partir de las heces acuosas de pacientes enfermos de cólera. Esta pandemia afectó de sobremanera Sudamérica, con un gran número de casos registrados en Argentina, Chile y Perú donde cobró muchas vidas (Lafuente et al., 2006; Castañeda, 2009).

La sexta pandemia (1899-1923) se origina en Bengal, afecta a Asia, Africa, el sudeste europeo y Rusia y se mantuvo ausente en los países europeos muy industrializados. En el año 1905 en una estación de cuarentena se aisló una cepa O1 diferente a la causante de las otras cinco pandemias y se le designó con el nombre El Tor y al primero como el clásico, ambos presentan características antigénicas similares pero se diferencian metabólicamente (Lafuente, et al., 2006).

Finalmente y para el año 1962 inicia la séptima pandemia en el sur de Asia, desde donde se disemina a otros continentes, apareciendo en América en el año 1991 cuando las investigaciones epidemiológicas mostraron que el agente causal fue nuevamente *Vibrio cholerae* O1-El Tor, sin embargo en 1992, en el sur de la India aparece una nueva clona epidémica que fue determinada como O139 y se comprobó que esta cepa era portadora del gen codificante para la toxina colérica (Castañeda, 2009).

1.4 La ecología de *Vibrio cholerae* y su relación con el zooplancton

A diferencia de otros agentes bacterianos causantes de enfermedades diarreicas, *V. cholerae* tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes acuáticos durante grandes periodos interepidémicos, gracias a que puede presentar dos comportamientos estrechamente relacionados con las condiciones de temperatura, pH y materia orgánica del ambiente (Sakazaki, 1992. Marrero y Fando, 2011). El primero se presenta cuando estas condiciones se ven disminuidas, la bacteria adopta un cambio morfológico, disminuyendo su tamaño (a dimensiones menores a 2µm) y reduciendo su metabolismo al mínimo, permaneciendo en un estado que se conoce como viable no cultivable (VNC); sin embargo si las condiciones se tornan favorables, *V. cholerae* recupera su estructura y metabolismo y permanece en el cuerpo de agua como organismo de vida libre sin perder los genes causantes de la toxicidad. El segundo comportamiento ocurre si las condiciones ambientales no son extremas, sucediendo todo lo contrario, en exceso favorables y la bacteria adopta una forma “epibionte” en la cual se adhiere mediante la elaboración de biofilms a integrantes tanto del zooplancton como del fitoplancton e incluso a plantas superiores como la raíz de lirio (Eslava, 2008).

En episodios de estrés, las formas viables pero no cultivables de *V. cholerae* se adhieren a ciertos organismos para utilizarlos como reservorios, siendo los artrópodos (crustáceos e insectos) el grupo más importante que cumple está función, ya que la quitina que forma su exoesqueleto es un sustrato apropiado para la adhesión, dado que la bacteria posé una enzima (Quitinasa) que degrada el exoesqueleto y le permite alojarse dentro del artrópodo (Locascio et al., 2010).

Este comportamiento sugiere una posible explicación sobre la emergencia de la bacteria y la permanencia de los genes de virulencia a lo largo de los siglos, postulando que el carácter endémico y estacional del cólera depende de la supervivencia de las cepas de *V. cholerae* virulentas en forma VNC en reservorios acuáticos durante episodios interepidémicos.

2. Antecedentes

2.1 Internacionales

Colwell y colaboradores en 1980, realizaron aislamientos de *Vibrio cholerae* a partir de muestras de plancton en agua de Bangladesh y de la Bahía de Chesapeake, sugiriendo una posible relación entre la quitina del plancton y la presencia de *V. cholerae.* Estos mismos aislamientos fueron utilizados por Huq et al. en 1983, montaron experimentos con los que lograron demostrar que esta bacteria se internaliza en copépodos mediante una enzima (Quitinasa), además establecieron que el tracto digestivo y el saco ovígero son los sitios de mayor almacenamiento.

En Suecia, Johnson y colaboradores realizaron en 1989 un estudio comparativo sobre el proceso infeccioso de *Vibrio cholerae* en un modelo animal y un cultivo celular, y determinan que la bacteria expresa antígenos de superficie durante el proceso infeccioso, mismos que no son expresados en un modelo *In vitro*, además reportan la similitud antigénica de cepas El Clásico y El Tor.

En 1990 en un estudio realizado en Bangladesh por Tamplin *et al.* se encontró que existe una relación entre *Vibrio cholerae*, el zooplancton y los factores físico-químicos. Al analizar muestras clínicas y ambientales identificaron cinco cepas diferentes de O1, de las cuales cuatro fueron encontradas en las mudas de copépodos, esto refuerza que la relación existente entre *V. cholerae* y el zooplancton es altamente importante para la comprensión de su ecología y epidemiología.

Shimada y colaboradores (1994) en Japón, publican un esquema para la serotipificación de *Vibrio cholerae* con 140 serogrupos y reportan la presencia de antígenos rugosos en esta bacteria.

En el año 1996 Huq y Colwell examinan los factores ambientales que generan la emergencia del cólera, encontrando que la luz del sol, la humedad, la

temperatura y la presencia de fito y zooplancton intervienen en la supervivencia y reproducción de *V. cholerae.*

En 1997 Gosh et al. examinaron la presencia de los genes *ctxA, tcpA y toxR* asociados a la virulencia en cepas No-O1/No-O139, estos investigadores observaron que la mayoría de las cepas examinadas presentaban *toxR*.

Locascio y colaboradores (2010) realizaron un estudio en Argentina, con la intención de conocer los probables reservorios de *V. cholerae* en la cuenca Salí, analizando muestras de zooplancton en cuanto a su diversidad y a la presencia de la bacteria en su exoesqueleto, encontraron que la mayor diversidad se presenta en el grupo de los copépodos, en los que se observaron formas Viables pero no cultivables en los apéndices, reflejando una posible afinidad de esa forma de los vibrios a los sustratos quitinosos.

Mozumder *et al.* en 2012, realizó un listado de los diferentes integrantes del zooplancton en cuerpos de agua cercanos a costas en Bangladesh, para asociarlos con la presencia de *Vibrio cholerae,* encontrando una gran diversidad de protozoos y rotíferos. Sin embargo particularmente asocia a integrantes del orden Cyclopoida y Diplostraca con la presencia de *Vibrio cholerae.*

2.2 Nacionales

Portillo y Lizárraga en 1997 estudiaron la presencia de *Vibrio cholerae* O1 viable no cultivable en muestras de agua, sedimento, plancton y mejillón en la bahía Todos Santos, Baja California, México. Analizaron 52 muestras determinando que la mayor cantidad de aislados (44%) de tipo no O1 se llevó a cabo a partir del plancton.

Ramírez *et al* en 1995 determinaron el nicho ecológico de *Vibrio cholerae* en la laguna Mecoacán, Tabasco, así como su importancia epidemiológica, encontrando que *V. cholerae* O1 es endémico de ambientes salobres y que en esa laguna forma parte de la bacteriobiota; asimismo reporta que esta bacteria presenta una asociación con el plancton a una salinidad de hasta 21ppm.

En 2003 Ramírez-Pérez realizó el aislamiento, identificación y caracterización serológica de *Vibrio cholerae* a partir de muestras de agua, ostión y sedimento en la laguna de Mecoacán, Tabasco. Aisló un total de 707 cepas, de las cuales, el 34% se identificaron como *V. cholerae,* reportando una mayor cantidad de cepas cuyo serogrupo no pudo ser determinable y una mayor frecuencia de O130.

Solís en 2005 realizó aislamientos de *Vibrio cholerae* en los canales de Xochimilco. Analizó 48 hisopos de Moore, aislando 148 colonias, de las cuales 128 se identificaron como *Vibrio cholerae,* dentro de las que encontró 27 serogrupos, siendo los más frecuentes O135 y O14.

Luna en 2006 realizó aislamiento y caracterización serológica de *V. cholerae* en la planta de tratamiento “Cerro de la Estrella” y canales de Xochimilco, obteniendo 68 cepas de muestras acuáticas, de las cuales 34 fueron identificadas como *V. cholerae.* También se aislaron 44 cepas de raíz de lirio, siendo 40 de ellas *V. cholerae.* Además identificó que serológicamente la mayoría de las cepas son de antígenos no detectables y el serogrupo con mayor fecuencia es el O34 en muestras acuáticas y el O52 para muestras de raíz de lirio.

Eslava y colaboradores en 2008 realizaron una investigación bibliográfica, explicando que *V. cholerae* presenta tres comportamientos diferentes, siendo el más importante aquel en el que se presenta como viable pero no cultivable, debido a que le ha permitido a la bacteria permanecer por mucho tiempo en periodos interepidémicos, y cuando la temperatura aumenta, el pH se alcaliniza y hay presencia de vegetación acuática o algunos crustáceos, se puede generar un brote de la misma.

Castañeda en 2009 identificó la relación clonal entre aislamientos de *Vibrio cholerae* No-O1/No-O139 aislados de los canales de Xochimilco en 2002, encontrando que de un total de 116 cepas, el 41% presentó relación con cepas O1/O139, evidenciando que son cepas con potencial para convertirse en patógenas.

3. Justificación

Vibrio cholerae ha sido causante de siete pandemias en los últimos siglos y desde 1992 ha cobrado importancia en los análisis bacteriológicos de agua en México debido a su transición del medio marino al continental, esto aunado a su capacidad de permanencia mediante estrategias de resistencia. De lo anterior surge la necesidad del monitoreo de los cuerpos dulceacuícolas que se alimenten principalmente de aguas residuales, ya que la bacteria puede permanecer en ese ambiente o encontrar un reservorio y en cualquier momento desencadenar un brote infeccioso-epidémico, con las consecuencias ya conocidas entre la población.

Xochimilco es un sitio que para mantener el nivel constante del humedal, recibe descargas de la planta de tratamiento “Cerro de La Estrella”. El agua contenida en los canales se utiliza para regar las chinampas en las cuales se cultivan gran cantidad de vegetales, algunos de los cuales se distribuyen a lo largo de la Ciudad de México. Actualmente es un punto turístico aún vigente pero con la salvedad de la mala calidad bacteriológica de sus aguas.

A pesar de que han pasado 20 años desde la última epidemia de cólera, en los años recientes se han observado brotes de la enfermedad, cuyo número va en aumento conforme pasa el tiempo (DGE,2013). En 2011 se encontraron 11 casos en el estado de Florida (E.U.) a causa del consumo de ostras crudas. En 2013 se reportaron 2 casos de la enfermedad en Chile y 1 en Venezuela todos en el mes de agosto y relacionados con visitas ambulatorias a la Isla de Cuba. En el mismo mes y año pero en Afganistán, se reportaron 1,496 casos de cólera, 100 de estos graves (DGE, 2013).

Particularmente en México, la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, reporta que después de la pandemia de 1991 que se originó en Asia, al siguiente año llega a México el cólera y se mantiene durante 10 años, registrándose el mayor número de casos en el año de 1993, cuando se reportaron 10,374 enfermos. Posterior a esos años se fue presentando un cese paulatino de

la enfermedad hasta que no hubo reporte de casos en el año 2002. En 2011 esta misma institución registra nuevamente un caso de cólera en el estado de Campeche y en agosto de 2013 se reporta un caso más en el estado de Durango además de dos casos en el Distrito Federal, los reportes de infección por cólera han ido en aumento, tanto que para el mes de octubre se tiene un saldo total de 176 enfermos distribuidos entre San Luis Potosí, DF, Veracruz e Hidalgo, en esta última entidad es en la que presenta la mayor incidencia, dado que se reportaron 145 casos tan solo en el mes de septiembre.

El creciente número de brotes de *V. cholerae* en diferentes sitios del mundo y particularmente los casos reportados en el continente americano, sugieren la posible reemergencia de la bacteria. Particularmente para Xochimilco, Solís (2005) evidenció la presencia de la bacteria en el agua, Nandini (2003) demostró la presencia de cladóceros y Enríquez (2009) la de copépodos en el agua de este sitio, sin embargo no se evaluó la posible relación existente entre estos dos organismos para este sitio, ya que está descrito que el zooplancton juega un papel muy importante al fungir como un posible vector o ser un reservorio de *V. cholerae* en ambientes acuáticos (Borroto, 1997). Conocer los factores de virulencia que presentaron cepas aisladas en años anteriores que se encontraron asociadas a zooplancton, nos permitirá conocer el posible riesgo que representa la bacteria y con esto poder tomar las medidas necesarias para prevenir un brote epidémico.

4. Objetivos

General

Caracterizar fenotípica y genotípicamente cepas de *Vibrio cholerae* aisladas del zooplancton de Xochimilco, D. F., en 2005.

Particulares

1. Recuperar y revisar bioquímicamente los aislamientos de *V. cholerae* obtenidos en un estudio previo en el año 2005.
2. Realizar pruebas serológicas para caracterizar los aislamientos por estructura antigénica (serogrupo-antígeno somático O).
3. Identificar la capacidad hemolítica de las cepas de *V. cholerae* así como la formación de biopelículas.
4. Identificar mediante PCR la presencia de los genes *tcpA, ctxA, hlyA* y *toxR,* relacionados con la virulencia bacteriana.
5. Examinar a través de un análisis multivariado la relación existente entre las características ambientales, físico-químicas y la presencia de copépodos y cladóceros con los aislamientos de *V. cholerae* provenientes del zooplancton de Xochimilco, D.F.

5. Material y Métodos

5.1 Área de estudio

Xochimilco se localiza al sureste de la Ciudad de México, al pie de la sierra de Chichinautzin, a una altura de 2,240 msnm; la población residente se estableció en un lago de gran extensión, caracterizado actualmente por su sistema de canales, el cual surgió como consecuencia de la elaboración de islotes artificiales o "chinampas" que actualmente se utilizan como zonas de cultivo. Xochimilco cuenta con 180km de canales, de los cuales 14Km son turísticos y los 166Km restantes pertenecen a la zona chinampera, donde se realizan los cultivos de los alimentos que son comercializados en los mercados locales. Presenta un clima templado con lluvias en verano y temperatura promedio anual de 15 ºC (Solís, 2005). Su rehabilitación formó parte del Plan de Rescate Ecológico de Xochimilco, iniciando en 1989 para recuperar esta zona, que en 1987 fue declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO.

5.2 Muestras y fisicoquímicos del agua

Todas las muestras y datos fisicoquímicos analizados en el presente trabajo fueron obtenidos en un estudio previo, en el que se realizaron muestreos mensuales para la determinación de oxígeno disuelto, DBO_5, y clorofila-a en un periodo que abarcó de enero a diciembre de 2005 en el humedal de Xochimilco, sin embargo, por la ausencia de muestras del mes de febrero, éstas se sustituyeron por un muestreo del mismo mes pero en 2006. En correspondencia se registraron datos *in situ* de temperatura, conductividad eléctrica y pH. Se seleccionaron cuatro sitios de manera estratégica, con la intención de tener una visión del entorno turístico, semi rural y ecológico de Xochimilco (Cuadro 1 y fig. 1).

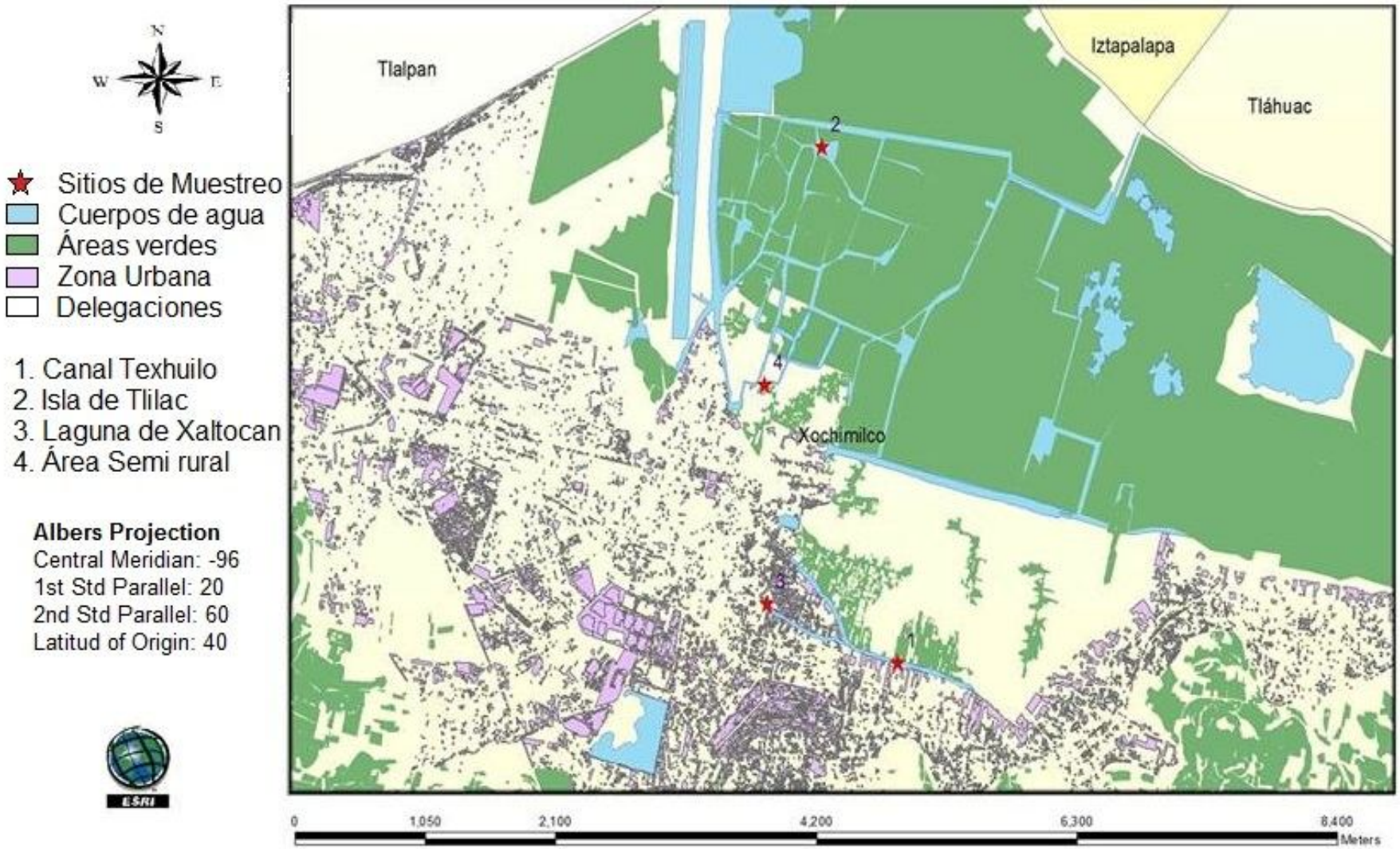

Figura1. Mapa con la ubicación de los sitios de muestreo (elaborado con la versión 9.2 del software Arcgis-ESRI)

Cuadro 1. Coordenadas de ubicación de los sitios de muestreo

Sitio	Latitud Norte	Longitud Oeste
Canal Texhuilo	19º 15’ 05.5’’	99º 05’ 19.6’’
Isla de Tlilac	19º 17’ 02.7’’	99º 05’ 38.1’’
Laguna de Xaltocan	19º 15’ 20.8’’	99º 05’ 55.4’’
Área semi rural	19º 16’ 09.8’’	99º 05’ 51.1’’

5.3 Recuperación y evaluación de los aislados

Fueron utilizados aislamientos ambientales obtenidos en el año 2005, por personal del laboratorio de Bacteriología del proyecto CyMA-UIICSE, mismos que se realizaron de acuerdo a la técnica que se describe en el ANEXO.

En este trabajo, con la intención de comprobar la pureza y correcta identificación de *Vibrio cholerae*, los aislados fueron recuperados en placas de agar base sangre (Difco, Detroit, USA) con 5% de sangre desfibrinada de ternera, las colonias típicas (redondas, convexas, con un diámetro aproximado de 3mm, centro opaco y translúcida en la periferia) se sembraron en agar TCBS (Bioxon, México) y aquellas que coincidieron con la morfología de *V. cholerae* en este medio (colonias redondas, convexas, de color amarillo en el centro, translúcidas en la periferia y consistencia viscosa), fueron sometidas a la prueba de oxidasa. Los aislados que presentaron las características de *Vibrio cholerae* fueron conservadas en gelosa especial para su posterior caracterización.

5.4 Tipificación serológica

a) Obtención de sueros

Se utilizaron sueros proporcionados por el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina (SERUNAM), los cuales fueron obtenidos por la inmunización de conejos ante el diseño de una vacuna específica para cada serogrupo.

b) Absorción de sueros

Con la intención de purificar los sueros, se sembró a manera de césped una cepa cuya denominación es VOR en 2 cajas de Agar Soya y Tripticaseína (TSA; Difco, Detroit, USA) por cada suero no absorbido y se incubó a 37ºC durante 24 horas. Una vez concluido ese tiempo se resuspendio todo el crecimiento bacteriano en 5 mL de solución salina (0.85%) y se centrifugó a 7,000rpm durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada, se desechó el sobrenadante y se añadieron a la pastilla 10mL del suero a absorber, una vez resuspendida, fue incubada en baño de agua a 50ºC durante 2 horas. Concluido ese tiempo se centrifugó a 7,000rpm durante 10 minutos y el sobrenadante fue tomado como el suero absorbido.

c) Titulación de los sueros

Los sueros fueron retados contra su antígeno homólogo mediante la técnica de diluciones seriadas que fueron desde 1 hasta 1/10,000,000 y observándose hasta qué dilución se formó el complejo antígeno-anticuerpo (aglutinación).

d) Obtención de antígeno e identificación del serogrupo

Para la obtención del antígeno somático (O) se realizó un cultivo de cada aislado en tubos de 16 x 150 con agar nutritivo con 1% de cloruro de sodio, al cual se le añadieron 10mL de solución salina (0.85%) con la intención de resuspender el crecimiento bacteriano, el cual se sometió a vapor efluente durante 60 minutos; concluido este tiempo se añadieron 10mL de formalina para su correcta conservación. Los antígenos obtenidos fueron retados contra 162 sueros específicos para conocer el serogrupo al que pertenecían.

5.5 Capacidad hemolítica y formación de biopelículas

Las cepas de *Vibrio cholerae* fueron sembradas en agar base sangre (Difco, Detroit, USA) con 5% de sangre de carnero (Hemoproveedores, México) y se incubaron a 35ºC durante 24 horas. Pasado este tiempo se revisó la destrucción de eritrocitos y la formación de biopelículas.

5.6 Detección de genes de virulencia

Las cepas fueron sembradas en agar Soya y Tripticaseína (TSA; Difco, Detroit, USA) e incubadas durante 24 horas a 37°C. Concluido el tiempo se tomó una asada del crecimiento, misma que se resuspendió y disgregó en un tubo para microcentrífuga con 200 µL de agua desionizada, posteriormente se mantuvo en baño de agua a 100ºC durante 5 minutos y se centrifugó a 12,000rpm durante 3 minutos, obteniendo el DNA en el sobrenadante.

En las cepas aisladas se buscaron cuatro secuencias relacionadas con la virulencia de *V. cholerae* y de acuerdo con las características especificadas en el cuadro 2 se diseñaron dos protocolos de amplificación, el primero para el gen *hlyA* y el segundo de tipo multiplex para los genes *tcpA, toxR* y *ctxA*. Las PCR se realizaron utilizando *Taq* polimerasa (Vivantis®) y se siguieron las condiciones de las PCR que se especifican en el cuadro 3 durante 30 ciclos. Los productos fueron revelados mediante electroforesis en geles de agarosa (Vivantis®) al 1.2% a 100 volts (Biorad®) durante 45 minutos, teñidos con bromuro de etidio (2%) y visualizados en un fotodocumentador con exposición a luz UV (Macro Vue UVis-20).

Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos utilizados para la identificación de genes de virulencia

Gen	Oligo	Tamaño del oligo	Tm ºC	Ta ºC	Tamaño amplicón (pb)
toxR	F: AGGGTTAGCAACGATGCGTAAG	22	55	50	778
	R: CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC	22	58		
ctxA	F: CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG	22	59	56	564
	R: CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC	23	56		
hlyA	F: GAGCCGGCATTCATCTGAAT	20	55	50	481
	R: CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA	22	56		
tcpA	F: CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG	24	55	50	620
	R: TTACCAAATGCAACGCCGAATG	22	56		

Fuente de las secuencias seleccionadas: Rivera, *et. al.*2002

Cuadro 3. Condiciones del termociclador (Biorad®)

Fase de la PCR	*hlyA*		Multiplex *ctxA, toxR y tcpA*	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización	94	1:00	94	0:30
Alineamiento	60	1:00	59	0:30
Extensión	72	1:00	72	0:30

5.7 Confirmación de vibriones e identificación de zooplancton

Dado que el estudio del que provinieron las cepas sólo se enfocó al aislamiento, en el presente se evaluó la presencia de vibriones adheridos a copépodos y cladóceros, para tal fin, fueron utilizadas muestras de zooplancton correspondientes a algunos de los meses de los aislamientos, se tomaron individuos de cada grupo, se limpiaron tres veces con agua destilada estéril y se tiñeron con el marcador fluorescente DAPI (4,6-diamidino-2 fenilindol de SIGMA®) finalmente fueron observados con un microscopio de epifluorescencia (Nikon® E600). Simultáneamente, se identificaron los integrantes del zooplancton presentes con la intención de conocer su posible relevancia con la presencia de *Vibrio cholerae*.

5.8 Análisis estadístico

Para establecer las posibles relaciones entre las variables fisicoquímicas, el zooplancton y los serogrupos, se realizó un análisis de correspondencia canónica con la versión 4.5 del software computarizado CANOCO®.

6. Resultados

6.1 Recuperación y evaluación de los aislados de *Vibrio cholerae*

Se revisaron un total de 176 cepas aisladas a partir del zooplancton del humedal de Xochimilco, de las cuales fueron recuperadas 134 (76%), de estas últimas todas cumplieron con las características bioquímicas y morfológicas de *Vibrio cholerae* (figura 2).

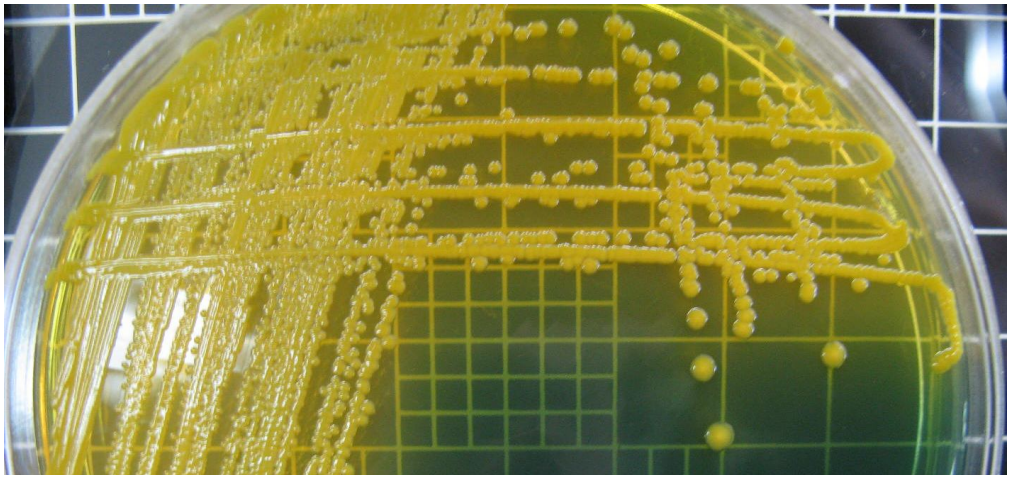

Figura 2. Crecimiento de *Vibrio cholerae* en agar TCBS, colonias amarillas debido a la acidez producto de la fermentación de la sacarosa.

6.2 Tipificación serológica

Se logró determinar mediante la tipificación serológica que el 38.8% de las cepas de *V. cholerae* estudiadas no aglutinaron con los 155 sueros con los que cuenta SERUNAM, por lo que se catalogaron como O no detectables (OND), condición que fue predominante en los cuatro sitios de muestreo (cuadro 4).

Se identificaron 82 cepas que fueron distribuidas en 21 serogrupos diferentes, de los cuales el O135 fue el más frecuente con 14.2%, seguido del O127 (11.2%) y O35 (7.5%), el resto de los serogrupos se encontraron con una frecuencia menor al 5% (cuadro 4).; la mayor cantidad de estos se encontraron en la Isla de Tlilac al presentar 15 de los 21 serogrupos encontrados en este estudio, le siguen la laguna Xaltocan y el canal Texhuilo con 11 cada uno y finalmente el Área Semi Rural con 8 (Fig. 3).

Se observa que la mayor parte de las cepas fueron aisladas en época de secas y que el serogrupo O135 se aísla con mayor frecuencia en invierno, contrario a lo que sucede con O127 y O35 cuya frecuencia aumenta en primavera.

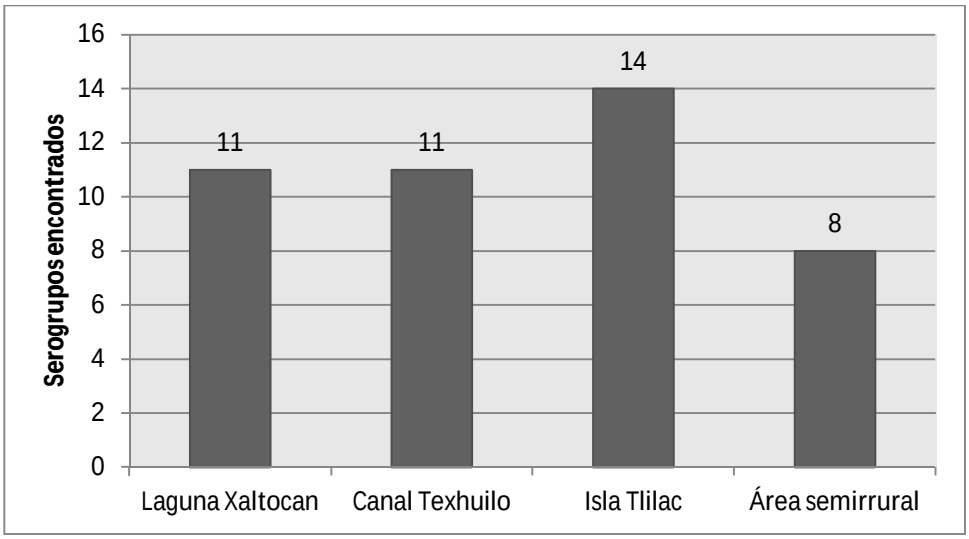

Figura 3. Numero de serogrupos encontrados por sitio de muestreo

El serogrupo O135 presentó una mayor distribución al encontrarse en 7 meses del estudio y los serogrupos O127 y O35 en cinco de los meses de muestreo (Cuadro 6). Los tres serogrupos mencionados estuvieron presentes en las cuatro estaciones de muestreo con mayor abundancia (Cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución de los serogrupos por sitio de muestreo

Serogrupo	Distribución				TOTAL
	Laguna de Xaltocan	Canal Texhuilo	Isla de Tlilac	Área Semi rural	
O ND	15	14	15	8	**52**
O6			1		1
O10		3	2		5
O14			1		1
O27	1				1
O35	**3**	**3**	**1**	**3**	**10**
O39		1	1		**2**
O41	2			2	**4**
O42			1		**1**
O43			2	1	**3**
O56			1		**1**
O62	1	2	1	2	**6**
O75	1				**1**
O79		1			**1**
O84			1		**1**
O97			1		**1**
O100	2	1			**3**
O127	**6**	**2**	**3**	**4**	**15**
O128	2	1		1	**4**
O135	**4**	**12**	**2**	**1**	**19**
O147		1			**1**
O150	1				**1**
TOTAL	**38**	**41**	**33**	**22**	**134**

ND-No determinable

6.3 Capacidad hemolítica y formación de biopelículas

De las 134 cepas analizadas 125 (93.28%) presentaron hemólisis completa (β) (Fig. 4) y el resto no presentó hemólisis; los serogrupos O135, O127 y O35 tienen mayor frecuencia hemolítica con 13.43%, 11.19% y 7.46% respectivamente (Cuadro 7).

Figura 4. Hemólisis tipo beta generada por aislados de *Vibrio cholerae.* Izquierda reverso de la caja, derecha vista frontal del crecimiento.

Únicamente el 26.87% de las cepas presentaron la capacidad de formar biopelículas (Fig. 5), siendo el serotipo O127 el que tuvo el mayor número de cepas con el 5.97%. Al analizar los aislamientos que presentaran ambas características este serogrupo también muestra el porcentaje más alto con 5.97% (cuadro 7).

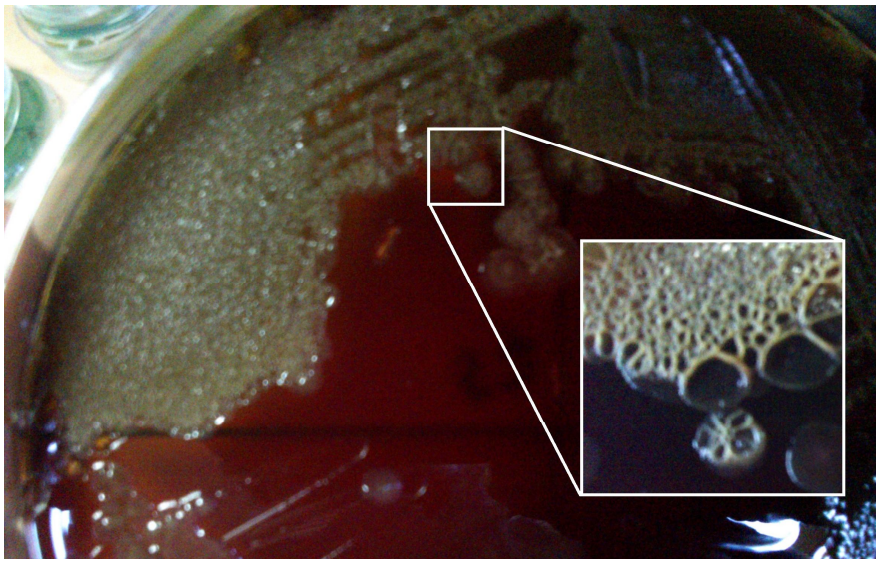

Figura 5. Formación de Biopelículas por parte de una cepa O27 en agar sangre, se amplifican las colonias rugosas típicas de esta formación.

6.4 Detección de genes de virulencia

Se observó, mediante la amplificación de genes por PCR, que de las 134 cepas analizadas 120 (89.55%) presentaron el gen *hlyA* y 111 (82.84%) la presencia de *toxR* (Fig. 6). Nuevamente los serogrupos O135, O127 y O35 muestran la dominancia en ambos genes; O135 fue el serogrupo que presentó la mayor frecuencia de ambos genes con 11.94% (cuadro 7).

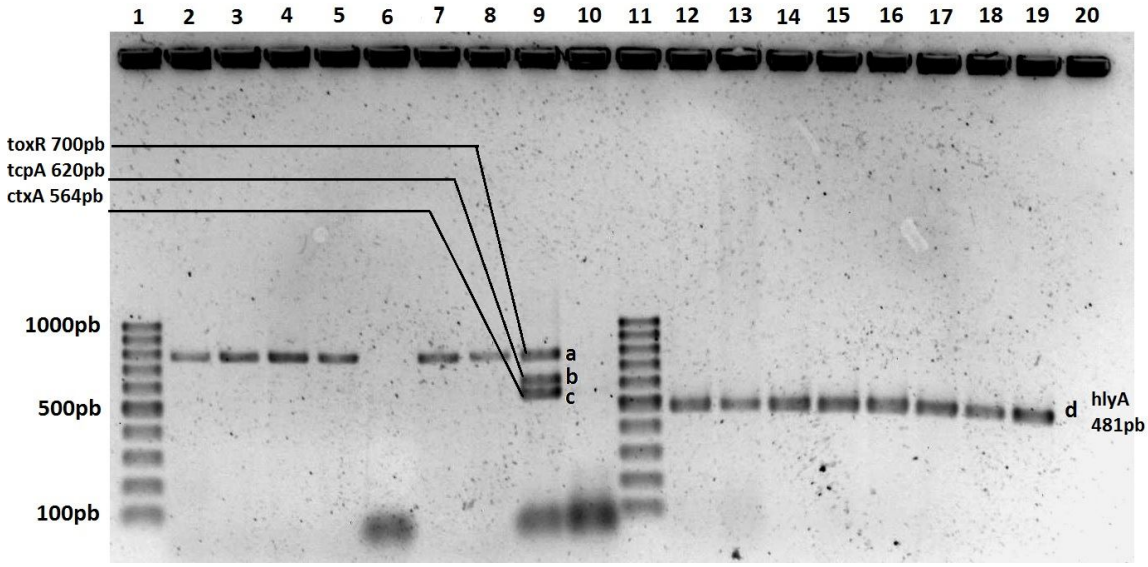

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (1.2%). Amplicones de los genes de toxicidad de *V. cholerae*. Carril 1 y 11, marcadores de peso molecular 100pb. Carriles 2-10 PCR multiplex (*ctxA, tcpA y toxR*), carriles del 2-8 amplicón de *toxR* de los diversos serogrupos encontrados. Carril 9 control positivo de *V. cholerae* O1 El Tor y carril 10 control negativo de *E. coli* HB101. Carriles de 12-20 PCR para *hlyA*, del 12 al18, amplicones de diversos serogrupos, carril 19 control positivo de *V. cholerae* O1 El Tor y carril 20 control negativo de *E. coli* HB101.

6.5 Confirmación de vibriones e identificación de zooplancton

Con la intención de relacionar los aislamientos con el zooplancton, se examinaron 12 muestras aleatorias, correspondientes a algunos de los meses de muestreo. Se observó en mayor medida la presencia del orden Cyclopoida (Copépoda) con una frecuencia de 64.81%, seguido por algunos integrantes del grupo de los cladóceros con el 6.27 %, compuesto por los géneros *Alona* sp, *Chydorus* sp y *Bosmina* sp (fig. 7). El porcentaje restante (28.92%) perteneció a las larvas “Nauplio” características de los crustáceos. El presente estudio no

considero la determinación de rotíferos debido a su poca relación con *Vibrio* cholerae (No se procesaron muestras de los meses agosto, septiembre y noviembre por la pérdida del material).

Cuadro 5. Distribución del Zooplancton a lo largo de los meses de muestreo

Sublcase	Orden	Suborden	Familia	Género	E	M	A	M	J	J	O	D	F-06
Copepoda	Cyclopoida	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Cladocera	Bosminidae	*Bosmina sp*	+	+		+			+	+	+
			Daphniidae	*Daphnia sp*	+	+							
			Chydoridae	*Alona sp*	+	+	+		+	+		+	+
				Chydorus sp	+	+		+	+				
		Nauplio			+	+	+	+	+	+	+	+	

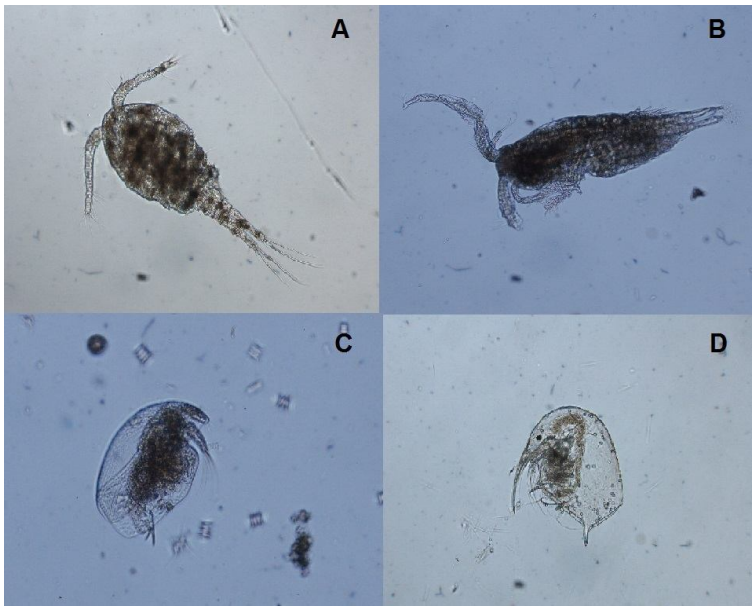

Figura 7. Integrantes del Zooplancton identificados. A) Organismo del orden Ciclopoyda juvenil. B) Ciclopoyda macho. C) *Alona sp.* (Cladócera). D) *Bosmina sp.* (Cladócera).

La tinción por DAPI evidenció, en todos los meses, la presencia de bacterias en los caparazones de copépodos y cladóceros, algunas se observaron como bacilos curvos, típicos de vibriones como *Vibrio cholerae* (figura 8).

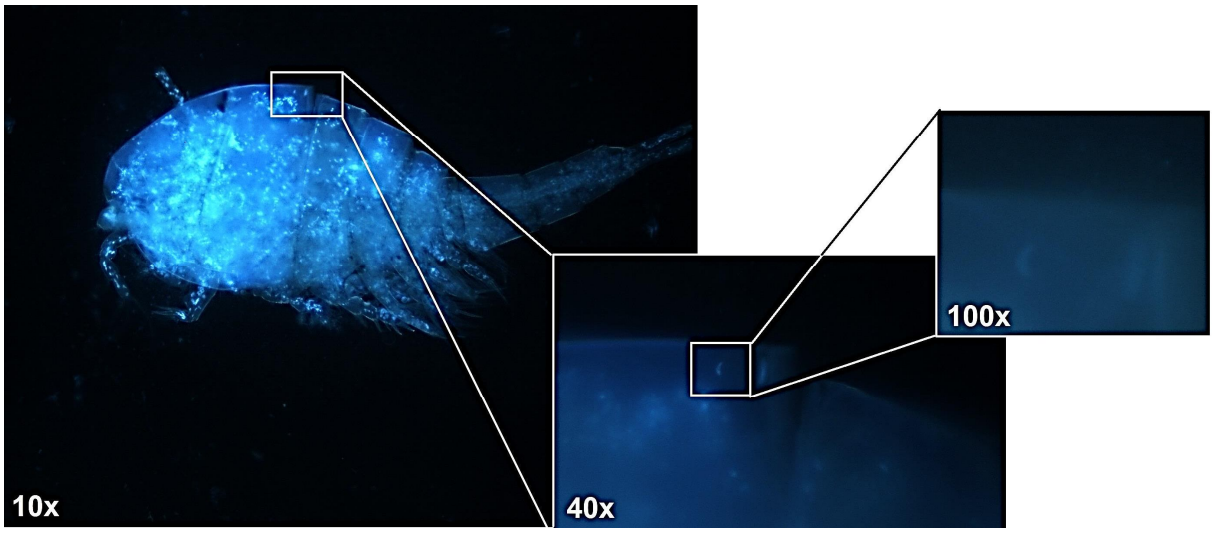

Figura 8. Organismo del orden Cyclopoida teñido con DAPI, se observan los vibriones en su caparazón.

6.6 Fisicoquímicos del agua

Las muestras incluidas a este apartado fueron tomadas durante un año, de enero a diciembre de 2005. Considerando que no hubo muestreo en el mes de febrero, éste fue recuperado en el año 2006.

Oxígeno disuelto

Los valores promedio de oxígeno disuelto fueron similares en 3 de los sitios de muestreo, encontrando un valor promedio de 6.65mg/L para la laguna de Xaltocan, 6.28mg/L en el Canal Texhuilo, 6.89mg/L en la Isla de Tlilac y 4.30mg/L en el área semi rural. Sin embargo al analizar las concentraciones por mes, se observó una variación considerable, los registros más altos se encontraron en la Isla de Tlilac en los meses de Diciembre y Enero con valores de 15 mg/L y el valor más bajo se encontró en el área semi rural en el mes de Septiembre con 1.4mg/L (Fig. 9). Se observa una tendencia generalizada en la disminución del gas en los meses de octubre y noviembre.

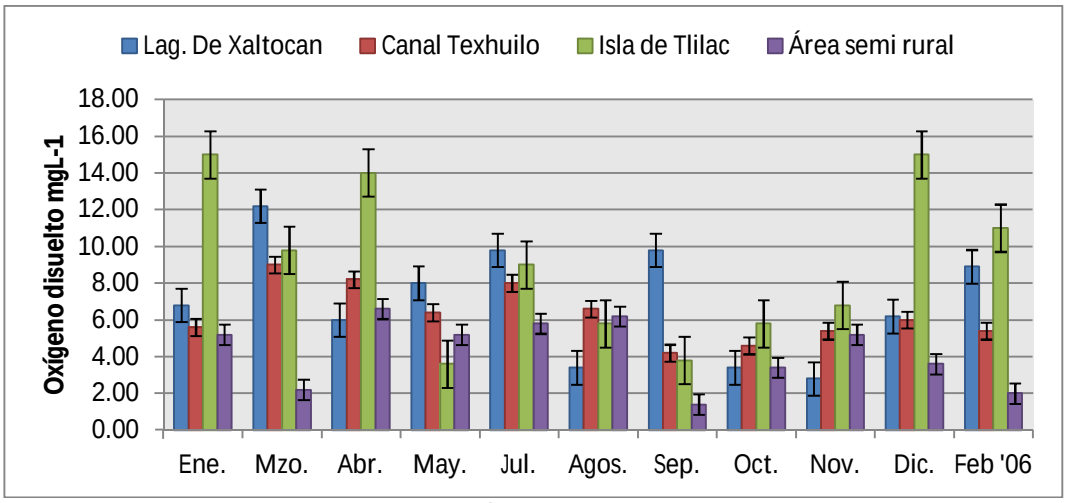

Figura 9. Concentraciones de oxígeno disuelto en los sitios de muestreo.

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5)

Los valores más altos se encontraron en el canal Texhuilo donde oscilaron entre 5.97 y 95mg/L, siendo el valor más alto el perteneciente al mes de agosto, para la Isla Tlilac la concentración más elevada se presentó en febrero de 2006 con 72.59mg/L y la más baja en Diciembre de 2005 con 8.6mg/L. Para el caso de la laguna de Xaltocan y el área semi rural las concentraciones más altas fueron de 40.07 y 34.4 mg/L y las más bajas de 2.39 y 5.7 mg/L respectivamente. Se observa una tendencia a menor DBO_5 de septiembre a diciembre (fig. 10).

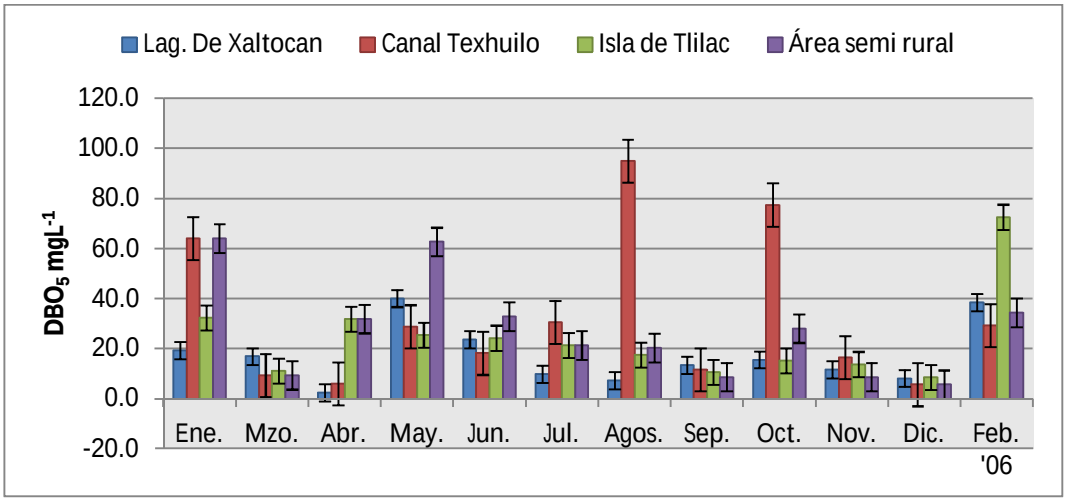

Figura 10. Concentración de materia orgánica determinada por la demanda bioquímica de oxígeno.

Clorofila-a

Se utilizaron los datos de clorofila-a como medida indirecta del fitoplancton presente en el humedal, observando que en la Isla Tlilac y el canal Texhuilo los valores fueron menores a los 2.5 mg/cm^3 presentando un promedio de 0.7mg/cm^3 en ambos sitios. Por otra parte el valor más alto se obtuvo en la laguna de Xaltocan con 42.92 mg/cm^3 en abril de 2005 seguido del área semi rural donde se encontraron 20.17 mg/cm^3 en el mes de Diciembre (Fig. 11).

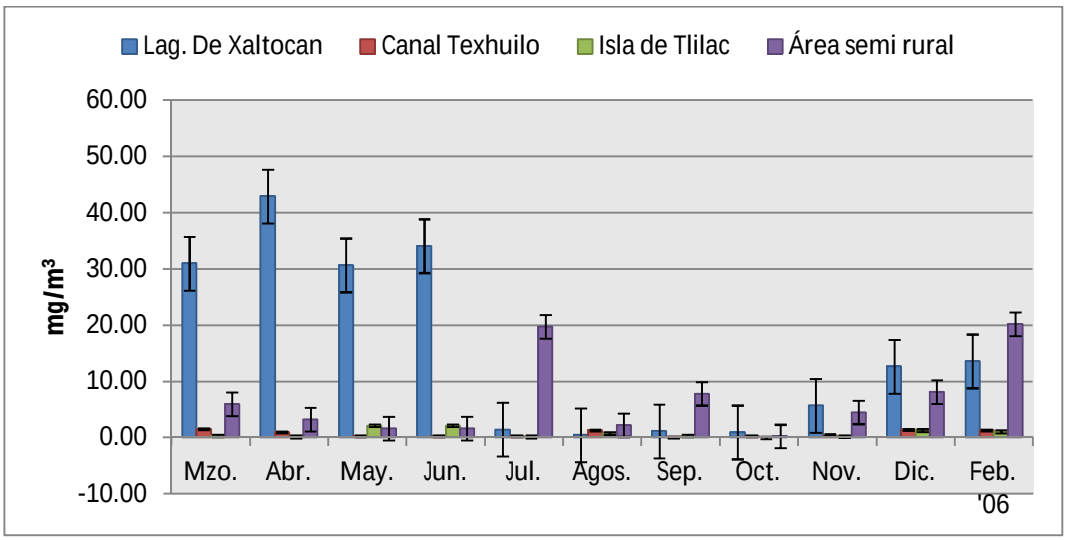

Figura 11. Concentración de clorofila-a a lo largo del estudio

Temperatura del agua, conductividad eléctrica y pH

Los registros de temperatura oscilaron entre los 17 y los 22°C y mantuvieron un comportamiento similar a lo largo del año en los cuatro sitios de muestreo (Fig. 12); este patrón se observó también con el pH, con valores de 7 con tendencia a la alcalinidad (Fig. 13). Sin embargo, a pesar de que la conductividad fue relativamente constante con valores cercanos a los 800 µS/cm, se presentó un aumento en los cuatro sitios en el mes de octubre, siendo el valor máximo de 1,400 micromohs/cm en la Isla Tlilac (Fig. 14).

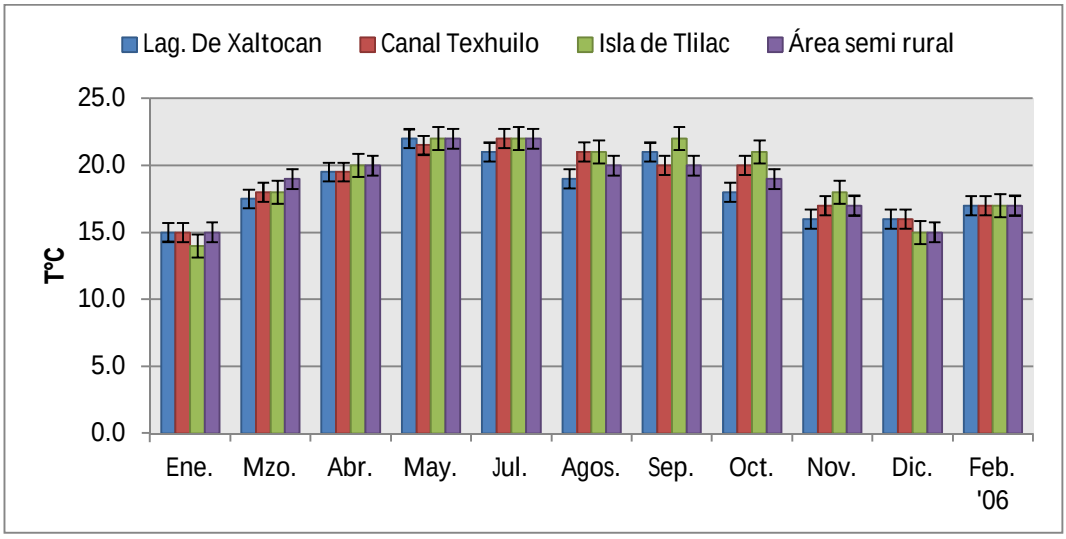

Figura 12. Registros de temperatura del agua de Xochimilco en los años 2005 y 2006.

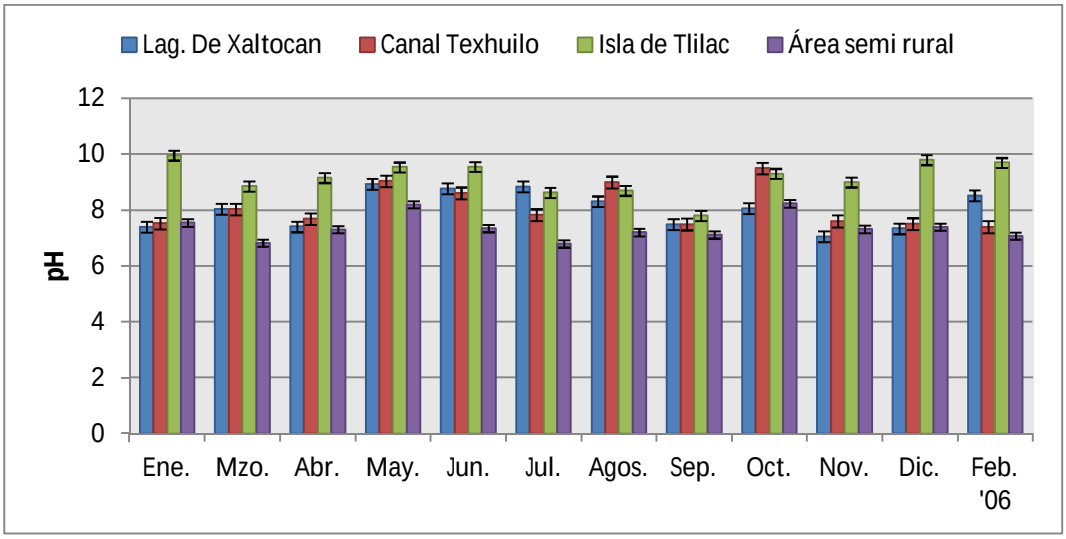

Figura 13. pH registrado en los canales de Xochimilco en los años 2005 y 2006

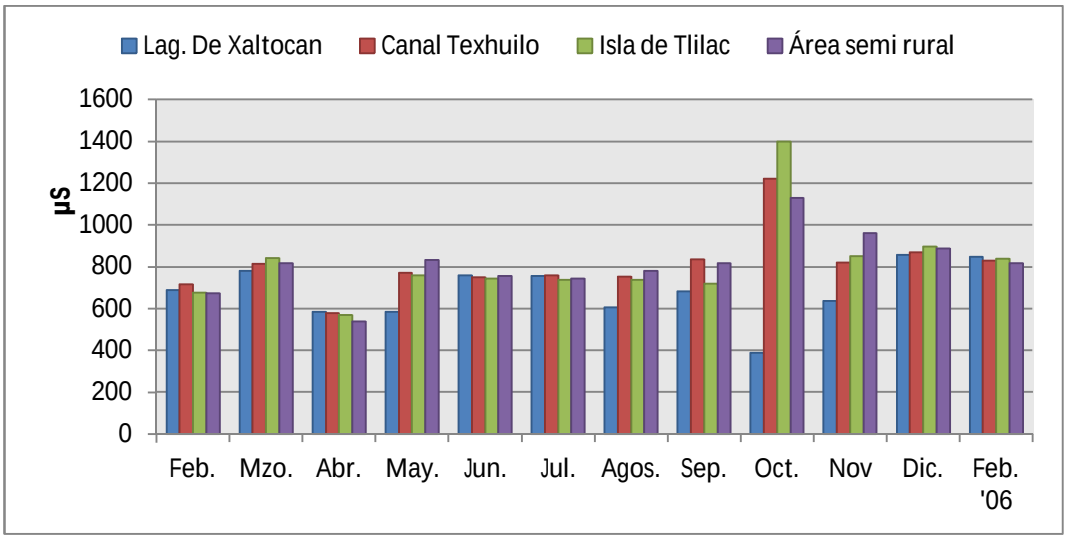

Figura 14. Conductividad eléctrica del agua de Xochimilco en los diferentes puntos de muestreo.

6.7 Análisis estadístico

El análisis de correspondencia canónica mostró una relación directa entre la migración de los diferentes serogrupos a la quitina de copépodos y cladóceros con las variables fisicoquímicas del agua y la abundancia del zooplancton (figura 15). Los serogrupos O6, O14, O35, O43, O79, O100, O127 y O147 presentan una mayor correlación con la materia orgánica (DBO_5) y la temperatura; por otra parte O27, O41, O84 y O128 se relacionan en mayor medida con la clorofila-a, además O39 tiene una mayor correlación con la materia orgánica + pH y O42 con oxígeno disuelto + pH. La presencia de O135 en el zooplancton se relaciona directamente con la abundancia del mismo y finalmente ninguno de los parámetros medidos en este estudio presentó alguna asociación con la aparición de los serogrupos O150, O97 ni O56 dentro del zooplancton.

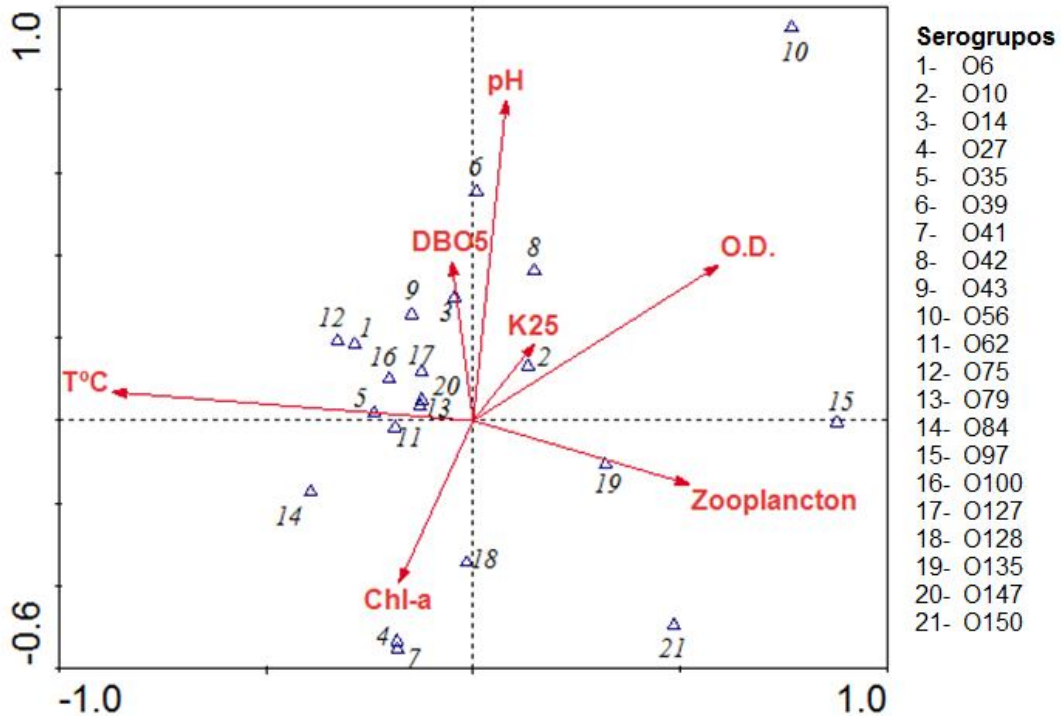

Figura 15. Análisis de correspondencia canónica realizado con el software CANOCO (Versión 4.5)

Cuadro 6.Frecuencia de serogrupos por mes de muestreo

Serogrupo	Frecuencia serogrupos (%)												TOTAL (%)
	Ene.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Feb. '06	
OND	3.73	5.97	6.72	3.73	1.49	2.24	1.49	2.99	0.75	0.75	0.75	8.21	**38.81**
O6							0.75						**0.75**
O10										2.99		0.75	**3.73**
O14										0.75			**0.75**
O27			0.75										**0.75**
O35			**0.75**	**4.48**	**0.75**			**0.75**	**0.75**				**7.46**
O39				0.75								0.75	**1.49**
O41		1.49	1.49										**2.99**
O42		0.75											**0.75**
O43		0.75		0.75	0.75								**2.24**
O56	0.75												**0.75**
O62					1.49	2.99							**4.48**
O75				0.75									**0.75**
O79					0.75								**0.75**
O84								0.75					**0.75**
O97											0.75		**0.75**
O100				1.49					0.75				**2.24**
O127		**2.24**	**0.75**	**2.24**	**5.22**	**0.75**							**11.19**
O128						1.49				1.49			**2.99**
O135	**3.73**	**4.48**	**0.75**		**0.75**	**0.75**	**0.75**				**2.99**		**14.18**
O147						0.75							**0.75**
O150		0.75											**0.75**
TOTAL (%)	**8.21**	**16.42**	**11.19**	**14.18**	**11.19**	**8.96**	**2.99**	**4.48**	**2.24**	**5.97**	**4.48**	**9.70**	**100**

Cuadro 7. Frecuencia de las características fenotípicas y genotípicas de *V. cholerae* aislado de zooplancton en los años 2005 y 2006

Serogrupo	N° de cepas	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS			CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS		
		Hemólisis (%)	Biopel. (%)	Hemólisis+Biopel. (%)	hlyA (%)	toxR (%)	hlyA+toxR (%)
OND	52	34.33	10.45	9.7	32.09	33.58	29.1
O6	1	0.75	0	0	0.75	0.75	0.75
O10	5	3.73	1.49	1.49	3.73	2.99	2.99
O14	1	0.75	0	0	0.75	0.75	0.75
O27	1	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
O35	10	7.46	0.75	0.75	7.46	7.46	7.46
O39	2	0.75	1.49	0.75	0.75	0.75	0.75
O41	4	2.99	0.75	0.75	2.24	0.75	0.75
O42	1	0.75	0	0	0.75	0.75	0.75
O43	3	2.24	1.49	1.49	1.49	1.49	1.49
O56	1	0.75	0	0	0.75	0.75	0.75
O62	6	4.48	0	0	4.48	2.99	2.99
O75	1	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
O79	1	0.75	0	0	0.75	0	0
O84	1	0.75	0	0	0.75	0.75	0.75
O97	1	0.75	0	0	0.75	0.75	0.75
O100	3	2.24	0.75	0.75	2.24	2.24	2.24
O127	15	11.19	5.97	5.97	11.19	8.21	8.21
O128	4	2.24	0.75	0.75	2.24	2.99	2.24
O135	19	13.43	1.49	1.49	13.43	11.94	11.94
O147	1	0.75	0	0	0.75	0.75	0.75
O150	1	0.75	0	0	0.75	0.75	0.75
Total	**134**	**93.28**	**26.87**	**25.37**	**89.55**	**82.84**	**77.61**

10. Anexos

10.1 Aislamiento de *Vibrio cholerae* a partir de zooplancton

Se filtraron en cada sitio, 80 litros de agua a través de una red para plancton con apertura de malla de 40µm, hasta concentrar un volumen aproximado de 200mL. La muestra fue sonicada con la intención de separar de esa forma las bacterias adheridas a la cutícula, posteriormente se trituró con ayuda de un homogenizador para liberar las bacterias que se encontraran dentro de los organismos. Se tomaron 10mL del homogenizado y se inocularon en 100mL de agua peptonada alcalina (APA) incubando a 37ºC durante 24h. Pasado este tiempo se observó la presencia de una biopelícula en el medio, de la cual se tomó una asada y se sembró por estría en cajas Petri con agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) y se dejó incubar durante 24 horas a 37ºC.

De las placas de TCBS se seleccionaron cinco colonias características (redondas, convexas, de color amarillo en el centro, translúcidas en la periferia y consistencia viscosa) que se identificaron mediante las pruebas bioquímicas específicas que son: Triple-Azúcar-Hierro (TSI; Difco, Detroit, USA), Movilidad-Indol-Ornitina (MIO; Difco, Detroit, USA), Lisina-Hierro-Arginina (LIA; Difco, Detroit, USA) y Oxidasa. Las cepas se sembraron en gelosa especial y se depositaron en el cepario del laboratorio de Bacteriología del proyecto CyMA-UIICSE de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

10.2 Medios de Cultivo

a) Agar Nutritivo para serología

Formulación

Agar Bacteriológico	15g
Peptona	5g
Extracto de carne	3g
NaCl	10g
Agua destilada	1000mL

Preparación.

Se pesan todos los componentes y se hidratan con 1000mL de agua destilada, se calientan hasta ebullición y se mantiene en este estado durante un minuto hasta su completa disolución. Se distribuye en tubos con tapón de rosca de 16x150mm, se esterilizan a 121°C y 15 libras de presión y se dejan gelificar en posición inclinada.

b) Gelosa especial

Formulación

Agar Bacteriológico	15g
Agar base sangre	20g
Extracto de carne	1.5g
NaCl	10g
Agua destilada	1000mL

Preparación.

Se pesan todos los componentes y se hidratan con 1000mL de agua destilada, se calientan hasta ebullición y se mantiene en este estado durante un minuto hasta su completa disolución. Se distribuye en tubos con tapón de rosca de 13x100mm, se esterilizan a 121°C y 15 libras de presión y se dejan gelificar en posición inclinada.

10.3 Mezclas de reacción para la detección de genes de virulencia de *Vibrio cholerae*

a) PCR múltiplex para la detección de toxR, ctxA y tcpA

Reactivo		Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen
Buffer		10x	1x	**2.5 µL**
$MgCl_2$		50mM	2mM	**1 µL**
DNTP's		2mM	0.2mM	**2.5 µL**
toxR	F	10µM	0.5µM	**1.25 µL**
	R	10µM	0.5µM	**1.25 µL**
ctxA	F	10µM	0.5µM	**1.25 µL**
	R	10µM	0.5µM	**1.25 µL**
tcpA	F	10µM	0.5µM	**1.25 µL**
	R	10µM	0.5µM	**1.25 µL**
Taq polimerasa		5 U/µL	0.25U/ µL	**0.25 µL**
ADN		—	—	**3 µL**
H_2O		—	—	**8.25 µL**
Volumen final		**—**	**—**	**25µL**

b) PCR para la detección del gen hlyA

1) Componentes Master Mix

Taq DNA polimerasa: 0.05U/µL
Buffer 5x
$MgCl_2$ 4mM
dNTP's 0.4mM

2) Mezcla de reacción

Componente		Volumen
Master mix		10 µL
hlyA (0.5 µM)	F	1.25 µL
	R	1.25 µL
ADN		2 µL
Agua		10.5 µL
Volumen final		25 µL

9. Literatura Citada

BELTRÁN, P., Delgado, G., Navarro, A., Trujillo, F., Selander, R. y A. Cravioto. 1999. Genetic Diversity and Population Structure of *Vibrio cholerae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(3): 581-590.

BIK, E., Bunschoten, A., Gouw, R. y F. Mooi. 1995. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *The EMBO Journal*. 14(2):209-216.

BORROTO, R. 1997. La ecología de Vibrio cholerae serogrupo 01 en ambientes acuáticos. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 1(1): 3-8.

CASTAÑEDA, M. 2009. Caracterización por métodos moleculares de *Vibrio cholerae* aislados en México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. 52p.

CASTAÑÓN, A. 2005. Inducción de apoptosis por la hemolisina vacuolizante HlyA de *Vibrio cholerae.* Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. Pp. 18.

COLWELL, R., Kaper, R., Seider, R., Voll, M., McNicol, L., Gargas, S., Lockman, H., Maneval, D., Remmers, E., Bradford, H., Roberts, N., Huq, I. y A. Huq. 1980. Isolation of O1 and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuaries and brackish water environments. pp. 44-56. *In Proceedings of the Fifteenth U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program Joint Conference on Cholera*. NIH publication no. 80-2003. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Bethesda, Md.

CONSTANTIN, G., Nurtugudde, R., Sapiano, M., Nizam, A., Brown, C., Busalacci, A., Yunus, M., Nair, G., Gil, A., Lanata, C., Calkins, J., Manna, B., Rajendran, K., Bhattacharya, M., Huq, A., Sack, B. y R. Colwell. 2008. Environmental signatures associated with cholera epidemics. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105(46):17676-17681.

DÍAZ, C. 2003. *Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas*. RIPDA-CYTED. P.p. 155-165

DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA. 2013. Boletín Epidemiológico: Edición en línea. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html. Consultado el 20 de diciembre de 2013.

DRASAR, B. y B, Forrest. 1996. *Cholera and the ecology of Vibrio cholerae*. Chapman & Hall. 355p.

DUMONTIER, S. y B. Patrick. 1998. Vibrio cholerae O22 might be a putative source of exogenous DNA resulting in the emergence of the new strain of Vibrio cholerae O139. *FEMS Microbiology.* Pp. 91-98

ENRÍQUEZ, C., Nandini, S. y S. Sarma. 2009. Seasonal dynamics of zooplankton in lake Huetzalin, Xochimilco (Mexico City, México). *Limnologica.* 39(4):283-291.

ESLAVA, A., Rosas, I., Solano, M., Delgado, G., Ramírez, M., Villaseca, J. y A, Cravioto. 2008. *Vibrio cholerae*: bacteria ambiental con diferentes tipos de vida. En: Cravioto, A., Rosas, I. y Ezcurra, E. *Microbiología ambiental*. Instituto Nacional de Ecología. Pp. 47-63.

FARUQUE, S., Albert, M. y J. Mekalanos. 1998. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic Vibrio cholerae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(4): 1301-13014.

FERNÁNDEZ, S. y G, Alonso. 2009. Cólera y Vibrio cholerae. *Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*. Revisiones - 2009; 40 (2): 50-69

GIONO,S. y J, Arellano. 2010. Género *Vibrio.* En: Molina, J. Manjarrez, M. y J, Tay. 2010. *Microbiología: Bacteriología y Virología*. Méndez Editores. México. Pp. 248-258.

GOSH, C., Nandy, R., Dasgupta, S., Nair, G. Hall, R., y Ghose, A. 1997. A search for cholera toxin (CT), toxin coregulated pilius (TCP), the regulatory element toxR and other virulence factors in Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae*. Microbial Pathogenesis journal. 22(4):199-208

GONZÁLEZ, L., Casanova, M. y J, Labrador. 2011. Cólera: historia y actualidad. *Revista de Ciencias Médicas*. 15(4): 280-294

HAYS, J. 2005. Epidemics and Pandemics: Their impacts on Human History. ABC-CLIO. Pp. 267-270

HUQ, A., Small, E., West, P., Huq, I., Rahman, R. y R. Colwell. 1983. Ecological relationships between *vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Applied and Enviromental Microbology.* 45(1):275-283.

HUQ, A. y R, Colwell. 1996. Enviromental factors associated with emergence of disease with special reference to cholera. Eastern Mediterranean Health Journal. 2(1):37-45.

HUQ, A., Sack, R., Nizam, A., Longini., Balakrish, G., Ali, A., Morris, J., Huda, M., Kasem, A., Yunus, M., John, M., Sack, D. y R. Colwell. 2005. Factors Influencing the Occurrence of *Vibrio cholerae* in the Enviroment of Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology.* 71(8): 4645-4654.

ISAAC-MÁRQUEZ, A., Lezama-Dávila, C., Eslava-Campos, C., Navarro-Ocaña, A. y A. Cravioto-Quintana. 1998. Vibrio cholerae Non-O1 Isolated from Water Supplies for Human Consumption in Campeche, México and their Antibiotic Susceptibility Pattern. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93(1): 17-22

JIMÉNEZ, B. 2001. *La contaminación Ambiental en México*. Limusa. Pp. 108-11.

JONSON, G., Svennerholm, A. y J, Holmgren. 1989. *Vibrio cholerae* expresses cell surface antigens during intestinal infection which are not expressed during in vitro culture. *Infection and Immunity*. 57(6): 1809-1815.

KAROLIS, D., Somara, S., Maneval, D., Johnson, J. y J. Kaper. 1999. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria, *Nature 399: 375-379.*

LAFUENTE, S., Vilella, A., Serrano, B., Gonzalez, R. y L, Bruni. 2006. El cólera. *Enfermedades Emergentes*. 8(1):10-15

LIPP, E., Huq, A. y R. Colwell. 2002. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clinical Microbiology Reviews*. 15(4): 757-770.

LOCASCIO, C., Villagra, A., Silva, C., Cecilia, M. y N, Brinsztein. 2010. Microcrustáceos y Vibrio cholerae O1 viable no cultivable (VNC): resultados en la Cuenca del Río Salí, Tucumán, Argentina. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 38(1): 71-80

LUNA-FUENTES, K. 2006. Aislamiento y caracterización serológica de Vibrio cholerae, aislado de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella y canales de Xochimilco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.

MARRERO, K. y R, Fando. 2011. Formación de biopelículas por Vibrio cholerae. *CENIC Ciencias Biológicas*. 42(2):69-80

MATA, L. 1992. *El cólera: historia, prevención y control*. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 88-89 pp.

MOZUMDER, P., Samsun, N., Niamul, N., Munirul, A., Huq, A., Sack, A., Sack, B. y R. Colwell. 2012. Species Composition of limnetic zooplankton from the southern coastal areas (Mathbaria and Bakerganj) in Bangladesh. *Journal of the Asiatic Society of Bangladesh, Science.* 38(1):111-117

NANDINI, S., Ramírez, P. y S. Sarma. 2005. Seasonal Variations in the Species Diversity of Planktonic Rotifers in Lake Xochimilco, Mexico. Journal of Freshwater Ecology. 20(2): 287-294.

NEBEL, B. y R, Wright. 1999 . *Ciencias ambientales: ecología y desarrollo sostenible*. Pearson. 698p.

PORTILLO, A. y M, Lizárraga. 1997. Detección De Vibrio cholerae 01 En diferentes Hábitats De La Bahía De Todos Santos, Baja California, México. *Ciencias Marinas*. 23(4):435-447

RAMÍREZ, P., Cortés, M., Sánchez, J. y H, Carlos. 1995. *Nicho ecológico de Vibrio cholerae en el ambiente acuático vs un estudio experimental*. IMTA. México. 117p.

RAMÍREZ-PÉREZ, M. 2003. Frecuencia de aislamiento de *Vibrio spp*; en muestras de agua, ostión y sedimento en la laguna de Mecoacan, Tabasco; México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 60p

RIVERA, I., Chun, J., Huq, A., Sack, B. y R, Colwell. 2001. Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Enviromental Microbiology*. 67(6): 2421-2429

SAHA, R. y P. Chakrabarti. 2006. Molecular modeling and characterization of *Vibrio cholerae* transcription regulator HlyU. *BMC Structural Biology.* 6(24): 1-13.

SAKAZAKI, R. 1992. Bacteriology of Vibrio and Related Organisms. En: Barua, D. y Greenough, W. 1992. *Cholerae*. Plenium Medical. Pp. 37-45.

SÁNCHEZ, H., Vargas, M. y J, Méndez. 2000. Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. *Salud pública de México*. 42(5):397-406.

SHIMADA, T., Arakawa, E., Itoh, K., Okitsu, T., Matsushima, A., Asai, Y., Yamai, S., Nakazato, T., Nair, G. y J. Albert. 1994. Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology.* 28(3):175-178.

SILVA, Y., Rodríguez, B., Campos, J., Martínez, E., Marrero, K., Suzarte, T., Moreno, A. y R, Fando. 2005. Análisis de la expresión de las pilinas TCP y MSHA de *Vibrio cholerae* en diferentes condiciones de crecimiento *in vitro*. *CENIC Ciencias Biológicas*. 36(1):52-57.

SOLÍS, A. 2005. Aislamiento y caracterización de Vibrio cholerae en los canales de Xochimilco. Tesis de Licenciatura. *Facultad de Estudios Superiores Iztacala*. UNAM. México. 61p.

SORIA, R. 2010. Conservación de cepas de importancia clínica, ecológica y en alimentos, un método alternativo eficaz, sencillo y económico. Tesis de licenciatura. *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. 130p.

TAMPLIN, M., Gauzens, A., Huq, A., Sack, D. y R, Colwell. 1990. Attachment of Vibrio cholerae serogroup 01 to Zooplankton and Phytoplankton of Bangladesh waters. *Environmental Microbiology*. 1977-1980pp.

WAI, S., Mizunoe, Y. y Yoshida, S. 1999. How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiology Letters.* 180(1999): 123-131

WALDOR, M. y J. Mekalanos. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272: 1910-14.

YAMASAKI, S., Garg, S., Balakrish, G. y Y. Takeda. 1999. Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes among O139 and other non-O1 serogroups of *Vibrio cholera*. *FEMS Microbiology letters.* 179(1999):115-121.

8. Conclusiones

1. Se realizó una recuperación del 76% de las cepas de *Vibrio cholerae* aisladas en el año 2005, debido a que el método de conservación no fue a largo plazo.

2. Se identificaron 21 serogrupos diferentes asociados al zooplancton, siendo O35, O127 y O135 los más frecuentes.

3. Comparando con trabajos anteriores, se concluye que los serogrupos O6, O14, O39, O41, O42, O43, O56, O127, O128, O135 y O147 son habitantes permanentes en el sitio de estudio.

4. Los serogrupos O10, O27, O35, O62, O75, O79, O84, O97, O100, y O150 son registros nuevos para Xochimilco, DF.

5. Los serogrupos O10, O27, O75, O79, O84 y O100 son registros nuevos para México.

6. La Isla de Tlilac (zona ecológica) presentó la mayor diversidad de serogrupos.

7. El 93.28% de las cepas analizadas presentaron capacidad hemolítica, lo que representa un riesgo para la población aledaña.

8. Se observó la formación de biopelículas por algunas de las cepas analizadas (rugosas), sugiriendo que *V. cholerae* podría utilizar estas estrategias para permanecer en el cuerpo de agua.

9. Solo se identificaron los genes *toxR* y *hlyA* en las cepas aisladas del zooplancton, lo que significa que son potencialmente patógenas.

10. Fisicoquímicamente, Xochimilco mantiene las características para albergar a la bacteria así como a sus posibles reservorios.

11. Se observó que los copépodos del orden *Cyclopoida* tuvieron la mayor frecuencia en el humedal de Xochimilco con el 64.81%.

12. Se observó la presencia de vibriones, típicos de *V. cholerae*, adheridos a la quitina de organismos del zooplancton, con lo que se confirma que los aislamientos analizados tienen este origen.

13. El análisis de correspondencia mostró que existe una relación directa entre las variables fisicoquímicas, la clorofila-a, la abundancia del zooplancton y la migración de los diferentes serogrupos a la quitina de los mismos.

14. El presente estudio sugiere ampliar los estudios con los serogrupos O35, O127 y O135 por su posible importancia epidemiológica, al presentar la mayor frecuencia tanto en la identificación de los factores de virulencia como en que fueron los serogrupos más abundantes a lo largo del estudio.

15. Con base en la observación de la información obtenida y la relación encontrada estadísticamente entre factores ambientales y organismos, se propone que el reservorio de *V. cholerae* en Xochimilco es el grupo de los crustáceos, principalmente copépodos, tal como se reporta para Bangladesh.

7. Discusión

La recuperación de los cultivos analizados fue del 77%, esto pudo deberse a lo mencionado por Soria (2010) quien reporta que las siembras en gelosa especial son consideradas un método de conservación a corto plazo, mismo que requiere de una recuperación periódica de las bacterias para mantener los cultivos viables, o de lo contrario se corre el riesgo de muerte por falta de nutrientes.

La tipificación serológica arrojó que todas las cepas fueron No O1/No O139, lo que es coincidente con los estudios de Solís (2005) y Luna (2006) para el humedal de Xochimilco. La probabilidad de aislar *Vibrio cholerae* O1/O139 en periodos interepidémicos es prácticamente nula y hasta el día de hoy no se conoce la razón exacta del por qué, sin embargo Dumontier (1998) y Yamasaki (1999) lo asocian a qué los genes encargados de codificar para el antígeno “O” tienen un origen común y que pueden transmitirse mediante transferencia horizontal, por lo que puede expresar otro antígeno y mimetizarse dentro del cuerpo de agua.

Al comparar los 21 serogrupos encontrados con los reportados en otros trabajos, se observó que 9 de estos (O14, O39, O42, O43, O56, O127, O128, O135 y O147) fueron reportados tanto en agua como en raíz de lirio de Xochimilco por Solís (2005); posteriormente Luna (2006) obtiene, para las aguas de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella, que abastece este humedal, cinco serogrupos que también se detectaron en el presente trabajo (O6, O39, O41, O128 y O135). El hecho de que se encontraran en diferentes sustratos y años, sugiere que son habitantes permanentes en este sitio.

Además, confrontando los resultados con los trabajos de Solís (2005) y Luna (2006) se encontró que diez serogrupos: O10, O27, O35, O62, O75, O79, O84, O97, O100 y O150 no se habían reportado con anterioridad para Xochimilco y con relación a lo reportado por Isaac-Márquez et al. (1998) y Beltrán et al. (1999) se encontró que de esos diez serogrupos, seis (O10, O27, O75, O79, O84 y O100) no estaban registrados para México, mientras que los cuatro restantes (O35, O62, O97 y O150) sólo se han reportado con relación a casos clínicos.

Todos los serogrupos encontrados en este trabajo son potencialmente patógenos ya que se sugiere que cualquier cepa que se encuentre en el ambiente puede ser susceptible a la adquisición de los genes de virulencia (Lipp et al. 2002). Esto se refuerza con lo sucedido en 1992 con el serogrupo O139 (causante de la 7ª pandemia), al considerar que este adquirió los genes necesarios para la producción de la toxina colérica ambientalmente mediante transferencia horizontal (Bik et al. 1995).

Los resultados del análisis genético obtenidos en este estudio reflejan que el 82.84% de los aislados recuperados posen el gen *toxR,* Eslava (2009) menciona que este gen forma parte del regulón *toxR-toxT* que es necesario para la activación de la toxina colérica codificada por el gen *ctxA*, que al igual que *tcpA*, dio resultado negativo en la amplificación por PCR. Se ha descubierto que ambos genes son transmitidos a la bacteria por fagos de tipo filamentoso. Waldor en 1996 reporta al fago CTXØ como el transmisor de 6 genes, dentro de los que se encuentran *ctxA-B y zot;* por otra parte, se ha demostrado que el gen *tcpA* proviene del fago VPI, cuyo genoma codifica para TCP, un pili de tipo IV que puede funcionar también como receptor para el fago CTXØ. Por lo tanto, aunque la mayoría de las cepas son potencialmente tóxicas, sólo podrán ser virulentas si adquieren TCP mediante la infección con VPI para después ser infectadas con CTXØ.

Por otra parte al buscar el gen *hlyA* se encontró que gran parte de las cepas analizadas (89.55%) presentaron este gen, Fernández en 2009 reporta que éste codifica para una citolisina de tipo hemolisina, que es utilizada tanto para inducir la apoptosis de las células intestinales, como para la lisis de eritrocitos, que le permitirá a la bacteria tener nutrientes disponibles; esta capacidad citotóxica concordó con en el alto porcentaje de hemólisis observada en los cultivos en agar sangre (93.28%). Las cepas que no tuvieron capacidad hemolítica probablemente carecen del gen *hlyU* que regula el gen *hlyA* (Saha, 2006). La presencia en casi todas las cepas de los genes *toxR*, *hlyA* y la capacidad de producir hemólisis

completa alerta sobre el potencial de las mismas para desencadenar cuadros clínicos si las condiciones las favorecen.

Particularmente el serogrupo O135 presentó el número más elevado de aislamientos, lo que no es sorpresivo dado que en los aislamientos de *Vibrio* realizados por Solís (2005) en Xochimilco, también fue el serogrupo predominante, además parece ser una cepa ampliamente distribuida y persistente en el país, de acuerdo con lo reportado por Beltrán (1999) y Ramírez-Pérez (2003).

De acuerdo a los resultados de Solís (2005), para las mismas estaciones aquí estudiadas, se observó que el serogrupo O135 fue más abundante desde el mes de noviembre del 2002 hasta marzo del 2003, lo que es coincidente con los resultados aquí presentados para aislamientos de zooplancton pero en el año 2005. Además, analizando el comportamiento del resto de los serogrupos abundantes en su estudio (principalmente O14), se observan mayores aislamientos en los meses de mayor temperatura (marzo a junio), este comportamiento se observó en varios serogrupos aislados en este estudio (O35, O41, O62, O100 y O127) lo que sugiere que prefieren temperaturas más elevadas, Huq et al. (2005) mencionan que la incidencia de la bacteria aumenta cuando se presentan temperaturas superiores a los 22°C. Lo anterior se observa en los resultados del Análisis de Correspondencia Canónica (CANOCO), en el que se aprecia una estrecha relación de cuatro de estos serogrupos (O62, O35, O100 y O127) con la temperatura.

El hecho que el serogrupo O135 haya sido aislado del agua durante los meses más fríos, sugiere que posee estrategias para su supervivencia bajo estas condiciones, Wai *et al.* (1999) reportan que una de las principales estrategias de *V. cholerae* para permanecer en cuerpos de agua no estuarinos es la producción de polisacáridos extracelulares que le permiten adherirse a diferentes sustratos, sin embargo al parecer esta característica no es la principal estrategia de O135, ya que mostró bajos porcentajes en la formación de biopelículas. Por otra parte, los resultados del CANOCO reflejan una correlación alta entre el zooplancton y este serogrupo, lo que permite inferir que el caparazón quitinoso es un sustrato

importante, idea que se refuerza con la observación de vibriones en Copépodos mediante la tinción con DAPI. Este comportamiento ha sido ampliamente documentado por Huq *et al* (1983), Faruque *et al* (1998) y Constantin (2008) quienes reportan que cepas No O1/No O139 en presencia de copépodos vivos dejan su forma planctónica y en su lugar, se adhieren a la superficie de crustáceos, preferentemente copépodos y cladóceros que son de mayor talla entre los organismos del zooplancton.

En las muestras analizadas se observó la presencia de los géneros *Daphnia* sp*, Chydorus* sp *y Alona* sp (Cladócera) al igual de lo que reporta Nandini et al. (2005) para el humedal de Xochimilco, además se encontraron también integrantes del orden Cyclopoida (Copépoda), mismos que fueron reportados por Enríquez et al. (2009) para el sitio de estudio. Todos los integrantes del zooplancton mencionados fueron identificados también por Mozumder et al. (2012) en Bangladesh y se han relacionado con la presencia de *V. cholerae* en ese sitio; por lo tanto, en Xochimilco se presentan los organismos a los cuales tiene afinidad *V. cholerae.*

También se observó en el CANOCO que dos serogrupos (O27 y O41) están estrechamente relacionados con la clorofila-a —que fue utilizada como medida indirecta del fitoplancton ya que no se hicieron conteos de algas—, Tamplin (1990) menciona que integrantes de *Vibrio cholerae* se adhieren a individuos del fitoplancton, principalmente a *Volvox* sp., en el caso del humedal de Xochimilco no se encontraron reportes de esta alga lo que permite inferir que al no haber afinidad a las especies presentes, la bacteria se refugia en el zooplancton.

La migración de los serogrupos hacia el zooplancton podría estar determinada por los parámetros ambientales utilizados para el análisis de correspondencia. Huq et al. (1996) reporta como valores óptimos para la permanencia de *V. cholerae*, en su forma planctónica, una conductividad mayor a los 100µS, concentraciones de OD de hasta 11mgL^{-1} y pH alcalino. En este estudio sólo hubo coincidencia en los valores de pH mientras que el OD presentó los valores más bajos con 3.4 mgL^{-1} y en el caso de la conductividad dado el tipo de agua residual

con la que se mantienen los niveles del humedal, presentó valores mínimos de 540 µS cm^{-1}, lo que orilló a la bacteria a buscar un refugio. Finalmente se observó que cerca del 50% de los serogrupos se asocia con la temperatura y la presencia de materia orgánica (BOD_5), Borroto (1997) la menciona como un sustrato importante por su contenido de nutrientes y que aunado a temperaturas superiores a los 22°C (registradas de mayo a agosto) favorecen la permanencia de *Vibrio cholerae* en el agua como organismo de vida libre y su posibilidad de adherirse a los reservorios presente en el ambiente acuático.