

59
2e



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



CORRELACION DEL NIVEL DE CONTAMINACION POR COLIFORMES Y SALMONELAS EN AGUAS NEGRAS PARA RIEGO, CON LA CARGA BACTERIANA DE LAS HOJAS Y TALLOS DE LA ALFALFA *Medicago sativa* FRESCA Y ACHICALADA.

T E S I S

Que para obtener el Título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a:
José Luis Díaz Miranda

Asesores: M.V.Z. Ismael Escamilla Gallegos
Biologa Gloria Oralia Pacheco
M.V.Z. Pedro Ochoa Galván

México, D. F.

1988



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 está 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.

CONTENIDO

| | <u>Páginas</u> |
|-------------------------|----------------|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCION,..... | 2 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 6 |
| RESULTADOS..... | 20 |
| CUADROS..... | 24 |
| DISCUSION..... | 37 |
| LITERATURA CITADA..... | 40 |

RESUMEN.

DIÁZ MIRANDA JOSE LUIS.- Correlación del nivel de contaminación por coliformes y salmonelas en aguas negras para riego, con la carga bacteriana de las hojas y los tallos de la alfalfa Medicago sativa fresca y achicalada. (bajo la dirección de: Ismael Escamilla Gallegos, Pedro Ochoa Galván y Gloria Oralia Pacheco).

El presente estudio consistió en buscar las relaciones entre las cargas bacterianas de las aguas negras, alfalfa Medicago sativa fresca y achicalada en el Municipio de Ajacuba, en el Estado de Hidalgo, así como la frecuencia y distribución de generos y especies bacterianos. Para ello se establecieron 2 sitios de muestreo, identificados como "A" y "B". Para las aguas negras se encontraron cargas bacterianas elevadas con numeros mayores a 300 colonias en la dilución 10^{-5} , y sus principales generos bacterianos fueron E.coli y Enterobacter spp. respectivamente. Tanto la alfalfa fresca como la achicalada mostraron cargas bacterianas muy inferiores a las obtenidas en las aguas negras, que van desde 160 hasta 320 veces menos; los principales generos encontrados en los dos tipos de alfalfa fueron Enterobacter spp. y E.coli, respectivamente. Se concluye que la carga y tipos de bacterias encontradas en el agua representan un riesgo de importancia en Medicina Veterinaria así como en Salud Pública, mientras que en la alfalfa fresca y achicalada, las cargas y los generos bacterianos mas frecuentemente aislados, no representan un peligro potencial para la salud de los animales al ser utilizado como forraje.

I N T R O D U C C I O N .

El sector agropecuario se debe considerar como un pilar dentro de la economía nacional; su participación es de vital importancia como productor de alimentos básicos para la población demandante, generadora de divisas en la exportación y fuente importante de empleos (7,24).

Es por ello que se deben buscar sistemas orientados a alcanzar un aumento de la producción agrícola, con su correspondiente beneficio en la pecuaria, logrando con ello una menor dependencia del extranjero y la autosuficiencia alimentaria (7,24).

La alfalfa Medicago sativa ha llegado a ocupar un lugar prominente dentro de las plantas forrajeras, por superar en rendimiento a otras plantas henificables, por su gustosidad para el ganado, su riqueza en proteínas y su elevado contenido de calcio y vitaminas, principalmente en carotenos, además por beneficiar al suelo en que se cultiva fijando a este el nitrógeno del aire (22).

Ya sea en heno, en verde o en harina, la alfalfa es insuperable como forraje para la alimentación del ganado bovino lechero, en México es el principal forraje que se le suministra a dicho ganado (22).

Se produce en casi todos los Estados de la República, ocupando los primeros lugares aquellos cercanos a las cuencas lecheras, principalmente Tizayuca, (Hidalgo), Querétaro, Puebla y Jalisco en el centro; Chihuahua, Baja California y Coahuila en

el norte. (7,22).

Los principales terrenos en donde se cultiva son de riego - con diferentes modalidades como son la aspersión, el rodado con agua de pozo y el rodado con aguas negras procedentes de las ciudades e industrias (7,22).

Como consecuencia del riego con aguas negras se pueden ocasionar enfermedades a los animales y al hombre. Es por ello que se deben estudiar y desarrollar sistemas para conocer el riesgo - en salubridad animal y del hombre al utilizar estas aguas (2,9).

Para el perfeccionamiento de dichos sistemas se hace necesario un profundo estudio del medio ambiente de la zona, que muestre los aspectos físicos, químicos y biológicos con el fin de conocer el potencial productivo de ésta, así como los riesgos que se corren en materia de contaminación (22,25,26).

El reuso del agua en nuestro país es de vital importancia como un medio de satisfacer la demanda del líquido en aquellas zonas en donde no es disponible a costos accesibles para el riego - (1,17,27).

Esto implica grandes ventajas para la producción agrícola y la recarga de mantos acuíferos, pero también puede ocasionar graves riesgos en su utilización (12,19,27).

Uno de ellos es la contaminación de suelos por metales pesados, material radioactivo, detergentes, pesticidas, cambios térmicos derivados y otros agentes químicos que inevitablemente causarán pérdidas considerables en la agricultura (8,12,14,19,23).

Considerando el riego con aguas negras desde el punto de vista de la posible contaminación bacteriana, existe la posibilidad de que algunos microorganismos queden retenidos en la superficie de los vegetales, además los desniveles de las parcelas y el riego por inundación facilitan la presencia de bacterias contaminantes en éstos, como es el caso de la alfalfa (2,18,23,26).

Por otro lado se debe considerar que los afluentes al infiltrarse hacia el subsuelo, pueden alcanzar al manto acuífero, incorporándose al mismo y contaminando el agua subterránea. (11,18,25).

Las bacterias del grupo coliforme se han utilizado para detectar la ocurrencia y grado de contaminación fecal en aguas en muchos países desde hace setenta años aproximadamente (4,12,16,25,27).

De acuerdo al número probable de coliformes por mililitro presentes en las aguas, estas se pueden considerar potables o no de acuerdo a la legislación sanitaria vigente en cada país (16,25,27).

La presencia de estas bacterias en animales jóvenes de todas las especies suelen traer consecuencias de gravedad llegando a causar brotes con elevada mortalidad y morbilidad, provocando grandes pérdidas económicas no solo por mortalidad, sino por atraso en el crecimiento (3,9,13).

No se considera igual para los animales adultos, ya que estos llegan a desarrollar cierta inmunidad y quedar como por

tadores asintomáticos. (3,9,11,13).

La causa más frecuente de colibacilosis y salmonelosis en los animales es el consumo de forrajes y alimentos contaminados y en grado mayor si éstos han sido regados por aguas negras de procedencia humana. (3,9,11).

Las salmonelas están por lo general presentes en los alimentos contaminados junto a otros muchos microorganismos como son: Escherichia coli, Enterobacter spp., Proteus spp., Citrobacter spp., etc. (16).

Hipótesis.- A partir del estudio en aguas negras y alfalfa fresca y achicalada Medicago sativa de Ajacuba, Hidalgo, se puede obtener una relación de la carga bacteriana existente en las 3 muestras de estudio, esperando disminución de cargas en la alfalfa fresca con respecto al agua y de la alfalfa achicalada con respecto al agua y a la alfalfa fresca, respectivamente.

Objetivos.- Encontrar las relaciones de cargas y géneros bacterianos involucrados en las aguas negras de riego con la alfalfa fresca y achicalada, para así, poder evaluar el riesgo potencial que representa esta planta en la alimentación animal.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

Descripción del área de estudio.- Este trabajo se realizó en el Municipio de Ajacuba en el Estado de Hidalgo, localizado entre las latitudes 20° 08' y 20° 10' con una altura de 2100 m.s.n.m. Con una temperatura media anual de 17°C y una precipitación pluvial media anual de 386.8 mm. (10,18).

El tipo de suelo es semidesértico con una capa rica en materia orgánica. (18).

Dada su ubicación y vías de comunicación con Tula, Pachuca, Tulancingo, Tizayuca y por la autopista México-Querétaro hacia ambas ciudades (ver mapa No. 1), este Municipio adquiere gran importancia como centro de producción agrícola para la alimentación animal, especialmente el ganado bovino productor de leche; los principales productos cosechados en esta zona son el maíz, frijol y alfalfa. (18).

Métodos de Muestreos.- Se establecieron dos lugares para la colecta de agua y alfalfa como ruta crítica de muestreo, mismos que se identificaron para fines del estudio como "A" y "B", ambos lugares de muestreo se encuentran del lado derecho en relación al camino Tlaxcoapan-Ajacuba. (ver mapa No. 2).

El sitio "A" se localiza hacia el Km. 2 de dicha carretera, sobre la primera arboleda, y el sitio "B" ubicado aproximadamente a 1.3 Km adelante del punto "A" e identificado por dos postes marcados con propaganda comercial. (ver mapa No. 2).

La distancia existente entre un punto y otro obedece a que las parcelas cultivadas pertenecen a diferentes propietarios, los

cuales debido a sus propios intereses siembran además de alfalfa, otro tipo de vegetales.

Se realizaron diez distintos muestreos aleatorios en los dos sitios cada mes, durante tres meses consecutivos del año de 1987, iniciándose estos en el mes de Junio. Dichos muestreos fueron realizados dentro del tercer lunes de cada mes a las 7.00 Horas, con el objeto de evitar variables en las cargas bacterianas.

Las colectas de agua se hicieron tanto del canal de riego mas cercano como de las acequias, en número de diez por cada estación y por cada muestreo. En el caso de las plantas Medicago sativa, el número de muestras fué el mismo que para el agua.

Obtención de muestras.- Para el agua se utilizaron frascos de vidrio estériles, con capacidad de 250 ml, habiéndose recolectado un mínimo de 100 ml a una profundidad promedio de 40 cm. aproximadamente. (16).

En el caso de la alfalfa Medicago sativa se utilizaron guantes estériles, bolsas nuevas de polietileno y tijeras previamente flameadas con alcohol entre colecta y colecta, la cual fué de un mínimo de 750 g por bolsa, se buscó tomar la base de las plantas, así como también hojas de éstas.

Envío de muestras.- Una vez colectadas, fueron transportadas en cajas de unicele con hielo y refrigerantes para su remisión al laboratorio, en donde fueron debidamente admitidas y registradas en un tiempo no mayor de cuatro horas.

Se utilizaron 500 g de cada muestra obtenida para realizar un proceso de achicalado en el laboratorio, es decir, fué desecada al sol en cajas de aluminio estériles y previamente i-

dentificadas, posteriormente se procedió a su análisis bacteriológico.

Métodos de laboratorio.- Para la realización de éste trabajo se utilizaron métodos de análisis cualitativos y cuantitativos para las aguas negras, alfalfa fresca y alfalfa achicalada.

Aguas negras.- El análisis cualitativo consistió en colocar 10 ml de la muestra previamente agitada en un tubo con campana de Durham que contenía 10 ml de caldo lactosado (Merck) doble concentración, esta operación se realizó en un total de 5 tubos por cada muestra, luego se incubaron a 37°C durante 24 horas, al cabo de las cuales, se observó la presencia o ausencia de gas en la campana de Durham en cada uno de los tubos (Prueba presuntiva). Los resultados fueron anotados en la hoja de registro correspondiente (ver hoja de registro).

De los tubos con presencia de gas, se tomó una pequeña cantidad de muestra con un asa bacteriológica estéril y se sembró en agar de Mac Conkey y agar verde brillante (Merck) por el método de aislamiento en cultivo puro (6). Posteriormente se incubaron las placas en forma invertida a 37°C durante 24 horas (Prueba confirmativa). Los resultados fueron anotados en la hoja de registro correspondiente.

Transcurrido éste tiempo se observó el crecimiento de colonias bacterianas, en las cuales se observó: tamaño, morfología, color y olor. La morfología microscópica y la afinidad tintorial se determinaron mediante la técnica de Gram. (21).

Aquellas colonias sospechosas de ser coliformes se les procedió a inocular en un tubo con campana de Durham conteniendo

10 ml de caldo lactosado (Merck) concentración normal (Prueba completa). Los resultados fueron anotados en la hoja de registro correspondiente.

A partir de las colonias antes mencionadas, se realizaron las respectivas pruebas bioquímicas para la identificación del género y especie que se trataban, dichos medios fueron: agar triple azúcar y hierro (TSI)*; agar citrato de Simmons*; agar de hierro y lisina (LIA)*; agar urea*; ácido sulfhídrico, indol y motilidad (SIM)*.

Para la interpretación de resultados del T.S.I. se utilizó el cuadro No. 1.

La interpretación de resultados con pruebas bioquímicas en la identificación de enterobacterias fué basada en el cuadro No. 2

Para la interpretación de resultados en el agar de hierro y lisina (LIA) se utilizó el cuadro No. 3.

Análisis cuantitativo.- Consistió en hacer diluciones decimales de las muestras, desde 10^{-1} hasta 10^{-5} (ver cuadro No. 4). una vez hechas las diluciones en tubo, se procedió a depositar 1 ml de la muestra en cajas de Petri estériles, posteriormente se agregaron 5 ml de agar triptosa (Merck) previamente fundido en baño maría a temperatura de 30-40°C. se homogeneizó la mezcla; las placas se colocaron sobre una superficie plana, sin moverlas para que se solidificara el agar. Estas se incubaron en posición invertida en la estufa bacteriológica a temperatura de 37°C durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo se hicieron las lecturas para conteo de colonias a cada dilución y se anotaron en la hoja corres-

* Merck.

pondiente al número de la muestra (ver hoja de registro).

De cada muestra se realizó una siembra en gelatina nutritiva (Merck) utilizando 5 ml de dicho medio y 1 ml de la muestra sin diluir previamente agitada; dejando incubar en la estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas. Transcurrido éste tiempo se hicieron las lecturas para la licuefacción de la gelatina, producción de pigmentos, así como de mal olor. Haciendo hincapié en que las muestras se refrigeraron 15 minutos antes de efectuar las lecturas con la finalidad de evitar falsos positivos en la licuefacción de la gelatina. Dando como positivos aquellos que permanecieron líquidos y como negativos aquellos en donde el medio solidificó. Los resultados se anotaron en la hoja de registro correspondiente. (20, 21).

Alfalfa fresca.- El análisis cuantitativo consistió en colocar 200 ml de solución salina fisiológica (S.S.F.) mas 100 g de muestra previamente triturada en una licuadora cuyo vaso y agas fueron previamente esterilizados. Se utilizó el jugo residual de la molienda entre la muestra de alfalfa fresca y la solución salina fisiológica (S.S.F.) para después centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 min al cabo de los cuales se procedió a hacer un frotis a partir del sedimento de cada tubo de centrifugación, para luego ser teñido mediante la técnica de Gram.

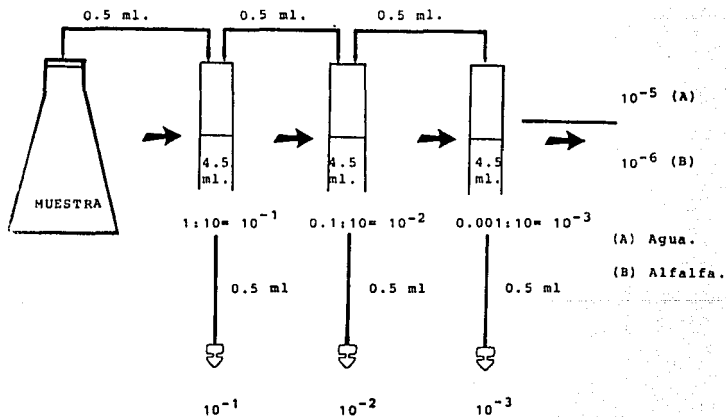
A partir del sobrenadante de cada uno de los tubos se realizó una siembra en caldo selenito (Merck) y un proceso de dilución.

Para la siembra en caldo selenito, se tomó 1 ml de muestra con una pipeta calibrada y se depositó en 10 ml del medio de cultivo envasado en tubo con tapón de rosca, se agitó para homo-

geneizar la muestra en dicho medio y posteriormente se sometió a proceso de incubación a 37°C durante 18 horas, al cabo de las cuales se resembró en agar verde brillante (Merck). (20,26).

El proceso de dilución consistió en colocar para cada una de las muestras 4.5 ml de solución salina fisiológica (S.S.F.) con 0.5 ml de sobrenadante a partir del centrifugado, luego se sometió a un proceso de mezclado con un agitador de tubos para dejar perfectamente homogeneizada la mezcla y obtener la dilución 10^{-1} . A partir de esta se procedió a sembrar en la mitad de la placa de agar verde brillante (Merck) a razón de 4 gotas de 20 microlitros cada una, utilizando para ello una pipeta Eppendorf. Las gotas se dejaron secar antes de incubar las placas. Este procedimiento se efectuó de igual manera hasta alcanzar la dilución 10^{-6} . (ver cuadro anexo).

Cuadro No. 4 Diluciones decimales para análisis cuantitativos.



Las cajas de agar ya sembradas fueron sometidas a incubación por 24 horas a 37°C, al cabo de las cuales se realizaron las lecturas correspondientes contando el número de colonias a cada dilución. Una vez obtenido y anotado el dato en la hoja de registro, se calculó el número probable de colonias por gramo de muestra mediante la transformación de cifras exponenciales.

Para la realización del análisis cualitativo se utilizó la muestra sembrada en caldo selenito incubado previamente a 37°C durante 18 horas, en la cual se observó el enturbiamiento del medio por el crecimiento bacteriano. A partir de ésta se sembró en agar verde brillante (Merck), se incubó a 37°C durante 24 horas y al cabo de estas se hizo la lectura de morfología, coloración y morfología microscópica por la tinción de Gram.

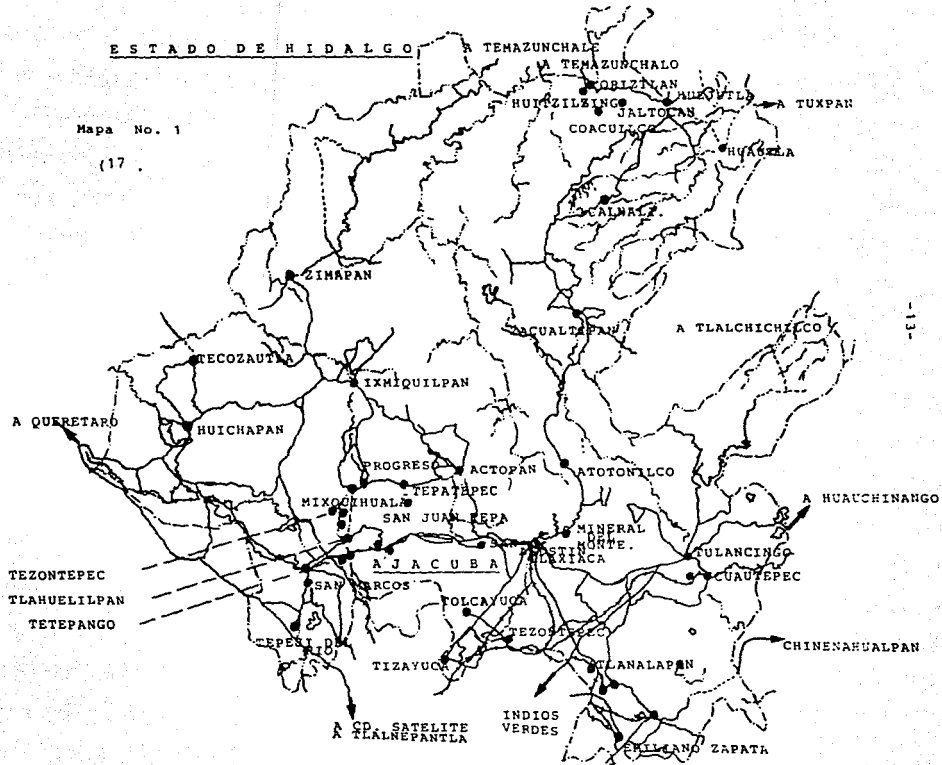
Una vez hecho lo anterior, se clasificaron las colonias de acuerdo a su coloración en el agar y su afinidad tintorial como enterobacterias fermentadoras de la lactosa y como no fermentadoras de esta; para después realizar las pruebas bioquímicas correspondientes antes mencionadas para la identificación de enterobacterias aisladas de aguas negras.

Alfalfa achicalada.- Tanto los estudios cualitativos como cuantitativos se realizaron de igual manera que en el estudio de la alfalfa fresca; las pruebas bioquímicas y cuadros de referencia fueron los mismos que para el estudio de aguas negras.

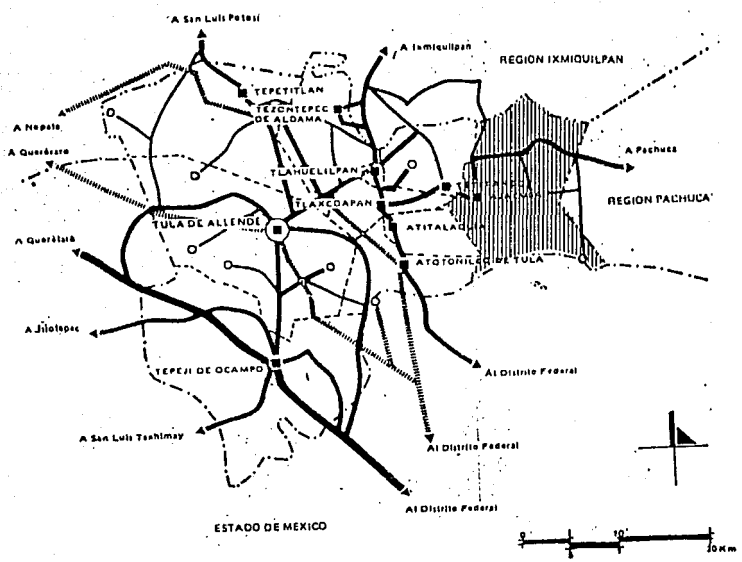
ESTADO DE HIDALGO

Mapa No. 1

(17)



Mapa No. 2. Ambito municipal del Estado de Hidalgo.



Cuadro No. 1

Interpretación de resultados en el medio de triple azucares y hierro (TSI).
expresado en números de reacciones.

| REACCION APARIENCIA | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|------|----------|
| SUPERFICIE | AMARILLA | ROJA | ROJA | AMARILLA | ROJA | AMARILLA |
| FONDO | AMARILLO | AMARILLO | AMARILLO | AMARILLO | ROJO | AMARILLO |
| PROD. DE GAS | + | + | V | V | - | - |
| PRODUCCION DE SULFURO DE H. | - | + | - | + | - | - |

+ = positivo - = negativo V = variable

AMARILLA = Fermentación de carbohidratos.

ROJO = No fermentación de carbohidratos.

Cuadro No. 2

Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias.

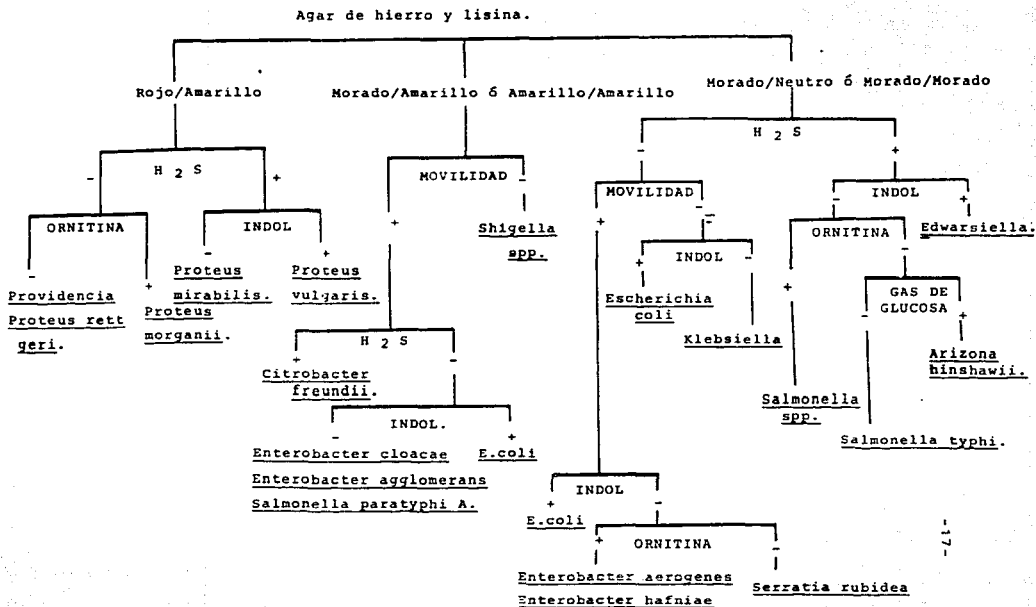
| | A | B | C | D | E | F |
|----------------------------|-------|-------|------|----------------|---|-------|
| OXIDASA | - | - | - | - | - | - |
| T S I | 1-3-4 | 1-2-4 | 1-3- | 2-3-4 | 4 | 2-3-4 |
| LACTOSA | + | V | + | - | - | - |
| INDOL | + | - | - | - | + | - |
| UREA | - | + | + | - | + | + |
| CITRATO | - | - | + | + | - | - |
| MOTILIDAD | V | + | - | + ^a | + | + |
| H ₂ S | - | + | - | + | + | + |
| LISINA DESCAR- BOXILASA | + | - | + | + | - | - |
| FENIL ALANINA DEAMINASA | - | - | - | - | + | + |

+ = positivo - = negativo V = variable
 a = S. gallinarum y S. pullorum son inmóviles.

- A) E. coli
 B) Citrobacter freundii
 C) Klebsiella pneumoniae
 D) Salmonella spp.
 E) Proteus vulgaris
 F) Proteus mirabilis

Cuadro No. 3 Identificación bacteriana utilizando el agar de hierro y lisina.

(4).



ANALISIS BACTERIOLOGICO DE AGUA

ANALISIS CUALITATIVO

| 1.- PRUEBA PRESUNTIVA. CALDO LACTOSADO. | | |
|---|-----------------|------------------------------------|
| NO. DE TUBOS | TUBOS POSITIVOS | NO. PROBABLE DE COLIFORMES POR LT. |
| 1 | | 20 |
| 2 | | 50 |
| 3 | | 90 |
| 4 | | 160 |
| 5 | | MAS DE 160 |

2.- PRUEBA CONFIRMATIVA. SIEMBRA EN MEDIO DE MAC CONKEY.

RESULTADO.

3.- PRUEBA COMPLETA. CALDO LACTOSADO.

RESULTADO.

ANALISIS CUANTITATIVO.

1.- DILUCIONES.

| | |
|-----------------------|----------|
| A) DILUCION 10^{-1} | COLONIAS |
| B) DILUCION 10^{-2} | COLONIAS |
| C) DILUCION 10^{-3} | COLONIAS |
| D) DILUCION 10^{-4} | COLONIAS |
| E) DILUCION 10^{-5} | COLONIAS |

2.- PRUEBA DE LA GELATINA.

- A) PRODUCEN PIGMENTO
- B) PRODUCEN MAL OLOR
- C) LICUAN LA GELATINA

DIAGNOSTICO.

DESDE EL PUNTO DE VISTA BACTERIOLOGICO EL AGUA ES: _____

Análisis estadístico.- El conteo bacteriano fué transformado de su escala logarítmica de la siguiente manera; para calcular el número de bacterias presentes en la suspensión se cuenta el número de colonias desarrolladas en el lugar donde se colocaron las gotas de muestra y se dividió entre el número de gotas para obtener el promedio de colonias por gotas, después se multiplicó por el factor adecuado para obtener 1ml del inóculo y por el factor de dilución correspondiente, es decir, (Número promedio de colonias por gota) X 12.5 (Para convertir 8 μ l a 1ml) = (Bacterias por gramo de la dilución) X (Factor de dilución) = Bacterias por gramo de muestra (UFC/g.) (15).

De cada muestra se obtuvo la identificación del género y especie bacteriano y además, fué calculada la frecuencia para cada uno de ellos de acuerdo a la metodología de Daniels, clasificándolos por sitio de muestreo, género y especie (4).

El total de muestras obtenidas al final de las 3 repeticiones fué de 180, es decir, 90 por cada estación de muestreo, de los cuales 30 fueron para aguas negras, 30 para alfalfa fresca y 30 para alfalfa achicalada.

R E S U L T A D O S .

I.- Aguas negras.

En los análisis cualitativos de aguas negras se obtuvieron los siguientes resultados:

1.- Prueba presuntiva.- El 100% de las muestras durante los 3 muestreos fermentó el caldo lactosado doble concentración, lo cual estadísticamente indica un número probable de coliformes mayor a 160 por litro de muestra.

2.- Prueba confirmativa.- Todas las placas sembradas en agar de Mac Conkey, registraron crecimiento de colonias características de enterobacterias fermentadoras de la lactosa; estas se seleccionaron por colores, los cuales fueron blanco o rojo. En el 100% de las colonias se observaron bacilos Gram negativos.

3.- Prueba completa.- De las muestras que se inocularon al caldo lactosado concentración normal, resultaron ser fermentadoras de la lactosa en un 100%.

El aislamiento de bacterias por género y especie se muestran en los cuadros 5 y 6, los cuales, resumen los porcentajes obtenidos en los sitios "A" y "B"; las gráficas 1 y 2 indican la distribución porcentual en ambos sitios.

En los análisis cuantitativos se obtuvieron crecimientos mayores a 200 colonias por placa de agar (incontables) a la mayor dilución, es decir 10^{-5} , el 100% de las muestras fueron positivas a la prueba de la gelatinasa, con producción de pigmentos y mal olor.

II.- Alfalfa fresca.- En los análisis cualitativos se obtu-

vieron crecimientos de colonias bacterianas sospechosas de ser coliformes en el agar de Mac Conkey y en agar verde brillante, - es decir, rojas y verdes respectivamente. La morfología microscópica mostró que el 100% de las colonias eran bacilos Gram negativos. El detalle porcentual de cada género y especie durante los 3 muestreos se encuentra resumido en los cuadros 7 y 8, indicando el sitio "A" y "B" respectivamente. Las gráficas 3 y 4, - muestran la distribución porcentual para ambos puntos.

En lo referente a las pruebas cuantitativas, resultó que a las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , el número de colonias obtenidas fué abundante y no permitió un conteo confiable en ninguno de los sitios de muestreo durante todo el estudio.

En la dilución 10^{-3} se obtuvieron crecimientos de colonias en números confiables para su conteo, es decir, un rango de 1 a 4 colonias contables promedio por gota de muestra; esto no indica que el total de placas sembradas registrara crecimiento ya que se observó un 35% sin crecimiento en el sitio "A" y un 29% en el sitio "B", a lo largo de los tres muestreos.

La dilución 10^{-4} registró un crecimiento muy escaso de colonias, pero es a partir de ésta donde se obtuvieron los valores máximos de cargas bacterianas, tanto en el sitio "A" como en el sitio "B".

Las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} no registraron desarrollo de colonias en ningún muestreo y lugar de colección.

El máximo obtenido en la dilución 10^{-3} para el sitio "A", se registró durante el segundo muestreo, alcanzando un crecimiento promedio de colonias por gota de muestra de 3, lo que se traduce

según los factores de conversión en 37,500 UFC/g.

El máximo observado en el sitio "B" fué de 4 colonias promedio por gota. Dicho resultado fué obtenido durante el tercer muestreo y corresponde según los factores de conversión a 50,000 UFC/g.

Para la dilución 10^{-4} , el desarrollo de colonias en el sitio "A" fué de 1.5 en promedio por gota; observando solo una caja de agar con crecimiento de colonias, la cual correspondió al segundo muestreo. En el primer y tercer muestreos no hubo crecimiento en ninguna placa de agar.

Una vez hecha la conversión de unidades, el número de UFC/gr. fué de 187,500.

En el sitio "B" de igual manera, solo se obtuvo una placa de agar con crecimiento de colonias durante todo el estudio y fué en el tercer muestreo con una colonia promedio por gotas de muestra. Esto equivale a 125,000 UFC/g.

III.- Alfalfa achicalada.- En los análisis cualitativos se encontró un crecimiento bacteriano en las placas de agar igual a las obtenidas con la alfalfa fresca, es decir, sospechosas de ser coliformes. La morfología microscópica y afinidad tintorial por la técnica de Gram, fué también igual a la alfalfa fresca. Los porcentajes en género y especie obtenidos en los sitios "A" y "B" durante los 3 muestreos, se pueden observar en los cuadros 9 y 10. Las gráficas 5 y 6 muestran su distribución porcentual.

Para las pruebas cuantitativas, al igual que en la alfalfa fresca, el crecimiento de colonias bacterianas quedó comprendido

entre las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , ya que en la 10^{-1} y 10^{-2} el crecimiento fué abundante, no así en la 10^{-5} y 10^{-6} en donde no se observó ninguno.

Para la dilución 10^{-3} en el sitio "A" se registró un crecimiento máximo de 4.75 colonias promedio por gotas de muestra, correspondiente al segundo muestreo, lo que significa que el crecimiento más alto para el sitio "A", en esta dilución fué de - 59,375 UFC/g.

En el sitio "B", el mayor desarrollo de colonias en la dilución 10^{-3} se registró durante el tercer muestreo con un máximo de 5 colonias promedio por gotas de muestra, equivalente a 62,500 UFC/g.

Para la dilución 10^{-4} , en el sitio "A" se registró como mayor crecimiento de colonias en el segundo muestreo con 1.25 colonias promedio por gotas de muestra, esto indica 156,250 UFC/g. En el sitio "B", se obtuvo el mayor crecimiento de colonias en el tercer muestreo con un máximo de 0.75 colonias promedio por gotas de muestra, lo que significa un total de 93,750 UFC/g.

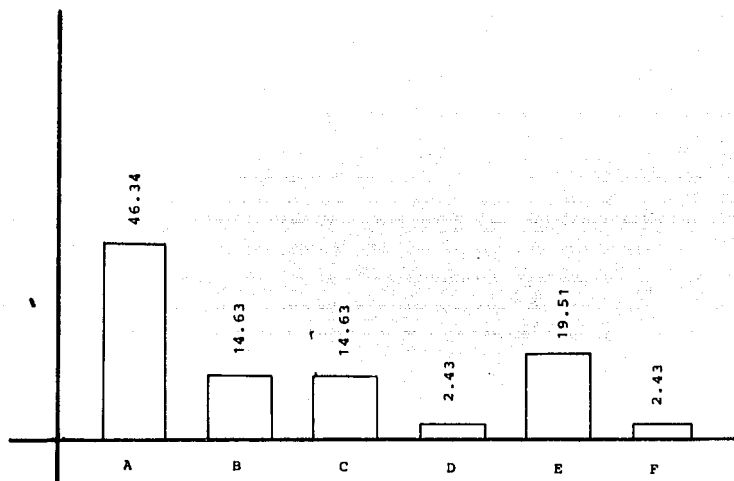
Cuadro No. 5

Identificación y porcentaje bacteriano en aguas negras en el sitio "A" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.

| GENERO Y ESPECIE. | MUESTREO | | | TOTAL | PORCENTAJE |
|---|----------|----|----|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| <u>E. coli.</u> | 6 | 6 | 7 | 19 | 46.34 |
| <u>Enterobacter spp.</u> | - | 2 | 4 | 6 | 14.63 |
| <u>Citrobacter spp.</u> | - | 2 | 4 | 6 | 14.63 |
| <u>Yersinia spp.</u> | 1 | - | - | 1 | 2.43 |
| <u>Proteus spp.</u> <u>E. coli</u> | 5 | 3 | - | 8 | 19.51 |
| <u>Proteus spp.</u> <u>Enterobacter spp.</u> | 1 | - | - | 1 | 2.43 |
| TOTAL. | 13 | 13 | 15 | 41 | |

Gráfica No. 1

Identificación y porcentaje bacteriano en aguas negras en el sitio "A" durante los tres muestreos mediante pruebas bioquímicas.



- A) E. coli.
 B) Enterobacter spp.
 C) Citrobacter spp.
 D) Yersinia spp.
 E) Proteus spp. y E. coli
 F) Proteus spp. y Enterobacter spp.

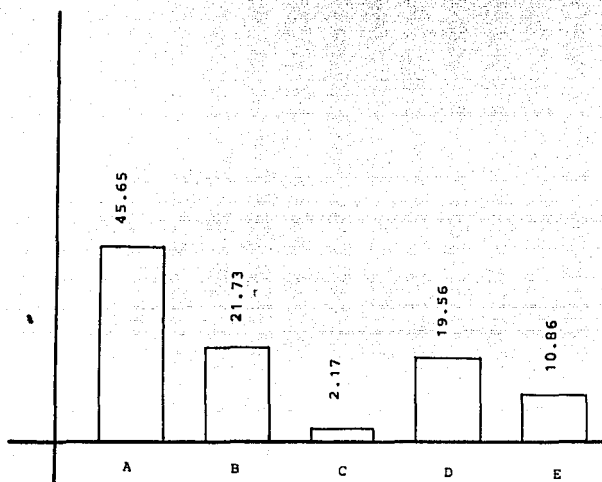
Cuadro No. 6

Identificación y porcentaje bacteriano en aguas negras en el sitio "B" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.

| GENERO Y ESPECIE | MUESTREO | | | TOTAL | PORCENTAJE |
|---|----------|----|----|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| <u>E. coli.</u> | 6 | 6 | 9 | 21 | 45.65 |
| <u>Proteus</u> spp. <u>E. coli</u> | 6 | 4 | - | 10 | 21.73 |
| <u>Proteus</u> spp. <u>Enterobacter</u> spp. | 1 | - | - | 1 | 2.17 |
| <u>Enterobacter</u> spp. | - | 3 | 6 | 9 | 19.56 |
| <u>Citrobacter</u> spp. | - | 2 | 3 | 5 | 10.86 |
| TOTAL. | 13 | 15 | 18 | 46 | |

Gráfica No. 2

Identificación y porcentaje bacteriano en aguas negras en el sitio "B" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.



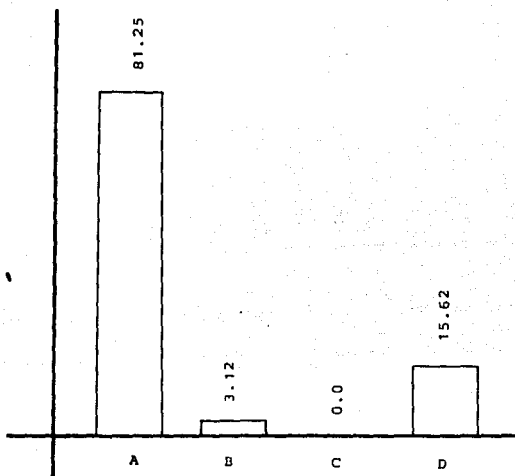
- A) E. coli.
- B) Proteus spp. y E. coli.
- C) Proteus spp. y Enterobacter spp.
- D) Enterobacter spp.
- E) Citrobacter spp.

Cuadro No. 7

Identificación y porcentaje bacteriano en alfalfa fresca en el sitio "A" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.

| GENERO Y ESPECIE | MUESTREO | | | TOTAL | PORCENTAJE |
|---|----------|----|----|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| <u>Enterobacter</u> spp. | 7 | 11 | 8 | 26 | 81.25 |
| <u>Enterobacter</u> spp. <u>Citrobacter</u> spp. | 1 | - | - | 1 | 3.12 |
| <u>Enterobacter</u> spp. <u>Proteus</u> spp. | - | - | - | - | - - |
| Sin crecimiento. | 2 | 1 | 2 | 5 | 15.62 |
| TOTAL. | 10 | 12 | 10 | 32 | |

Identificación y porcentaje bacteriano en alfalfa fresca en el sitio "A" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.



- A) Enterobacter spp.
B) Enterobacter spp. y Citrobacter spp.
C) Enterobacter spp. y Proteus spp.
D) Sin crecimiento.

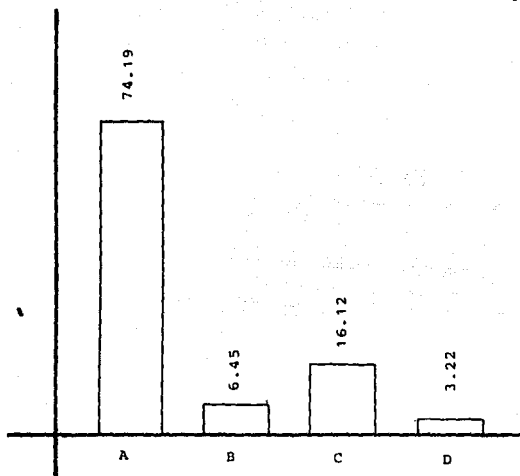
Cuadro No. 8

Identificación y porcentaje bacteriano en alfalfa fresca en el sitio "B" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.

| GENERO Y ESPECIE | MUESTREO | | | TOTAL | PORCENTAJE |
|---|----------|----|----|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| <u>Enterobacter</u> spp. | 4 | 10 | 9 | 23 | 74.19 |
| <u>Enterobacter</u> spp. <u>Citrobacter</u> spp. | 2 | - | - | 2 | 6.45 |
| <u>Enterobacter</u> spp. <u>Proteus</u> spp. | 4 | - | 1 | 5 | 16.12 |
| Sin crecimiento. | - | 1 | - | 1 | 3.22 |
| TOTAL. | 10 | 11 | 10 | 31 | |

Gráfica No. 4

Identificación y porcentaje bacteriano en alfalfa fresca en el sitio "B" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.



- A) Enterobacter spp.
B) Enterobacter spp. y Citrobacter spp.
C) Enterobacter spp. y Proteus spp.
D) Sin crecimiento.

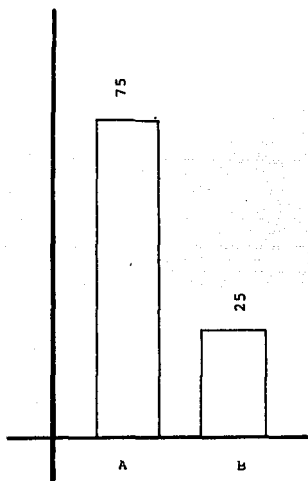
Cuadro No. 9

Identificación y porcentaje bacteriano en alfalfa achicalada en el sitio "A" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.

| GENERO Y ESPECIE | MUESTREO | | | TOTAL | PORCENTAJE |
|--|----------|----|----|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| <u>Enterobacter</u> spp. | 8 | 9 | 7 | 24 | 75 |
| <u>Enterobacter</u> spp. <u>E. coli</u> | 3 | 2 | 3 | 8 | 25 |
| TOTAL. | 11 | 11 | 10 | 32 | 100 |

Gráfica No. 5

Identificación y porcentaje bacteriano en alfalfa achicalada en el sitio "A" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.



A) Enterobacter spp.

B) Enterobacter spp. y E. coli.

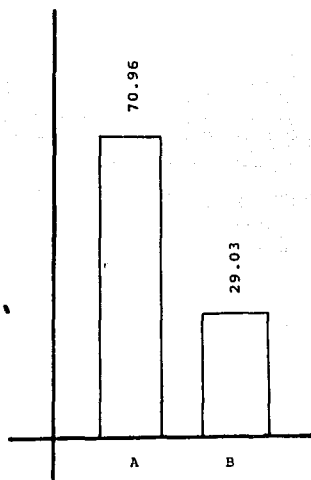
Cuadro No. 10

Identificación y porcentaje bacteriano en alfalfa achicalada en el sitio "B" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.

| GENERO Y ESPECIE | MUESTREO | | | TOTAL | PORCENTAJE |
|--|----------|----|----|-------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| <u>Enterobacter spp.</u> | 7 | 7 | 8 | 22 | 70.96 |
| <u>Enterobacter spp.</u> <u>E. coli</u> | 3 | 4 | 2 | 9 | 29.03 |
| TOTAL. | 10 | 11 | 10 | 31 | 99.99 |

Gráfica No. 6

Identificación y porcentaje bacteriano en alfalfa achicalada en el sitio "B" durante los 3 muestreos mediante pruebas bioquímicas.



A) Enterobacter spp.

B) Enterobacter spp. y E. coli.

Cuadro No. 11. Cargas bacterianas máximas totales encontradas en aguas negras, alfalfa fresca y alfalfa achicalada y sus reducciones proporcionales.

| LUGAR DE MUESTREO | TIPO DE MUESTRA | CRECIMIENTO MAXIMO (UFC/*) .X 10 ³ . | REDUCCION DE LA CARGA BACTERIANA** |
|-------------------|--------------------|---|------------------------------------|
| | AGUAS NEGRAS | > 30,000. | -- |
| A | ALFALFA FRESCA | 187 | 160 |
| | ALFALFA ACHICALADA | 156 | 192 |
| | AGUAS NEGRAS | > 30,000 | -- |
| B | ALFALFA FRESCA | 125 | 240 |
| | ALFALFA ACHICALADA | 94 | 320 |

(*) Para aguas negras se utiliza UFC/ml. y para alfalfa UFC/gr.

(**) Proporción en que reduce su carga bacteriana en relación a la de las aguas negras.

D I S C U S I O N .

Las poblaciones bacterianas encontradas en el agua fueron a cordes a las obtenidas en otras investigaciones (Pérez, 1978), en donde el principal germen de origen fecal fué E.coli, seguido por Enterobacter spp.; en cuanto a su cantidad, esta resultó ser mas elevada de lo esperado, ya que el número de colonias encontradas fué superior a 300 en la dilución mas alta (10^{-5}). Esto se puede explicar dadas las variables a que las aguas negras se ven sujetas tales como la cantidad de materia orgánica disponible, oxígeno disuelto, temperatura, p.H., presencia de agentes químicos inhibido res o promotores del crecimiento bacteriano, entre otros. Dichos factores pueden alterar de manera ascendente o descendente las po blaciones bacterianas del agua (1,8,12,17,26).

Para la alfalfa fresca y achicalada, los principales gérmenes encontrados fueron Enterobacter spp. y E.coli, dichos resultados son similares a los obtenidos por Valdivieso (1977), en donde el principal germen fué Enterobacter spp.

Las cargas bacterianas reales encontradas en la alfalfa fresca y achicalada, fueron muy inferiores a las registradas en las a guas negras, a su vez, la carga bacteriana obtenida en la alfalfa achicalada, no registró una disminución considerable en relación a la alfalfa fresca.

Es importante hacer notar que el proceso de achicalado se lleve a cabo en condiciones de laboratorio, no como se viene haciendo de manera comercial en la región para su distribución. Estas condiciones pudieron favorecer el mantenimiento de las poblaciones bacterianas al no ser expuestas al sol y al aireamiento de la misma ma nera que la alfalfa achicalada comercial.

En números porcentuales relativos, las poblaciones bacterianas de las aguas negras y la alfalfa fresca y achicalada, sufrieron una inversión en cuanto a la presentación de los dos gérmenes mas importantes, es decir, para las aguas negras fué E.coli el principal, seguido por Enterobacter spp., para el caso de la alfalfa fresca y achicalada el principal germen fué Enterobacter spp., seguido de E.coli. Dicha distribución porcentual no quiere decir que la población de Enterobacter spp. en la alfalfa fresca y achicalada haya presentado un incremento real, ya que, aunque fué el germen mas abundante, no iguala a la población porcentual real de Enterobacter spp. en el agua. La disminución real en cantidad de bacterias encontradas en la alfalfa fresca y achicalada con relación a las aguas negras, se puede deber a condiciones ambientales de adaptación en relación a cada germen, es decir, existen bacterias de la familia Enterobacteriaceae tales como Enterobacter spp. y Citrobacter spp. con hábitat natural sobre los vegetales y suelo, de manera que en el agua, las poblaciones totales de E.coli son mas abundantes y en la superficie de los vegetales, la sobrevivencia de ésta se ve afectada por la acción conjunta de los rayos solares y el viento, así pues, Enterobacter spp., por su mayor adaptación a dicho cambio, permanece en mayor proporción que E.coli, la cual desciende drásticamente.

En ninguno de los casos dentro de todo el estudio se puso en evidencia la presencia de Salmonella spp. debido probablemente a la elevada carga bacteriana de otro tipo de enterobacterias como E.coli que inhibieron su desarrollo no solo en los medios de

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

cultive sino en las mismas aguas de riego, además de las condiciones medio ambientales a las que Salmonella spp. se vió sujeta y que no se han estudiada profundamente. También cabe la posibilidad de que esta bacteria se destruya antes de llegar a la zona estudiada.

En cuanto al análisis estadístico para obtener una correlación entre las diferentes cargas bacterianas, este no se puede llevar a cabo dado que en los análisis cuantitativos de la alfalfa fresca y achicalada se tomó como máximo de población a aquellas clases de agar que presentaron el mayor número de colonias desarrolladas, sin tomar en cuenta aquellas que no presentaron crecimiento o de qué muestreo provinieron, de tal manera que faltaron datos de seguimiento para cada muestra y esto implica no poder aplicar los planteamientos de una correlación. (4).

Las cargas bacterianas encontradas en el agua de riego, muestran un peligro potencial muy elevado para los animales y el hombre, de acuerdo a la Legislación Sanitaria vigente en México (6).

Los vegetales como la alfalfa fresca y achicalada muestran cargas bacterianas no peligrosas para el consumo animal, dada su cantidad y distribución poblacional, ya que en la literatura revisada; el género Enterobacter spp., no se considera como un germen patógeno de importancia en Medicina Veterinaria y, E.coli al permanecer en cantidades menores sobre la superficie de la planta, tampoco representa un peligro latente.

L I T E R A T U R A C I T A D A

- 1.- Ayanegui, A. E.: Evaluación del reuso agrícola con las aguas residuales del río de los Remedios, México., Dirección General de Usos del Agua y Prevención de la Contaminación; Departamento de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la U.N.A.M. S.A.R.H. México. D.F. 1984.
- 2.- Banwart, G.I.: Basic food Microbiology. AVI Publishing Co. Inc. Westport. Connecticut. 1981.
- 3.- Blood, D.C., Henderson, J.A.: Veterinary Medicine. 5th. ed. Lea and Febiger. Philadelphia. 1979.
- 4.- Curso Teórico Práctico sobre diagnóstico de laboratorio de las infecciones por Enterobacterias.: XI Congreso Nacional de Microbiología. Guadalajara, Jal. 2,3,4. de Febrero de 1979.
- 5.- Daniel, W.: Bioestadística. Limusa. S.A. México. D.F. 1977.
- 6.- Diario Oficial de la Federación. 24 de Febrero de 1977. 7-12 DGN-AA-42-1977.
- 7.- Estadística del subsector pecuario de los Estados Unidos Mexicanos. S.A.R.H. México, D.F. 1980.
- 8.- Fernández, G.D.: Aspectos microbianos de la contaminación. III Curso y Simposio Internacional sobre biología de la contaminación. Escuela Nacional de Estudios Profesionales. Iztacala. U.N.A.M. México. D.F. 16-17 (1985).
- 9.- Frappé, M.C.: Manual de Infectología Veterinaria. Mendez Otero. S.A. México. D.F. 1983
- 10.- García, E.: Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koepen., Dirección General de Geografía. México. D.F. 1978.

- 11.- Gibbons, W.J., Catcott and Smithcors, J.F.: Medicina y Cirugía de los Bovinos. 1a. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México, 1984.
- 12.- Guinea, A., Sancho, O.: Análisis Microbiológico de Aguas, Aspectos aplicados. Omega. Barcelona, España. 1979.
- 13.- Hoeprich, A.: Infections Diseases. Harper of Row. Philadelphia. 1983.
- 14.- Jawets, E., Melnick, J.K., Adelberg, E.A.: Manual de Microbiología Médica. Quinta ed. El Manual Moderno. México. 1983.
- 15.- Lopez, A.J., Barajas, R.J.: Manual de laboratorio para bacteriología y micología veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Depto. de Bact. y Micología. U.N.A.M. México, D.F. 1975.
- 16.- Manual de cursos de Análisis de Aguas y Aguas de Desecho. Vol. II. C.I.E.C.C.A. México. 1983.
- 17.- Mitchel, R.: Water Pollution Microbiology. John Willey and Sons Inc. 1972.
- 18.- Orientación Programática Municipal de Ajacuba, Hidalgo. Comité de Planeación para el Desarrollo del Estado de Hidalgo, 1-15. México. 1983.
- 19.- Parras, M.J., Nieto, P., Calvin, V.: Aguas subterráneas, Contaminación Urbana, Industrial y Agrícola., Cuadernos del C.I.F.C.A.: 13., 17-25, Centro Internacional de Formación en Ciencias Ambientales. Madrid, 1979.
- 20.- Pérez, M.J.: Estudio bacteriológico de las aguas negras del gran canal del desagüe de la ciudad de México y de los dis-

- tritos de riego 03 y 88 en los estados de Hidalgo y México respectivamente y su posible repercusión sobre la productividad del ganado. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México. D.F. 1978
- 21.- Pérez, M.A., Vazquez. M.F., Rodriguez, M.S., Miranda, M.R., Romo, G.A., Nader, G.E.: Procedimientos de laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Depto. de Bact. y Micología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1987.
- 22.- Reyes. H.F.: Contribución al estudio de los canales de comercialización de la alfalfa en la República Mexicana. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1970.
- 23.- Rosas, I., Baez, A., Coutiño, M. :Bacteriological Quality of Crops Irrigated with Wasterwater in the Xochimilco Plots Mexico City, Mexico. Appl. Environ. Microbiol., 47: (5), 1074-1079. (1984).
- 24.- Salinas, G. de C.: Producción y Participación Política en el campo. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F. 1980.
- 25.- Souza, L.C., Timo, I.S., Magalhaes, L.C.: Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em aguas usadas na dessedentacao de animais. Rev. Saúde Publ. S. Paulo., 17 : 112-122., (1983).
- 26.- Valdivieso, G.A.: Estudio bacteriológico de 5 forrajes regados con aguas negras de los Distritos de riego 03 y 88 en

los estados de Hidalgo y México. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México México, D.F. 1977.

- 27.- Zapater, R.J.: Reutilización de aguas residuales para la agricultura. Revisión bibliográfica. Universidad Nacional Agraria. La Molina. Lima. 1980.