



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

20  
24

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**"DIAGNOSTICO DE CONTAMINACION BACTERIOLOGICA (*V. cholerae*, *Salmonella spp.*, Coliformes y *Streptococos fecales*), DEL RIO CHALMA, ESTADO DE MORELOS"**

**T E S I S**

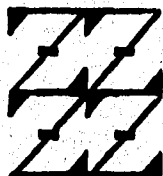
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**MARIA DE LOURDES NUÑEZ MENDEZ**

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO  
ES  
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ERIC D. GUTIERREZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

" La pérdida de nuestras ilusiones es la  
única pérdida de la que nunca nos  
recobramos "

Marie Lousie de la Ramee.

DEDICATORIA

Con cariño a mis padres: Guadalupe y Francisco  
por el amor y apoyo brindado

A mis hermanos y sobrinas: Jose Luis, Andres, Francisco René, Vanessa  
y Giovanna  
Doy gracias por tenerlos

Por el gran apoyo a mi compañero e hijo: Javier e Isaac  
con todo mi amor

## AGRADECIMIENTOS

Deseo pantetizar mi más sincero agradecimiento a:

- La Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" campo II y a los profesores, por su contribución a mi formación profesional. Muy especialmente al M. en C. Eliseo Cantellano de Rosas que motivo y apoyo el termino de esta investigación.
  
- El Instituto Mexicano de la Tecnología del Agua, por el apoyo brindado. Especialmente al M. en C. Eric D. Gutiérrez López, y el Biol. Ernesto Uribe.
  
- A todas aquellas personas que directamente e indirectamente me estimularon y aportaron opiniones para el buen fin de esta investigación.

## INDICE

	PÁGINAS
RESUMEN	
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 INDICADORES DE CONTAMINACIÓN	3
2.1.1. COLIFORMES FECALES	3
2.1.2. ESTREPTOCOCOS FECALES	4
2.2 <i>Salmonella</i>	4
2.3 <i>Vibrio cholerae</i>	6
2.4 EPIDEMIA DE CÓLERA EN EL ESTADO DE MORELOS	7
2.5 TÉCNICAS DE MUESTREO BACTERIOLÓGICO	11
3 ÁREA DE ESTUDIO	13
3.1 LOCALIZACIÓN	14
3.2 HIDROLOGÍA	14
3.3 CLIMA	16
4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
5 MATERIAL Y MÉTODOS	18
6 RESULTADOS	22
7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
8 CONCLUSIONES	35
9 RECOMENDACIONES	36
10 BIBLIOGRAFÍA	37
Anexo I.	Diagrama para el aislamiento de coliformes fecales
Anexo II.	Diagrama para el aislamiento de estreptococos fecales
Anexo III.	Diagrama para la recuperación, aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i> O1 en muestras de agua
Anexo IV.	Recuperación, aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp.
Anexo V.	Medios de cultivo, reactivos y soluciones

## RESUMEN

En esta investigación se realizó un diagnóstico de contaminación bacteriológica (*Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp, coliformes y estreptococos fecales), del río Chalma, Estado de Morelos por un periodo de seis meses comprendidos de mayo a octubre de 1992. Además, se realizó una comparación cualitativa de tres métodos de concentración de bacterias patógenas: hisopo de Moore, Red de arrastre planctónico y superficies naturales con el propósito de detectar *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp. Los análisis de coliformes y estreptococos fecales se realizaron en ocho estaciones con el método tradicional de muestreo bacteriológico abarcando el 97 % de su longitud total del cauce del río (74 Km).

Al mismo tiempo, se llevó a cabo un registro de parámetros físicos y químicos (temperatura, pH, conductividad, oxígeno disuelto, gasto, nitratos y fosfatos), los cuales se encontraron dentro de la norma para uso y consumo humano, con excepción de los fosfatos que se presentaron en un intervalo de concentración de 0.1 a 1.4 mg/L desde el kilómetro 28 al 72, longitud que representa el 71.62 % del cauce del río Chalma. El pH se presentó no aceptable en el poblado Cocoyotla durante el mes de mayo, comparándolo con el máximo permisible de 9.0 unidades de pH.

El agua del río Chalma no es apta para uso y consumo humano de acuerdo con la NOM-127-SSA1-1994, ya que registró un promedio mínimo de  $3.3 \times 10^2$  UFC/100 mL y un máximo de  $3.7 \times 10^5$  UFC/100 mL de coliformes fecales. En cuanto a la presencia de estreptococos fecales se registró un promedio mínimo de 0.16 UFC/100 mL y un máximo de 523,833 UFC/100 mL, producto de las aportaciones de agua residual de las poblaciones: Chalma, Cocoyotla, Coatlán del río, Cuauhichinola y Puente de Ixtla.

Durante el periodo de muestreo no se detectó a *Vibrio cholerae* O1. Todos los análisis resultaron negativos, sin embargo, se determinó *Vibrio cholerae* NO O1 que es potencialmente patógeno ya que produce una toxina similar, a la O1. *Vibrio cholerae* NO O1 no causa el verdadero cólera epidémico sino enfermedades gastrointestinales comunes. También se encontraron otros vibrios que han sido asociados a la gastroenteritis como *Vibrio vulnificus* y *Vibrio fluvialis*. De las muestras analizadas todas dieron resultados negativos para *Salmonella* spp.

Del análisis comparativo de los métodos de concentración de bacterias (hisopo de Moore, red de arrastre planctónico y superficies naturales), con ninguno se detectó la presencia de *V. cholerae* O1 y *Salmonella* spp.

Los resultados del análisis de distancias y ordenación ecológica agrupan a los datos en dos grupos: el primero (Ahuehuate) y el segundo lo componen las restantes estaciones, mostrando la existencia de dos extremos de condiciones, por un lado el sitio menos contaminado (el Ahuehuate) y el más contaminado (el Coco).

Dentro de las medidas preventivas se propone realizar el monitoreo en las estaciones el Ahuehuate y el Coco, ya que nos muestran las dos condiciones extremas de contaminación, evitar las descargas municipales dispersas y/o puntuales hacia el río, previo tratamiento del agua residual y concientizar a la población de la importancia de preservar el recurso.

Se debe continuar estudiando los métodos de concentración de bacterias, mediante un diseño que permita evaluar cuantitativamente cada método.

## 1 INTRODUCCION

El agua constituye un elemento importante de mundo biológico y en si nunca está libres de organismos. Presentan una flora bacteriana característica constituida por una gran variedad de especies con un número relativamente escaso de individuos pertenecientes a diferentes especies. Las bacterias aisladas con mayor frecuencia son bacilos gram-negativos miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Flavobacterium*, los cuales se encuentran en cifras que generalmente no exceden de  $10^2$ - $10^3$  células/mL. Tras la incorporación de materia orgánica, la primera respuesta que se registra en la microflora es el incremento casi instantáneo de estas especies y pueden darse cifras lo suficientemente elevadas como para producir turbidez ( $10^6$ /mL) (Grant y Long, 1989).

Además de las bacterias naturales del agua, existe una diversidad de bacterias que son aportadas por fuentes externas como: aire, suelo, excreciones animales y humanas, entre otras (Burrows, 1974).

El número de bacterias en el aire está relacionado íntimamente con la cantidad de partículas suspendidas. Son menos en el aire del campo que en la ciudad, menos en montaña que en las tierras bajas. Muchas de las bacterias que se encuentran en el aire, en particular las aerobias formadoras de esporas, son esencialmente formas propias del suelo que vuelan en el polvo y pueden sobrevivir en condiciones de escasa humedad. El suelo en sí contiene cantidades considerables de bacterias; un gramo de suelo del campo contiene aproximadamente 50 a 100 mil millones de bacterias vivas; la mayor parte se encuentran en los primeros 12 cm superiores y pocas a profundidades mayores de un metro y medio (Burrows, Op cit).

Los microorganismos que se encuentran en el aire y en el suelo tienen acceso relativamente fácil a los cuerpos de agua, y la contaminación puede ser más o menos continua o con intervalos irregulares en condiciones excepcionales, como durante e inmediatamente después de lluvias copiosas. Por lo consiguiente, el aire y el suelo, en particular éste, contribuyen considerablemente a la flora bacteriana del agua.

Las actividades del hombre y las de los organismos que se desarrollan dentro y alrededor de las aguas naturales modifican tanto la composición inorgánica y orgánica de las aguas naturales. A medida que los ríos pasan por regiones habitadas o fuertemente industrializadas, reciben los vertidos domésticos, industriales o agrícolas incrementando el riesgo de exposición a enfermedades hidrotansmitibles a la población (Beneson, 1987). Ésta contaminación directa es consecuencia de la alta densidad de población y de la inadecuada planeación urbana, ya que generalmente las aguas negras de una comunidad se vierten directamente al curso de agua que abastece a otra.

Por lo anterior, es de particular interés el monitoreo de los cursos de aguas superficiales con el fin de adoptar las medidas preventivas y correctivas que aseguren la protección del recurso y por lo tanto la salud del usuario?



Ante tal problemática, el presente estudio pretende contribuir a detectar la presencia de los agentes etiológicos responsables del cólera y salmonelosis, así como conocer el comportamiento de los indicadores de contaminación biológica (coliformes y estreptococos fecales) en muestras ambientales procedentes del río Chalma, Estado de Morelos. Al mismo tiempo, se realiza una comparación cualitativa de algunos métodos de concentración de bacterias (hisopo de Moore, red de arrastre planctónico y superficies naturales).

## 2 REVISION BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Indicadores de contaminación

La detección de bacterias patógenas requiere de procesos largos, costosos y laboriosos. Estos requerimientos llevan al concepto de organismo indicador de contaminación fecal y desde 1914 en Estados Unidos el Servicio de Enfermedades Públicas adoptó al grupo coliforme como un indicador de contaminación de agua para consumo humano (Gerba, 1987).

Los organismos indicadores están definidos como aquellos organismos adecuados para identificar una condición particular.

Las condiciones que debe cumplir un indicador ideal son (Bitton, 1994):

- 1) Es parte de la flora intestinal de animales de sangre caliente.
- 2) Está presente cuando existen bacterias patógenas de origen fecal.
- 3) Es Menor o igual de resistente que el patógeno a la desinfección de agua y en plantas de tratamiento de agua residual.
- 4) No se multiplica en el medio.
- 5) Es detectado por medios rápidos y fáciles, así como métodos eficientes.
- 6) No es patógeno.

Los coliformes fecales están incluidos en el grupo coliforme. Su presencia es indicador de material fecal de animales de sangre caliente, aunque no se tiene bien diferenciada la contaminación humana y animal. Los coliformes fecales disponen de un patrón similar al de las bacterias patógenas, son usados como indicadores de contaminación viral y de quistes de protozoarios. Son menos resistentes a la desinfección que virus y quistes de protozoarios (Bitton, Op cit).

#### 2.1.1 Coliformes fecales

El grupo coliforme se define como todos aquellos bacilos cortos, gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de gas en 48 horas a 35°C, (APHA et al, 1989). Los coliformes fecales se diferencian de los demás coliformes por su capacidad de multiplicación y producción de gas a partir de la fermentación de lactosa cuando son incubados a 44°C. Desde el punto de vista de la salud, el grupo es más importante que los coliformes totales, dado que se relaciona más con la probabilidad de encontrar patógenos excretados (Fernández, 1981). La presencia de éstos, indica si no una contaminación real, al menos un suministro poco satisfactorio (Collins y Lyne, 1989).

## 2 REVISION BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Indicadores de contaminación

La detección de bacterias patógenas requiere de procesos largos, costosos y laboriosos. Estos requerimientos llevan al concepto de organismo indicador de contaminación fecal y desde 1914 en Estados Unidos el Servicio de Enfermedades Públicas adoptó al grupo coliforme como un indicador de contaminación de agua para consumo humano (Gerba, 1987).

Los organismos indicadores están definidos como aquellos organismos adecuados para identificar una condición particular.

Las condiciones que debe cumplir un indicador ideal son (Bitton, 1994):

- 1) Es parte de la flora intestinal de animales de sangre caliente.
- 2) Está presente cuando existen bacterias patógenas de origen fecal.
- 3) Es Menor o igual de resistente que el patógeno a la desinfección de agua y en plantas de tratamiento de agua residual.
- 4) No se multiplica en el medio.
- 5) Es detectado por medios rápidos y fáciles, así como métodos eficientes.
- 6) No es patógeno.

Los coliformes fecales están incluidos en el grupo coliforme. Su presencia es indicador de material fecal de animales de sangre caliente, aunque no se tiene bien diferenciada la contaminación humana y animal. Los coliformes fecales disponen de un patrón similar al de las bacterias patógenas, son usados como indicadores de contaminación viral y de quistes de protozoarios. Son menos resistentes a la desinfección que virus y quistes de protozoarios (Bitton, Op cit).

#### 2.1.1 Coliformes fecales

El grupo coliforme se define como todos aquellos bacilos cortos, gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de gas en 48 horas a 35°C, (APHA et al, 1989). Los coliformes fecales se diferencian de los demás coliformes por su capacidad de multiplicación y producción de gas a partir de la fermentación de lactosa cuando son incubados a 44°C. Desde el punto de vista de la salud, el grupo es más importante que los coliformes totales, dado que se relaciona más con la probabilidad de encontrar patógenos excretados (Fernández, 1981). La presencia de éstos, indica si no una contaminación real, al menos un suministro poco satisfactorio (Collins y Lyne, 1989).

Las ventajas de las coliformes fecales como grupo indicador son (Fernández, Op cit):

- a) El 95% de las coliformes fecales resultan positivas a la prueba de la temperatura.
- b) Pueden estar ausentes si la contaminación no es de origen fecal.
- c) Sobreviven menos tiempo que los coliformes totales, por lo que permiten suponer contaminación reciente, si se encuentran en concentraciones altas.
- d) Son más exigentes que las coliformes totales para reproducirse fuera del intestino.
- e) Los procedimientos de laboratorio para su cuantificación son relativamente sencillos.

### 2.1.2. *Streptococcus fecales*

Cierto número de microorganismos gram-positivos aparecen en la flora intestinal en menos cantidades. Entre los miembros anaerobios facultativos se incluyen los enterococos, principalmente *Streptococcus fecalis*. Estos microorganismos se encuentran en las heces de animales de sangre caliente. Algunas de sus ventajas en su uso como indicador de contaminación es que persisten y no se reproducen en el medio, mientras que los coliformes pueden hacerlo dependiendo de la calidad del agua.

No existe uniformidad de criterio en cuanto al valor del *Streptococcus fecalis* como indicador de contaminación fecal, ya que Coetzee (1962), dice que estreptococo fecal es un indicador menos sensible de una contaminación fecal reciente; sin embargo, en casos excepcionales su presencia, en ausencia de *E. coli*, en contadas ocasiones en que esto sucede, le convierte en un indicador extraordinariamente útil. Los expertos de la Organización Mundial de la Salud declaran que la presencia de *S. fecalis* confirma el origen fecal de una contaminación reciente.

La relación numérica que existe entre coliformes fecales y estreptococos fecales que sirve como indicador de contaminación en las aguas superficiales. Una relación de 4 indica contaminación de origen humana, mientras que de 0.7 indica contaminación por animales (Geldreich y Kenner, 1969). Esta relación es sólo válida para contaminación reciente (24 h).

### 2.2 *Salmonella*

El género *Salmonella* comprende una gran variedad de especies patógenas para el hombre y animales.

La bacteria penetra casi siempre por vía digestiva, mediante la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas, multiplicándose activamente en el tejido linfóide del intestino delgado, de donde puede pasar a torrente sanguíneo para localizarse en cualquier órgano.

La infección por *Salmonella*, puede dar lugar a tres síndromes clínicos diferentes: a) gastroenteritis b) fiebre tifoidea y paratifoidea y c) Bacteremia o septicemia.

a) Taxonomía

El género *Salmonella* recibe el nombre del microbiólogo D.E. Salmón. Los más de 2200 serotipos han sido divididos en tres grupos clínicos principales: *Salmonella typhosa*, causante de fiebre tifoidea; *Salmonella choleraesuis*, causante de fiebre entérica con septicemia, y *Salmonella enteritidis*; las restantes cepas producen en el hombre gastroenteritis de diversos grados, con una considerable variación individual en severidad (Koneman et al., 1991).

b) Morfología microscópica:

Son bacterias gram-negativas, bacilos cortos de 0.4-0.6 micras de ancho, 1-3 micras de largo, todas las especies son móviles debido a flagelos peritricos (excepto *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*), no forman esporas y la mayoría de las especies no forman cápsula a excepción de *Salmonella typhi*.

c) Morfología macroscópica

A las 24 horas de incubación en agar, sus colonias son relativamente grandes, con diámetro de 2-4 mm y transparentes. En los medios líquidos, el desarrollo es difuso y enturbia uniformemente el medio.

d) Fisiología

Son aerobios y anaerobios facultativos, son indol y ureasa negativos, no licúan la gelatina, no fermentan la lactosa, forman ácido y generalmente gas a partir de glucosa, maltosa, manitol y dextrina. La fermentación de los azúcares constituye un método para la diferenciación de varias especies; sin embargo es necesario confirmar los resultados mediante análisis antigénico.

Se desarrollan con facilidad a un pH entre 2 y 8, y a temperaturas entre 15 - 41 °C, con un óptimo de 37.5 °C (Capella et al., 1980).

e) Requerimientos nutricionales

No es exigente en sus requerimientos nutricionales como lo son los fermentadores de lactosa y pueden crecer en los mismos medios, aunque un pequeño número de ellos (*Salmonella typhi*) son exigentes para algunos aminoácidos. La sobrevivencia prolongada en aguas de estuarios le permite acumularse en los mariscos.

f) Hábitat

El tracto intestinal del hombre, animales, aves y reptiles son el hábitat natural de varias especies de *Salmonella*, además de que también se encuentra frecuentemente en aguas residuales, ríos, lagos y aguas de mar (Mitchell, 1992; Atlas y Bartha, 1993; Banwart, 1989 y Brock y Madigan, 1988).

#### g) Dosis infectiva

Las dosis infectivas medias varían para cada patógeno. De manera general, las bacterias actúan a elevadas dosis infectantes ( $10^6$  organismos) (Feachem, 1983).

Las rutas de ingreso al organismo pueden ser: la fecal-oral, el contacto persona-persona y la ingestión de agua y alimentos contaminados (Kumate, 1972).

#### 2.3. *Vibrio cholerae*

Produce una enfermedad intestinal y grave llamada cólera que se caracteriza por diarrea acuosa abundante, vómitos y deshidratación rápida (INDRE, 1991a). La historia de esta enfermedad data de tiempos muy remotos, fue descrita por Hipócrates, Galeno, Susruta y Wong Shooho desde antes de Cristo. Se han presentado diversas epidemias desde entonces, principalmente en Asia (región donde dicho padecimiento es endémico, desde siglos atrás), afectando con una mayor incidencia a la región hindú durante los siglos XV y XVIII (Dir. Gral. Epidem., 1991 ; Valdespino et al., 1991).

Se habla de las epidemias de cólera ocurridas durante las celebraciones religiosas en la India, como la que se relata en 1783, durante las fiestas de Gangadwara en aquella región y en la que murieron más de 20,000 personas en el lapso de ocho días, como consecuencia de la epidemia (Mendieta y Blandino, 1991). Posteriormente, el cólera se empezó a difundir desde Asia, hacia los otros continentes, viéndose afectados Europa, África y América. En el transcurso de los siglos XIX y XX se han registrado siete pandemias, que se han extendido a lo largo de varios continentes, siendo las rutas comerciales entre los países la vía de diseminación más común de la enfermedad (Freeman, 1986; Koneman et al., 1991; Valdespino et al., 1991; Dir. Gral. Epidem., 1991).

La primera pandemia, comprendida entre 1817 y 1823, inicio en la zona del río Ganges, en la India, donde debido a un rito, la gente se sumergía en sus aguas e incluso defecaba, generando un foco de transmisión. De ahí se desplazó hacia Arabia y el sur de Asia.

La segunda pandemia llegó al continente americano al norte de nuestro país y desde Asia se desplazó a Europa particularmente al norte de Europa. Cuando la enfermedad se presentó epidémicamente por cuarta vez, afectó a Japón y Australia. Llegó también al sur de África y al sur del continente americano.

En la quinta ocasión, México no fue perjudicado, debido a la aplicación de un diagnóstico mediante el cual se rechazaba o se trataba a las personas infectadas.

La sexta pandemia no afectó al continente Americano debido al estallido de la Primera Guerra Mundial se suspendió el comercio entre los dos continentes.

La séptima pandemia que hoy vivimos, iniciada en Indonesia durante 1961, siguió el mismo canal de difusión a partir de la India, país que continúa como lugar del origen de cólera. No obstante durante esta pandemia, el biotipo El Tor de *V. cholerae* O1, desplazó casi por completo al biotipo clásico, entre 1978 y 1979 se registraron algunos brotes de cólera en la India, cuyo agente etimológico fue *V. cholerae* O1 biotipo clásico (Freeman, 1986; WHO, 1980).

Respecto a América Latina, el problema se inició en Perú y Colombia, en enero de 1991 de ahí pasó a Estados Unidos, posteriormente a México, Brasil, Argentina y Canadá.

#### **2.4 Epidemia de cólera en el Estado de Morelos**

Octubre/1991: La enfermedad llegó por primera vez al Estado de Morelos, cuatro meses después de que se iniciara la epidemia en la República Mexicana. Así, para el día 25, se registraban en esta entidad los primeros 21 casos de cólera y la primera defunción asociada a la enfermedad; siendo Tlalqueltenango y Jojutla las poblaciones más afectadas (INDRE, 1992 b).

Noviembre/1991: Se presentaron 33 casos de cólera y dos defunciones a causa de la enfermedad, de acuerdo al informe epidemiológico del Estado hasta el 15 de noviembre.

Diciembre/1991: Durante este mes se registraron 8 casos adicionales de cólera, acumulándose hasta el último día del mes, 41 casos de la enfermedad y 2 defunciones (INDRE, 1991c y 1992d).

Enero /1992: En el Estado no se registran nuevos casos durante este mes.

Marzo/1992: Durante este mes son registrados en Morelos cinco nuevos casos de cólera, ascendiendo a 46 los casos totales en la entidad.

Abril/1992: Al finalizar este mes, se registraron 71 casos de cólera, esto es, 25 casos más en sólo un mes (INDRE, 1992e).

Marzo/1992: Se registraron 95 casos de cólera y 5 defunciones, lo que significó un incremento de 24 casos y 3 defunciones en sólo un mes (tabla 1).

Tabla 1. Cólera en el Estado de Morelos en el periodo comprendido de octubre de 1991 a mayo de 1992 .

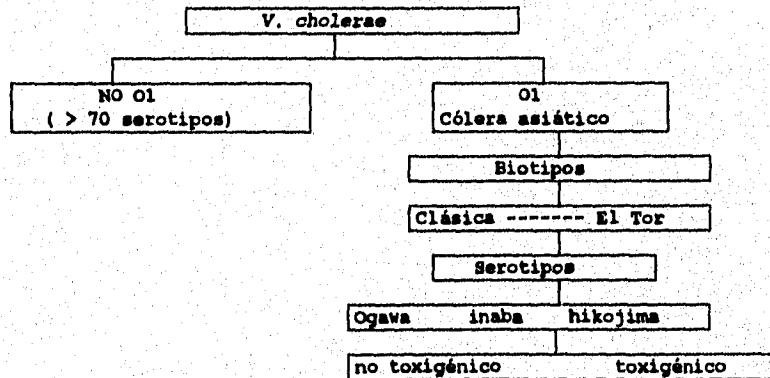
FECHA	CASOS ACUMULADOS	DEFUNCIONES	LETALIDAD
Sep-Oct 1991	21	1	4.8
Nov-Dic 1991	41	2	4.9
Ene-Feb 1992	41	2	4.9
Mar-Abr 1992	71	2	2.8
Mayo 1992	95	5	5.2

Fuente: INDRE, citado en González, 1992.

Ante este comportamiento de la enfermedad, se pretendió incrementar el monitoreo en el Estado trabajando en el río Chalma con el propósito de detectar puntos de diseminación de la enfermedad a través del agua superficial.

a) Taxonomía

El género *Vibrio*, se encuentra incluido junto con otros tres géneros (*Aeromonas*, *Pleisomonas* y *Photobacterium*) dentro de la familia *Vibrionaceae*, de acuerdo con la clasificación de Bergey (Bauman et al., 1984; Giono et al., 1991). Dentro de este género se encuentra varias especies que pueden ser patógenas para el hombre, siendo una de las más importantes *V. cholerae*. La clasificación taxonómica de *V. cholerae* se resume en el , diagrama siguiente (González y Saltigeral, 1992):





Hay más de 70 serogrupos de *Vibrio cholerae*, pero sólo el grupo O1 puede ocasionar el cólera. Existen dos biotipos de *Vibrio cholerae* O1: Clásico y El Tor. El biotipo El Tor ha causado casi todos los brotes recientes de cólera (séptima pandemia); en Bangladesh se ha vuelto a presentar el biotipo Clásico (González y Saltigeral Op cit).

Serológicamente ambos biotipos son indistinguibles. Dentro de cada uno hay tres serotipos: Inaba, Ogawa e Mikojima. La diferenciación de los biotipos se basa en las pruebas de hemólisis de eritrocitos de carnero, hemaglutinación de eritrocitos de gallina, fermentación butilen-glucólica, sensibilidad a la polimixina y bacteriófagos específicos (Sánchez, 1991).

#### b) Morfología microscópica

Son bacilos cortos y levemente curvos o en forma de coma su longitud varía de 1.4 a 2.6  $\mu$  y su espesor, por la porción más gruesa, va de 0.5 a 0.8  $\mu$ . Estos microorganismos presentan un único flagelo polar con una longitud de 1.4 a 1.8  $\mu$ . Son organismos gram-negativos, no capsulares y no forman endoespora. A la observación microscópica aparecen generalmente aislados, pero ocasionalmente se encuentran dos o más vibrios unidos, adoptando forma de "S" o cadenas cortas, que adquieren la apariencia de espirales levemente enrolladas. En cultivos viejos se presentan como esferas, granos, estructuras piriformes, bastoncillos, filamentos y espirales en forma de "L". Cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo recuperan su aspecto.

#### c) Morfología macroscópica

Las colonias presentan una apariencia translúcida, pero tras incubación continua, las colonias se tornan opalescentes, lisas, levemente granulares, convexas, cremosas, con bordes enteros y un color amarillo grisáceo. Su diámetro va de 2-3 mm (Freeman, 1986).

#### d) Fisiología

La especie *V. cholerae* esta integrada por microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, los cuales no presentan características nutricionales complejas pueden crecer en medios minerales que contengan D-glucosa y cloruro de amonio (Bauman et al., 1984).

Para su supervivencia en agua requiere la presencia de materia orgánica y de cloruros (Equihua et al., 1992).

El ámbito de temperatura a la que pueden crecer estos microorganismos es bastante amplio pues va de 16 a 43°, siendo la temperatura óptima de crecimiento 37° C. (Joklik et al., 1989 Secretaría de Salud, 1992). Un parámetro que es determinante para el desarrollo de *V. cholerae* es el pH del medio; se ha demostrado que el pH óptimo de crecimiento fluctúa entre 7.0 y 9.0; sin embargo, se ha determinado que tienen capacidad para tolerar condiciones fuertemente alcalinas, habiendo presentado desarrollo aún en pH cercano a 10.0 (Bauman et al., 1984; Freeman, 1986; Joklink et al., 1989; Davis et al., 1990).

Estos organismos presentan alta sensibilidad a ciertos agentes físicos y químicos (Joklink *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 1990; Secretaría de Salud, 1992), entre los que se mencionan:

-Calor: *V. cholerae* se muere fácilmente a temperatura de ebullición y aún a temperaturas moderadamente altas, como son 55°C durante 10 min.

-Frío: Soporta temperaturas menores a las de 32°C bajo cero. Se mantiene viable completamente congelado durante 20 días y puede estar sujeto a congelamiento y descongelamientos alternos. Soporta inviernos largos (hasta cuatro meses).

-Luz solar: Presenta baja resistencia. En condiciones naturales, los vibrios se mantienen viables después de una exposición promedio de 8 a 10 horas con una temperatura a la sombra de 23 a 31°C.

-Desecación: *V. cholerae* también puede ser destruido por la desecación del medio que lo contiene, en un lapso de dos horas aproximadamente.

-Desinfectantes: Se consigue una rápida inactivación de vibrios coléricos con cloro, fenol (1%), yodo concentrado, alcohol (10%) y cal.

Este microorganismo es altamente sensible a algunos antibióticos como: tetraciclina, eritromicina y cloranfenicol.

#### e) Requerimientos nutricionales

*V. cholerae* no es exigente en lo que a nutrición se refiere, ya que puede crecer en medios simples, siempre y cuando se le proporcione una fuente de carbono, energía, nitrógeno inorgánico, azufre, fósforo, y otros minerales y un amortiguador adecuado (Joklink *et al.*, 1989; Secretaría de Salud, 1992).

En estudios de laboratorio en ausencia de nutrientes, *V. cholerae* presentan un decremento gradual en su volumen celular hasta en un 85% pasando de su típica forma de coma a las involucionadas formas cocoides; se dice que estos son mecanismos de supervivencia que le permiten a *V. cholerae* resistir condiciones adversas de variación o privación de nutrientes. Todos estos procesos son reversibles con la adición de nutrimentos al medio (Baker *et al.*, 1983).

Dentro del género *Vibrio*, una característica importante es el requerimiento de iones sodio, que estimulan el crecimiento de todas las especies.

En estudios realizados en laboratorio, empleando agua natural o artificial y probando diferentes grados de salinidad, se ha comprobado que *V. cholerae* presenta su máximo desarrollo a una salinidad de 22.5 ‰, con valores por arriba (4.5 ‰) o por debajo (1.5 ‰) de dicho nivel, se presenta una disminución en el número poblacional. Con base a estos estudios de laboratorio, en los que se ha determinado la concentración de nutrientes y el grado de salinidad requeridos para

un crecimiento óptimo de *V. cholerae*, se ha concluido que este microorganismo es autóctono, tanto en sistemas de agua salada, como en estuarios (Singleton et al., 1992). De esta forma recientemente se ha propuesto que el hábitat permanente de ambos biotipos (El Tor y Clásico), puede hallarse en el ambiente acuático de ciertas localidades del mundo, geográficamente favorables, tales como las áreas tropicales y subtropicales de Asia, Indochina, África y el Golfo de México (Shaffer et al., 1989).

#### f) Hábitat

Anteriormente, se creía que el único hospedero y reservorio natural de *V. cholerae* era el hombre, porque su intestino delgado es el sitio de multiplicación primaria de dicho microorganismo; sin embargo, actualmente se tienen evidencias de que la presencia de *V. cholerae* no se limita únicamente al hombre, sino que existe también en reservorios ambientales (Collins y Lyne, 1989; Giono et al., 1991; WHO, Op cit). Es así como se le ha aislado de ambientes acuáticos, tanto en aguas dulces como saladas, en donde se les encuentra como bacteria de vida libre, o bien, en asociaciones normales o patógenas con otros microorganismos acuáticos en la superficie y el contenido intestinal de animales marinos (Bauman et al., 1984; Koneman et al., 1988; Davis et al., 1990)

Particularmente, se sabe que las cepas del biotipo El Tor pueden sobrevivir en el medio por más tiempo que las del biotipo Clásico, pudiéndose encontrar a las primeras en agua, en heces humanas utilizadas como fertilizantes, en aguas residuales o de drenaje, e incluso, en asociaciones con ciertas plantas (Koneman et al., 1988).

#### g) Dosis infectiva

Las dosis infectivas de *V. cholerae* O1 varían dependiendo de la susceptibilidad de las personas. Las dosis infectivas en hombres adultos sanos son altas, experimentalmente se requiere de  $10^6$  células de *V. cholerae* clásico en agua para producir diarrea en el 50 % de voluntarios adultos, y  $10^{11}$  organismos para producir una diarrea parecida a cólera.

### 2.5. Técnicas de muestreo bacteriológico

Las técnicas de muestreo presentan dos variantes, una consiste en la toma de una porción líquida y la otra requiere de una previa concentración de bacterias.

La primera consiste en la toma directa de un cierto volumen de agua en el que existe una baja posibilidad de detectar a microorganismos patógenos; siendo necesario conocer la densidad de la población bacteriana para poder calcular el volumen mínimo de muestra en el que es posible encontrar a la bacteria patógena (Leal y Del Torno, 1983).

Un posible estudio de este tipo implica un previo monitoreo que consume tiempo y en caso de contaminación biológica retarda una intervención oportuna. La desventaja de esta técnica es la de manejar

relativamente grandes volúmenes de muestra para poder detectar al microorganismo.

La segunda técnica se realiza con dispositivos que captan las bacterias contenidas en un gran volumen de agua y que permiten aislarlas de este medio líquido.

a) Concentración por filtro con membrana

Este procedimiento consiste en dirigir el flujo del líquido a analizar sobre una membrana porosa (0.45  $\mu\text{m}$  diámetro del poro) a manera de que todas las bacterias queden retenidas sobre el filtro (Sánchez, 1991).

b) Concentración con tierra de Diatomeas

Este método utiliza la elevada capacidad de retención de la tierra de Diatomeas para concentrar flora microbiana a partir de grandes volúmenes de agua (De Mayo, 1991).

c) Hisopo de Moore

El fundamento de la técnica se basa en la separación de bacterias por adsorción, sobre un soporte llamado hisopo de Moore, cuya función es la de obtener una muestra enriquecida de bacterias (Giono, *Op cit*).

d) Red de arrastre planctónico

Se ha registrado la asociación de bacterias *Vibrio cholerae* y *V. parahaemoliticus* con otros organismos en medios acuáticos naturales (Kaneko y Colwell, 1978; Kaper et al., 1979; Blake et al., 1979; Cowell et al., 1981). *V. cholerae* se asocia con organismos que tienen quitina entre ellos los copépodos (Kaneko y Cowell, 1978; 1975; Nalin, 1979; Nalin et al., 1979; Sochard et al., 1979), los cuales son el vehículo de distribución y sustrato de un microambiente favorable a la bacteria (Marshall, 1976).

e) Superficies naturales

Estudios de laboratorio han revelado que *Vibrio cholerae* esta asociado a la superficie de ciertas plantas, particularmente a *Eichhornia crassipes*, conocido comúnmente como Jacinto de agua y lirio acuático en México, donde una vez adherido, puede permanecer viable por más tiempo que aquellos que se encuentran libres en el agua, en donde se sabe que pueden sobrevivir unas horas e incluso semanas, siempre y cuando se encuentre contaminada con materia fecal (Spira et al., 1981).

Teniendo como antecedentes la asociación entre copépodos y superficies naturales con *Vibrio cholerae* en medios acuáticos se hará uso de la red de arrastre planctónico para coleccionar las muestras bacteriológicas; así como de especímenes de lirio acuático presente en el río Chalma.

### 3 ÁREA DE ESTUDIO

Tras un siglo de no presentarse el cólera en nuestro país y ante la amenaza de la actual epidemia que ataca a los países vecinos de Centro y Sudamérica, México no escapó a la acelerada diseminación de esta enfermedad, y es así como a mediados de 1991, el cólera llega a territorio mexicano, extendiéndose en aproximadamente un año, a lo largo de 23 estados (INDRE, 1992b), entre ellos el Estado de Morelos (Fig. 1).

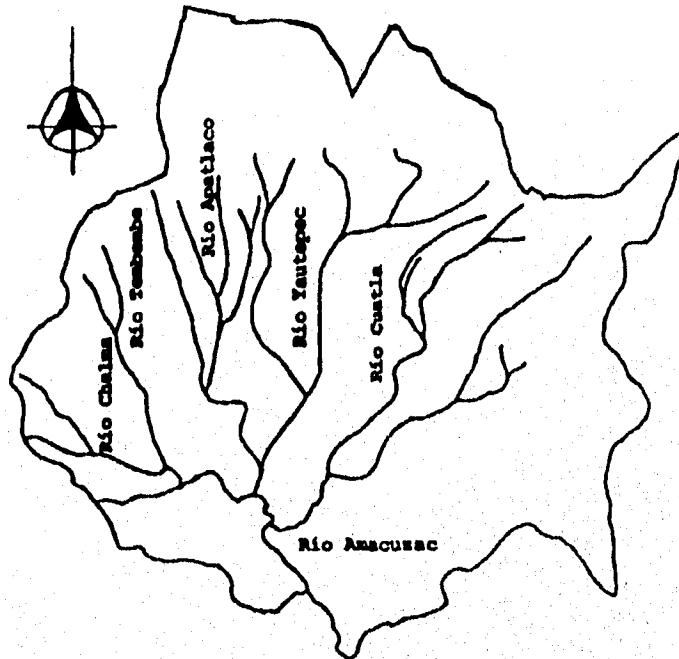


FIGURA 1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

### 3.1 Localización

El río Chalma se localiza en la porción noroeste del Estado y al oeste de Cuernavaca, cuya ruta empieza al sur hasta confluír con el río Amacuzac. En su parte alta es conocido como río Ocuilán y tiene su origen en los escurrimientos que bajan desde una altitud de 2,750 msnm a unos ocho Km al noroeste de Ocuilán, Estado de México. La importancia del río Chalma radica en sus usos turístico, recreativo y riego agrícola.

La longitud del río es de 74 Km aproximadamente, su dirección es hacia el sur, internándose por una zona montañosa en su parte alta hasta las inmediaciones de Tetecala, Morelos, pasando posteriormente a irrigar zonas de cultivo.

El área de la cuenca es de 1043.4 Km<sup>2</sup>, correspondiendo 5.68.5 Km<sup>2</sup> al estado de México y 474.9 Km<sup>2</sup> al Estado de Morelos (fig. 2).

El río Chalma en su recorrido atraviesa los municipios de Coatlán del Río, Miacatlán, Mazatepec y Tetecala todos del Estado de Morelos. Localidades cuya principal actividad es la agricultura de riego y temporal produciendo principalmente caña de azúcar, arroz, sorgo, maíz, frijol, cebolla, jitomate y frutales como mamey, guanábana y chichzapote (Secretaría de Gobernación, 1988).

### 3.2 Hidrología

Las mayores aportaciones del río Chalma provienen de los afloramientos que hay en las barracas existentes entre los poblados de Ocuilán y Chalma, en el Estado de México.

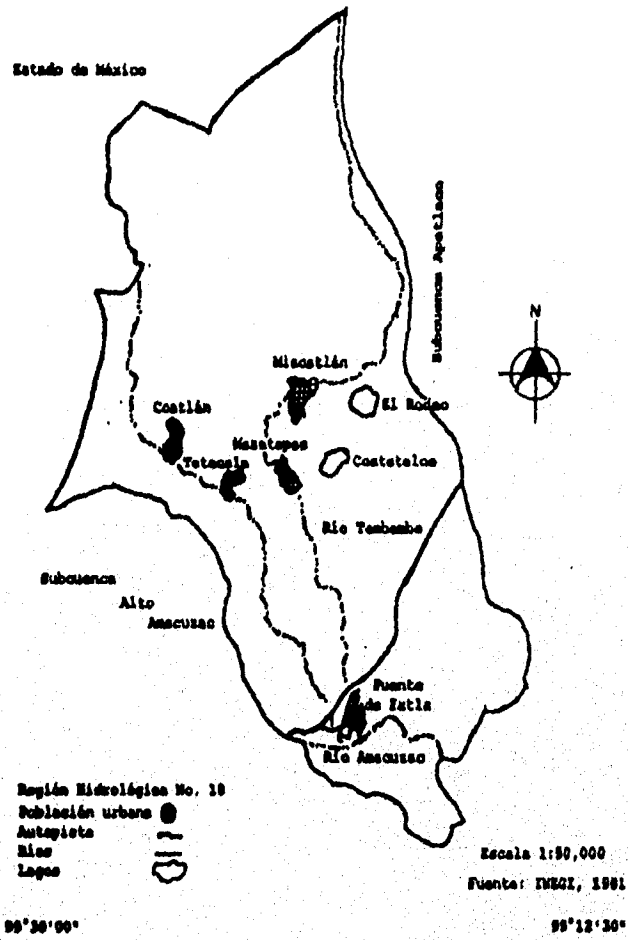
En las inmediaciones del poblado de Ocuilán, el Departamento del Distrito Federal tiene instalada la estación hidrométrica B-40 Ocuilán, a unos 10 Km aguas abajo. Al pasar junto al poblado de Chalma el río toma este nombre con el que continúa 21 Km hasta recibir por su margen derecha las aportaciones del río Xalatengo, cambiando su nombre por el río Coatlán. Posteriormente y 24 Km aguas abajo recibe por su margen izquierda las aportaciones del río Tembembe, a la altura del poblado de Fuente de Ixtla en donde recorre 6 Km hasta confluír con el río Amacuzac (Secretaría de Recursos Hidráulicos, 1970).

El agua del río es empleada en el riego del Valle de Chalma y en su mayor parte lo utiliza la Compañía de Luz y Fuerza para la generación de energía eléctrica. Aguas abajo su caudal se utiliza para riego de las zonas de Tetecala y Cocoyotla, zonas productoras de caña de azúcar. Recibe también el aporte del río Tembembe a 500 m al sur de Fuente de Ixtla.

Fig. 2. SUBCUENCA DE LOS RÍOS TEMBEMBE Y CHALMA

99°30'00"

99°12'30"



### 3.3 Clima

El clima según la clasificación de Köppen, modificada por García y Falcón (1979), a altitudes mayores de 2000 msnm es templado subhúmedo con temperatura media anual entre 12 y 18° C, con lluvias en verano. En la zona con altitudes de entre 1600 y 2000 msnm el clima es semicálido, el más cálido de los templados, con temperatura media anual mayor de 18° C y la del mes más frío inferior a 18°C. Por último, en la zona situada abajo de la elevación de 1600 msnm, el clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual mayor de 22°C y la del mes más frío mayor de 28°C (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1981).



#### 4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

##### Hipótesis

Debido a que en el Estado de Morelos se han registrado casos de cólera, entonces es muy probable detectar la presencia de indicadores de contaminación y particularmente *Vibrio cholerae* O1 y *Salmonella spp*, en el cauce del río Chalma.

##### Generales

Detectar la presencia de los agentes patógenos de *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella spp*, así como los indicadores de contaminación biológica (coliformes fecales y estreptococos fecales).

Comparar cualitativamente tres métodos de concentración de *Vibrio cholerae* y *Salmonella spp*: Hisopo de Moore, Red de arrastre planctónico y superficies naturales.

##### Particulares

Aislar y determinar la presencia de las bacterias patógenas del género *Vibrio cholerae* O1 y *Salmonella spp*, mediante pruebas bioquímicas.

Determinar y cuantificar la presencia de indicadores de la contaminación biológica.

## 5 MATERIAL Y METODOS

Con el propósito de caracterizar la mayor parte de las condiciones de la zona de estudio se seleccionaron las estaciones de muestreo de acuerdo a los siguientes criterios: Localización de las fuentes de contaminación, la accesibilidad a los sitios de muestreo en cualquier época del año, caudal y usos del agua (fig. 3 y tabla 2).

Tabla 2. Descripción de las estaciones de muestreo en el río Chalma.

Estaciones de muestreo			
Número	Nombre	Altitud (msnm)	Km
1	Ahuehete	2000	7
2	El Platanar	1500	28
3	Cocoyotla	1050	39
4	Coatlán del río	1000	44
5	Cuautlita	950	51
6	Cuauichichinola	900	57
7	Puente de Ixtla	850	66
8	El Coco	800	72

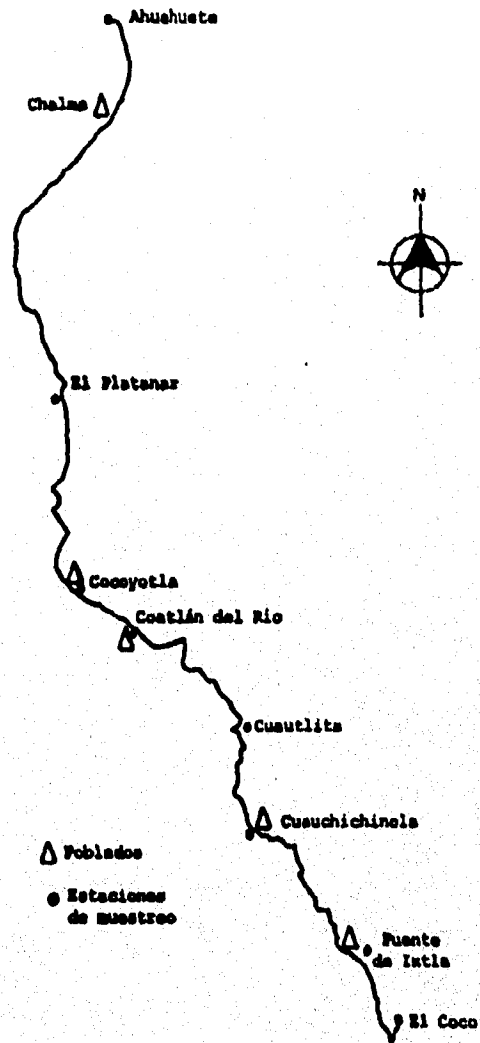
Se realizaron seis muestreos por cada estación comprendidos desde el mes de mayo hasta el mes de octubre de 1992, donde se efectuaron las siguientes mediciones *in situ* :

- Altitud (altímetro); temperatura (termómetro); pH (potenciómetro Corning de campo); conductividad eléctrica (conductímetro Mod. 33 STC); oxígeno disuelto (oxímetro YSI Mod. 58) y gasto (molinete contrastado), de acuerdo con APHA et al., 1989; Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1982.

- A las muestras de agua recolectadas se determino los siguientes parámetros: fosfatos (Técnica cloruro estanoso) y nitratos (Técnica Kjeldhal) (APHA et al., 1989).

La recuperación y determinación de coliformes fecales y estreptococos fecales se realizó de la manera descrita en el anexo I y II. Para muestrear se utilizaron botellas ámbar con 500 mL de capacidad con boca ancha y tapón esmerilado previamente esterilizadas a 15 lb de presión durante 15 min. Las muestras simples de agua se tomaron a contracorriente, una vez recolectadas se mantuvieron a 4° C durante el transporte al laboratorio (6 horas) y se analizó por la técnica de filtro de membrana (APHA et al., 1989).

FIGURA 3. ESTACIONES DE MUESTREO, RÍO CHALMA



En cuanto a el análisis de *V. cholerae* y *Salmonella spp* se utilizaron los siguientes métodos de concentración :

a) Hisopo de Moore está fabricado con una gasa de algodón de malla cerrada de 3 X 0.64 m, de la que se cortaron seis trozos de 0.64 X 0.50 m superponiéndolos a lo largo de la zona media de 0.50 m y un ancho aproximado de 0.08 m perpendicular a ella, uniendo los dos lados, uno sobre otro y a continuación las bandas en forma de acordeón fueron fijadas sólidamente con un hilo nylon, a manera que forme una especie de cabeza de la que sobresalen dos asas de cordón: una para amarrar el cordel a un punto fijo y la otra para sujetar un plomo. Dicho hisopo es previamente esterilizado envolviéndolo en papel tipo kraft a 15 lb de presión durante 15 min en el autoclave. El tiempo de exposición de hisopo en el agua fue de 72 hrs (Rodier, 1981).

b) Para el método de red de arrastre planctónico se utilizó un red cónica del No. 20 con una abertura de malla de 54  $\mu$ m, la cual contenía un pequeño trozo de gasa en el receptáculo final (buquet). El arrastre se efectuó a contracorriente durante 15 min, a una profundidad de 10 cm (superficial).

c) Para el muestreo de superficies naturales que actúan como sustrato, se utilizó el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*).

Las muestras obtenidas de los tres métodos se depositaron en bolsas de polietileno previamente esterilizadas con rayos U.V. durante tres horas, cada bolsa contenía 400 mL de medio de transporte Cary-Blair previamente esterilizado en flujo de vapor durante 15 min. Una vez recolectadas y etiquetadas se mantuvieron a temperatura ambiente evitando una exposición directa a la luz, hasta su análisis en el laboratorio.

La determinación en el laboratorio fue conforme a APHA et al., 1989 (Anexo III y IV), corroborando al mismo tiempo con el sistema comercial de identificación de Enterobacterias API 20E, que es una versión estandarizada en miniatura que consta de 23 pruebas bioquímicas (ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, H<sub>2</sub>S, URE, TDA, IND, VP, GEL, MAN, SAC, MEL, AMY, ARA, INO, SOR, RHA, GLU, OX, NO<sub>2</sub>). Básicamente el sistema API 20E consiste en una tira de material plástico con microtubos que contienen sustratos deshidratados. Los sustratos son reconstituidos por adición de una suspensión bacteriana e incubadas para que los organismos utilicen los medios contenidos en los tubos y se lean cuando los diferentes sistemas de indicadores varien por los metabolitos producidos o reactivos que se añaden, generalmente después de 18 a 24 horas de incubación a 35 -37 ° C.

El procedimiento se basa en:

a) hacer una suspensión bacteriana con solución salina al 0.85% ajustando la turbiedad al equivalente del tubo No. 1 en la escala de Mc. Farland.

b) Inocular la tira con esta suspensión e incubar de 18-24 hora a 35-37°C.

c) Leer las reacciones formadas, algunas directas y otras mediante la adición de algún reactivo revelador. Hacer también prueba de oxidasa a la bacteria en estudio.

d) Y leer el resultado en el libro de códigos para identificar tanto género como especie del microorganismo en estudio.

Para medir cuantitativamente las diferencias entre las estaciones se realizó un análisis de distancias considerando la euclidiana y la de Bray-Curtis, el procesamiento de los datos se hizo a través de una matriz de disimilaridad en la que se utilizan los coeficientes de distancia para conocer el grado de separación entre dos puntos o estaciones.

El fundamento teórico de las medidas de distancia (métricas) está dada por el teorema de Pitágoras. El cual permite representar por la hipotenusa de un triángulo rectángulo, la distancia que separa a dos puntos, tomando como base:

$$C = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Expresión que puede ser representada gráficamente ubicando cada estación dentro de un espacio geométrico (Ludwing y Renolds, 1988).

## 6 RESULTADOS

Los resultados de los análisis bacteriológicos corresponden a las siguientes estaciones: Ahuehuate (1), Platanar (2), Cocoyotla (3), Coatlán del río (4), Cuautlita (5), Cuauchichinola (6), Puente de Ixtla (7) y el Coco (8) establecidas a lo largo del río Chalma, Morelos.

Tabla 3. Coliformes fecales (Log UFC/100 mL) determinados en el río Chalma, Morelos (1992).

MES \ EST.	1	2	3	4	5	6	7	8
MAY	0	[SP1 *	5.70	5.88	*	6.26	6.17	6.28
JUN	3.30	4.99	4.95	4.58	4.96	4.15	4.08	4.28
JUL	0	6.07	6.04	6.13	5.73	5.62	4.84	6.31
AGO	0	6.08	5.48	6.0	5.60	6.15	6.15	6.28
SEP	0.60	5.48	5.30	5.70	5.78	5.0	5.70	6.89
OCT	0.90	6.30	6.79	6.64	7.23	7.12	7.10	6.90
n	6	5	6	6	5	6	6	6
X	0.8	5.8	5.71	5.8	5.86	5.7	5.7	6.1
S	1.3	0.56	0.64	0.68	0.83	1.04	1.07	0.97
MEDIANA	0.75	6.07	5.59	5.94	5.73	5.9	5.9	6.31
MODA	0	-	-	-	-	-	-	6.28
MIN.	0	4.99	4.95	4.58	4.96	4.15	4.08	4.28
MAX.	3.30	6.38	6.79	6.64	7.23	7.12	7.10	6.90

Tabla 4. Estreptococos fecales ( Log UFC/100 mL ) determinados en el río Chalma, Mor. (1992).

MES \ EST.	1	2	3	4	5	6	7	8
MAY	0	*	5.1	5.5	*	5.9	5.5	5.4
JUN	0	4.81	4.8	4.4	4.9	4.0	3.6	4.1
JUL	0	4.48	4.3	4.4	4.0	5.1	4.0	5.2
AGO	0	6.6	5.0	5.0	5.5	5.4	6.0	5.8
SEP	0	5.3	5.3	5.3	5.3	5.0	5.3	5.3
OCT	0	5.0	5.3	5.3	6.3	5.0	5.3	6.2
n	6	5	6	6	5	6	6	6
X	0	5.1	5.0	5.0	5.2	5.0	4.9	5.3
S	0	0.57	0.38	0.43	0.83	0.6	0.9	0.7
MEDIANA	0	5.0	5.0	5.1	5.1	5.1	5.3	5.3
MODA	0	-	5.3	4.5/5.3	5.3	5.0	5.3	-
MIN.	0	4.48	4.3	4.5	4.0	4.0	3.6	4.1
MAX.	-	6.0	5.3	5.5	6.3	5.9	6.0	6.2

n : NÚMERO DE MUESTRAS  
 X : PROMEDIO  
 S : DESVIACIÓN ESTANDAR  
 MIN: MÍNIMO  
 MÁX: MÁXIMO  
 UFC/100 mL: UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS  
 \* Análisis no realizado

Tabla 5. Resultados bacteriológicos de *V. cholerae* O1 y *Salmonella* spp, en el río Chalma, Mor.

Estaciones	Método de concentración	MAY	JUN	JUL	AGO	SEF	OCT
COATLAN	HISOFO	A.A.	A.A.	(1)	A.A.	A.A.	A.A.
	SUP. NATURAL	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.
	RED PLANC.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.
CUAUCHICHINOLA	HISOFO	A.A.	A.A.	(1,2)	(1)	A.A.	A.A.
	SUP. NATURAL	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.
	RED PLANC.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.
COCO	HISOFO	A.A.	A.A.	(1)	(3)	(3)	A.A.
	SUP. NATURAL	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.
	RED PLANC.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.	A.A.

A.A. = Ausente ambos (*V. cholerae* O1 y *Salmonella* spp.)

1) *V. vulnificus*

2) *V. fluvialis*

3) *V. cholerae* NO O1

Tabla 6. Tabla comparativa de los métodos de concentración de bacterias : hisopo de Moore, Red de arrastre planctónico y superficies naturales (*Eichhornia crassipes*).

VARIABLES	HISOPO DE MOORE	RED DE ARRASTRE PLANCTÓNICO	SUPERFICIES NATURALES
Tiempo de entrega de resultados	10 Días	8 Días	8 Días
Tiempo de muestreo	3 Días	15 Min.	5 Min.
Vol. filtrado	***	**	-
Costo de muestreo	***	**	*
Riesgos	**	***	*
Dificultad de muestreo	**	***	*
Exposición a vandalismo ó pérdida de material por maniobra	***	***	*
Eficiencia	***	-	-

\* Bajo

\*\* Moderado

\*\*\* Alto

● Evaluada en base a la presencia-ausencia de *V. cholerae* y *Salmonella* spp.

Tabla 7. Comparación de temperatura y pH registrados en el río Chalma con los citados en la literatura.

BACTERIAS	PARÁMETROS		SECCIÓN DEL RÍO		
	TEMPERATURA (°C)	pH	KM	TEMP. (°C)	pH
<i>V. cholerae</i>	Ámbito 16-43 Óptima 37 (Joklik et al., 1989 y Secretaría de Salud, 1992).	Ámbito 7-10 Óptimo 7-9 (Joklik et al., 1989 y Davis et al., 1990)	7	16.0	7.0
			28	21.2	8.0
			39	23.4	8.2
			44	23.9	7.9
<i>Salmonella spp</i>	Ámbito 12-41 Óptima 37.5 (Capella et al., 1980)	Ámbito 2-8 (Capella et al., 1980)	51	23.9	7.5
			57	24.7	7.5
			66	25.6	7.4
			72	26.2	7.5



Tabla 6. Resultados de los Parámetros físico-químicos mensuales del río Chalma, Morelos y su comparación con los criterios ecológicos de calidad del agua (SEDUE, 1990).

Variable	Mayo							Junio							Julio						
	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G
n	3	4	6	6	3	3	6	8	4	8	8	8	8	8	8	4	8	8	8	8	8
x	21.3	1.6	8	409	7.1	0.66	1.03	30	1.3	7.6	385	7.2	0.6	0.03	22.1	2.8	7.3	312.3	7.7	0.7	7.93
s	2.1	0.4	0.7	223	0.3	0.2	0.5	6	0.3	0.05	161	0.4	0.2	0.02	2.8	0.1	0.7	114.7	0.3	0.66	0.08
Med	28	1.5	8.4	400	7.1	0.6	1.1	30	1.3	7.6	370	7.2	0.7	0.03	22	2.8	7.3	330	7.7	0.7	8.07
Moda	-	1	7	300	-	-	-	30	1.3	7.7	370	7.3	0.8	0.01-0.04	24	2.9	7	320	7.6	0.7	0.06/0.08
Mín	25	1.2	7.2	65	6.6	0.5	0.06	17	0.9	7.6	70	6.4	0.2	0.01	16	2.6	6.2	70	7.1	0.6	0.01
Máx	29	2.2	9.4	700	7.6	0.9	1.4	36	1.7	7.7	650	7.9	0.8	0.08	24	2.9	8.6	460	8.2	0.8	0.26
1*			5-9		4	5	0.1			5-9		4	5	0.1			5-9		4	5	0.1
2*			4.5/7.9	1						4.5/9	1						4.5/9	1			
3*						90							90								
4*			0.2		5	90	0.1			0.2		5	90	0.1			0.2		5	90	0.1

25

Variable	Agosto							Septiembre							Octubre						
	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G	A	B	C	D	E	F	G
n	3	4	8	8	8	8	8	7	4	8	8	8	8	7	7	7	-	7	7	7	7
x	21.2	4.7	7.5	311.8	7.7	0.6	0.05	21.3	4.3	7.2	201.8	7.8	0.71	0.31	21	-	8.1	294.8	8	0.77	0.18
s	2.9	0.7	0.6	119	0.2	0.6	0.3	1.2	0.6	0.3	66.1	0.4	0.06	0.06	1.2	-	0.3	25.3	0.8	0.06	0.06
Med	20.5	4.8	7.3	306	7.8	0.1	0.06	21.5	4.25	7.2	212.5	7.9	0.71	0.24	21.3	-	8.0	287	8	0.79	0.17
Moda	23	5	8	263/312	7.9	0.4	0.02/0.08	21	3	7.2/7	208	7.4	0.70	-	21.7	-	8.4	283	-	-	0.13
Mín	15	3.9	6.7	106	7.3	0.6	0.01	19	3.6	6.7	70	7.4	0.77	0.22	19	-	7.6	273	7.2	0.65	0.13
Máx	23	5.4	8.3	501	8.0	5	0.1	23	5	7.7	250	8.4	0.63	0.62	23	-	8.4	347	8.3	0.83	0.28
1*			5-9		4		0.1			5-9		4	0.77	0.1			5-9		4	5	0.1
2*			4.5/9	1						4.5/9	0.1		5				4.5/9	1			
3*																					
4*			0.2		5	90	0.1			0.2		5	90	0.1			0.2		5	90	0.1

1\* Abastecimiento de agua potable  
 2\* Riego  
 3\* Pecuario  
 4\* Protección para la vida acuática  
 - Lectura no realizada

A: Temp. Agua (°C)  
 B: Gasto (m³/s)  
 C: pH  
 D: Conductividad (µmhos/cm²)  
 E: O.D. (mg/L)

F: Nitratos (mg/L)  
 G: Fosfatos (mg/L)

Tabla 9. Resultados físico-químicos y bacteriológicos del río Chalma (mayo-septiembre, 1992) y su comparación con los criterios ecológicos de calidad del agua y salud (CECCA-00/89 Y NOM-127-SSA1-1994).

Variable	GASTO m <sup>3</sup> /seg	NO <sub>3</sub> mg/L	PO <sub>4</sub> mg/L	O.D mg/L	TEMP. (°C)	pH	COND. µmhos /cm	Coliformes fecales UFC/100 mL	Estreptococos fecales UFC/100 mL
n	20	35	37	38	41	38	38	37	38
X	2.95	0.67	0.27	7.55	23.6	7.56	319.6	840351	186868
S	2.85	0.69	0.08	7.6	4.8	7.6	316.0	500000	100000
MEDIANA	3.9	0.67	0.08	7.9	23	7.7	320.0	500000	200000
MODA	1.47	0.13	0.41	0.43	21/23	0.57	151.4	1330000	257343
Min.	0.99	0.23	0.1	6.4	15	6.2	65.0	0	0
Máx.	5.4	0.67	1.4	8.4	36	9.4	700.0	7700000	1000000
1*		5.0	0.1	4.0		5-9		1000▲	
2*						4.5-9.0	1.0	1000▲	
3*		90.0							
4*			0.1	5.0		*0.2		< 200▲	
5*								< 200▲	
6*								0▲	

- 1\* Abastecimiento de agua potable  
 2\* Riego  
 3\* Pecuario  
 4\* Protección para la vida acuática  
 5\* Recreativo  
 6\* Uso y consumo humano (NOM-127-SSA1-1994)

- ▲ NMP/100 mL  
 ● UFC/100 mL

Tabla 10. Resultados de Distancia Euclidiana Relativa (DER) de ocho estaciones del río Chalma, Mor., usando el programa Statistical Ecology.

Porcentaje de diferencia entre la estación 1 con:

2) 0.25 3) 0.24 4) 0.25 5) 0.26 6) 0.24 7) 0.25 8) 0.27

Porcentaje de diferencia entre la estación 2 con:

3) 3.36 4) 6.97 5) 0.01 6) 4.06 7) 1.07 8) 2.63

Porcentaje de diferencia entre la estación 3 con:

4) 2.66 5) 4.82 6) 6.94 7) 2.29 8) 5.99

Porcentaje de diferencia entre la estación 4 con:

5) 2.1 6) 3.3 7) 3.7 8) 3.3

Porcentaje de diferencia entre la estación 5 con:

6) 5.51 7) 2.53 8) 1.17

Porcentaje de diferencia entre la estación 6 con:

7) 2.98 8) 0.07

Porcentaje de diferencia entre la estación 7 con:

8) 3.70

Fig. 4 Representación gráfica de la ordenación ecológica con la distancia relativa euclidiana, de ocho estaciones del río Chalma.

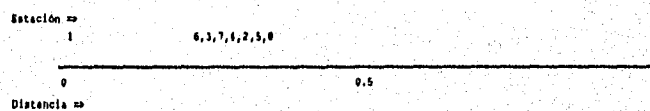


Tabla 11. Resultados de Distancia Bray-Curtis de ocho estaciones del río Chalma, Mor., usando el programa Statistical Ecology.

Porcentaje de diferencia entre la estación 1 con:  
 2) 99.91 3) 99.94 4) 99.94 5) 99.97 6) 99.97 7) 99.97 8) 99.98

Porcentaje de diferencia entre la estación 2 con:  
 3) 23.90 4) 23.10 5) 63.82 6) 53.36 7) 52.17 8) 63.09

Porcentaje de diferencia entre la estación 3 con:  
 4) 2.93 5) 47.10 6) 33.77 7) 32.30 8) 46.15

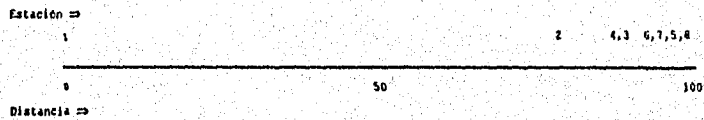
Porcentaje de diferencia entre la estación 4 con:  
 5) 47.76 6) 34.51 7) 33.05 8) 46.81

Porcentaje de diferencia entre la estación 5 con:  
 6) 15.87 7) 17.47 8) 1.89

Porcentaje de diferencia entre la estación 6 con:  
 7) 3.89 8) 14.67

Porcentaje de diferencia entre la estación 7 con:  
 8) 16.28

Fig. 5 Representación gráfica de la ordenación ecológica con la distancia de Bray-Curtis, de ocho estaciones del río Chalma.



## 7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El análisis de resultados bacteriológicos se realizó tomando en cuenta la Norma Oficial Mexicana emitida por la Secretaría de Salud, 1996 (NOM-127-SSA1-1994), que establece los límites permisibles de calidad de agua para uso y consumo humano para coliformes fecales de 0 UFC/100 mL.

En el río Chalma, se determinó la presencia de coliformes fecales en un intervalo de 0 a  $77 \times 10^5$  UFC/100 mL, ámbito que se encuentra por encima del valor permisible. En cuanto a la presencia de estreptococos fecales se encontraron en un intervalo de 0 a  $1 \times 10^6$  UFC/100 mL (tabla 9).

Ante estos niveles de organismos indicadores de contaminación, se puede afirmar que el aspecto microbiológico es uno de los principales problemas en el río, tomando en cuenta que en la mayoría de las localidades el agua es utilizada para recreación con contacto primario por los turistas y pobladores. Los valores encontrados significan un riesgo potencial a la salud por transmisión de enfermedades gastrointestinales, siendo la principal fuente de entrada las descargas residuales municipales o domésticas que son vertidas al río sin previo tratamiento.

En la última estación (el Coco) de la secuencia de muestreo del río, se detectó la presencia de *V. cholerae* NO O1 mediante pruebas bioquímicas, utilizando el método de concentración del hisopo de Moore (tabla 5). Dicho organismo es considerado un patógeno potencial ya que produce una toxina similar a la de *V. cholerae* O1. Se conoce por la literatura que ha causado brotes, aunque la mayoría de los aislamientos provienen de casos esporádicos. Es de señalarse que el *V. cholerae* NO O1 no causa el verdadero cólera epidémico. La pequeña cantidad de casos notificados es el resultado de varios factores; es probable que la mayoría de las cepas ambientales carecen de los factores de colonización necesarios, de las toxinas apropiadas o de otros factores determinantes de virulencia, para causar la enfermedad en el humano (Morris et al., 1990). Cuando se presenta la infección, los pacientes pueden ser asintomáticos o sólo levemente enfermos y en consecuencia, no recurrir a la atención médica.

En la sexta estación (Cuauhichinola) se aisló a *Vibrio fluvialis* con el hisopo de Moore (tabla 5). Este organismo, según la información analizada, es común en los ríos y ha sido asociada a casos de gastroenteritis (Collins y Lyne, Op cit).

También se encontró en las estaciones de Coatlán, Cuauhichinola y El Coco el *Vibrio vulnificus*, con el método de concentración del hisopo de Moore (tabla 5), que es habitante normal del medio marino, pero que se desarrolla en medios de baja salinidad (1 a 2 ‰) a una temperatura de 37°C, mostrando una periodicidad de aparición principalmente en el verano (Tamplin et al, 1982).

*V. vulnificus* es una bacteria que requiere de atención ya que produce infecciones gastrointestinales (Blake et al, 1979; Oliver, 1981a; Tachet et al, 1984; Jenkins y Johnston, 1986) que han ido en aumento (Hollins et al, 1976; Matsuo et al, 1978; Blake et al., 1980). Es productora de una poderosa toxina extracelular (Kreger y Lockwood, 1981) con extraordinarias propiedades de invasión (Poole y Oliver, 1978; Bowdre et al, 1981; Oliver, 1981b). La infección típica suele ocurrir después de la ingestión de agua, alimentos (ostras, pescado) y heridas infectadas (Hollins Op cit, Blake, Op cit; Ghosh y Bowen, 1980). Dicho organismo puede llegar a producir septicemia mortal (cirrosis) u otras enfermedades como diabetes. En algunos casos resulta fatal, cuando los pacientes han presentado una disfunción del hígado y elevados niveles de hierro en la sangre (Tacket, 1987).

Con respecto a la presencia de *Salmonella spp* no fue aislada en ninguna de las estaciones (tabla 5); ello no significa que no esté presente en el medio, sino que pudo haber evolucionado a un estado " viable, pero no cultivable " (forma VNC). Esta evolución puede ser considerada como un proceso adaptativo que corresponde a la escasez de alimento (Colwell, 1983; Grimes y Colwell, 1986).

La no detección de *V. cholerae* en los sitios de muestreo puede ser el resultado de las medidas adoptadas por el sector salud, para evitar la diseminación del cólera.

Dado los resultados es evidente que la presencia de bacterias patógenas específicamente de *Vibrio* en el río , constituyen el mayor riesgo sanitario para las comunidades que están íntimamente relacionadas al uso del agua del río Chalma.

De la comparación cualitativa de los métodos de concentración de bacterias (tabla 6) se puede puntualizar los siguientes aspectos:

a) El método de concentración utilizando el hisopo de Moore presenta las siguientes desventajas:

- El tiempo de muestreo es de 72 horas, situación que consume tiempo para poder actuar oportunamente para evitar la diseminación del cólera en caso de estar presente.

- Los resultados de los análisis bacteriológicos consumen aproximadamente 20 días, más el tiempo de muestreo lo que retrasa la ejecución de medidas en caso de presentarse un brote epidémico.

- La exposición al vandalismo es elevado, ya que se busca sujetar el hisopo en puntos fijos que generalmente se encuentran cerca de la ribera del río (árboles), lo que los hace susceptibles al vandalismo, sumando el riesgo al que se expone la persona que lo manipule, así como a la pérdida de información y recursos económicos que conlleva lo anterior.

- No es recomendable el uso de éste método para aguas muy contaminadas por el riesgo de contagio al personal de muestreo.

- La dificultad de muestreo y riegos son moderados para el personal capacitado comparandolo con el método de red de arrastre plántonico en el que hay contacto directo algunas veces con el agua.

En cuanto a las ventajas de éste método es el tiempo de exposición del hisopo de Moore, permitiendo filtrar un volumen mayor de agua.

- La eficiencia se evaluó con base en la presencia-ausencia de *V. cholerae* O1 y *Salmonella spp* y aunque no se registró la presencia de ellos, se determinaron otras especies del género *Vibrio*.

b) En el método de concentración con red de arrastre plántonico se incurrieron en errores durante el tratamiento de la muestra ya que no se tuvo la seguridad de haber realizado la separación física de la bacteria (de haber estado presente), de los organismos que presentan quitina; además de no haber realizado una previa concentración de la muestra. La anterior consideración surge de un estudio de diseño de un método para determinar bacterias utilizando la red de arrastre plántonico (Oliver y Stanislaw, 1988). Otro aspecto que pudo haber contribuido para no detectar *V. cholerae* O1 y *Salmonella spp.* pudo haber sido el volumen filtrado de agua ya que se realizó durante 15 minutos, existiendo la posibilidad de manejar diferentes tiempo de filtrado.

La red de arrastre planctónico presenta las siguientes desventajas:

- Filtrar menor volumen de agua, por el tiempo de muestreo de 15 minutos.

-Es de uso limitado en aguas con elevada cantidad de sólidos suspendidos y aguas contaminadas.

-La dificultad y riesgos de muestreo es alto, pues el personal se expone al contacto directo del agua al sujetar la red ó a la posible pérdida de material.

La ventaja de éste método es el conocer el volumen de agua filtrada así como el costo de muestreo menor comparandolo con el método de Moore.

c) La concentración de bacterias utilizando las superficies naturales (*Eichhornia crassipes*), no arrojó resultados positivos para *V. cholerae* y *Salmonella spp.* En un estudio realizado por Spiraw *Op cit*, se asocio a *V. cholerae* O1 (biotipo el Tor) con la superficie de *Eichhornia crassipes*, que se encontraba flotando en un depósito rural de agua; condiciones distintas a las del río Chalma donde hay corriente por lo que cabe la posibilidad de que haya existido un lavado de bacterias por la corriente del río.

Las superficies naturales presentan las siguientes ventajas:

- El tiempo de muestreo es relativamente corto, ya que sólo depende del tiempo que se tarde el personal en tomar un ejemplar del lirio acuático.
- El costo del muestreo es relativamente más bajo que los métodos anteriores con respecto al tiempo y material empleado.
- El riesgo de contagio durante el muestreo es bajo.
- Optimiza tiempo para dar los resultados.

La desventaja de este método es que depende de las características de la superficie natural seleccionada, por ejemplo la existencia de lirio acuático y bajo que condiciones.

Respecto a los análisis físicos y químicos se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos obteniéndose los promedios, mediana, moda, desviación estándar y valores mínimo y máximo del conjunto de datos. Se tomo en cuenta los criterios ecológicos de calidad del agua emitidos por SEDUE (1990) y comparándolos con las concentraciones que se presentan en el río en las diferentes estaciones (tabla 8).

La temperatura del agua se encontró en un intervalo de 15-36° C mostrando una variación considerable a lo largo del río.

El pH fue desde ligeramente ácido hasta francamente alcalino pues se encontro en un intervalo de 6.2 a 9.4, denotando un gran ámbito de variación (tabla 9). Si observamos los valores promedio, la mediana, la desviación estándar y la moda, se tiene que el pH del agua generalmente es alcalino entre 7 y 8.5 unidades de pH.

Los Valores de pH se encuentran dentro del límite para la protección de la vida acuática y para cualquier uso establecido por las Normas Técnico Ecológicas (SEDUE, 1990) en la mayoría de los sitios de muestreo, con excepción de Cocoyotla durante el mes de mayo que registro un valor de 9.4, valor no aceptable comparándolo con el valor máximo permisible de 9.0.

Dentro de los factores más importantes a considerar para la sobrevivencia de las bacterias se encuentra la temperatura y el pH. Al realizar una comparación de los valores obtenidos durante el periodo de muestreo de los factores antes mencionados con los que cita la literatura (Joklij et al, Op cit; Secretaría de Salud Op cit; Davis et al, Op cit y Capella et al, Op cit), se observa que los valores que se registró de temperaturas y pH se encuentra dentro del ámbito en el que se puede desarrollar *V. cholerae* y *Salmonella spp.* y que por lo tanto no son un impedimento para el desarrollo de las bacterias (tabla 7).



La conductividad presentó un intervalo de 65 a 700  $\mu\text{mhos/cm}$ , siendo el valor más alto el detectado en la estación el Cocco, la cual recibe las aportaciones de su respectiva cuenca. Comparando estos resultados con los obtenidos por Global Environment Monitoring System (GEMS, 1987), en 232 ríos, el valor promedio es de 250  $\mu\text{mhos/cm}$  y considera un valor extremo de 900  $\mu\text{mhos/cm}$ , por lo que se puede considerar dentro de los valores normales encontrados en los ríos (Tabla 9).

El oxígeno disuelto presentó un intervalo de 6.4 a 8.4 mg/L, denotando buenas condiciones para el desarrollo de la biota acuática y para todos los usos establecidos (Tabla 9).

La forma más estable del nitrógeno combinado en aguas superficiales son los nitratos. Estos se presentaron en un intervalo de 0.23 a 0.87 mg/L. El límite permisible establecido para fuentes de abastecimiento de agua potable es de 5 mg/L (SEDUE, 1990), por lo que el nitrato no representa ningún problema para su uso. El GEMS realizó un estudio de 230 ríos encontrando un valor medio de 0.7 mg/L, presentando el río Chalma condiciones dentro de lo esperado en aguas superficiales, si consideramos al promedio, mediana y moda (Tabla 9).

Los fosfatos se presentaron en un intervalo de concentración de 0.1 a 1.4 mg/L. Dicho valor indican que el río está limitado en ciertas ocasiones para utilizarse como fuente de abastecimiento de agua potable, ya que el valor permisible para el fosfato es de 0.1 mg/L (SEDUE, 1990), confirmando las medidas de tendencia central y la desviación estándar. Las posibles fuentes de entrada son las zonas agrícolas que utilizan al fósforo como fertilizante y descargas municipales (Tabla 9).

Para medir cuantitativamente las diferencias entre las estaciones se realizó un análisis de distancias considerando la euclidiana y la de Bray-Curtis. El procesamiento de los datos se hizo a través de una matriz de disimilaridad en la que se utilizan los coeficientes de distancia para conocer el grado de separación entre dos estaciones.

Los resultados de este análisis de distancias y ordenación ecológica se muestran en las tablas 10 y 11, así como en las figuras 4 y 5.

Básicamente la ordenación ecológica de las estaciones con las dos distancias analizadas, agrupan a los datos en dos grupos: el primero nos muestra a la estación denominada el Ahuehuate, y el segundo lo componen las restantes estaciones.

Se observa que la estación Ahuehuate se aleja considerablemente de las demás estaciones. Lo anterior concuerda con los valores obtenidos de los parámetros físicos, químicos y bacteriológicos del río Chalma, los cuales son muy contrastantes con las demás estaciones.

Se muestra también la existencia de dos extremos de condiciones: por un lado el sitio menos contaminado (el Ahuehuate) y por otro, el más contaminado (el Coco). Hasta este punto coinciden las distancias euclidiana relativa y la de Bray-Curtis; pero cuando se observa el ordenamiento del segundo grupo sobre el eje, se presentan diferencias de ordenamiento entre ambos métodos de distancia.

Lo anterior puede deberse a las variaciones del método numérico empleado, ya que como lo reporta Ludwig y Reynolds (1988), es común encontrar diferencias cuando se emplean diferentes distancias ecológicas. Esto establece incertidumbre para ordenar el segundo grupo de estaciones, pero no modifica las primeras interpretaciones, esto es la existencia de dos grupos y el reconocimiento de la estación uno y ocho como posiciones extremas. Otra posible explicación es la presencia de sitios de descarga de agua residual presentándose en mayor número en el área en que se encuentra comprendido el segundo grupo.

La hipótesis propuesta fue parcialmente comprobada, ya que se detectó la presencia de indicadores de contaminación (coliformes y estreptococos fecales) en cifras elevadas a lo largo del cause del río, sin embargo, no se detectó *V. cholerae* O1 y *Salmonella* spp.

## 8 CONCLUSIONES

El principal problema presente en el río Chalma es la contaminación microbiológica ya que el agua no es apta para uso y consumo humano durante el curso del río y por lo tanto presenta riesgos a la salud por enfermedades hidrottransmitibles.

En cambio las condiciones físicas y químicas en general se encuentran dentro de norma para uso y consumo humano con excepción de los fosfatos y pH para un punto de muestreo.

La estación menos contaminada es la primera (el Ahuehuate) y conforme se avanza eb el río se va incrementando la contaminación registrando la mayor contaminación bacteriológica en la última estación (el Coco).

Además las fuentes de contaminación más importantes corresponden a las descargas puntuales provenientes de los poblados Chalma, Cocoyotla, Coatlán del río, Cuauchichinola y Puente de Ixtla.

Del análisis comparativo de los tres métodos de concentración de bacterias utilizados, ninguno arrojó resultados positivos para *V. cholerae* O1 y *Salmonella* spp. Sólo con el método de concentración del hisopo de Moore se detectaron: *V. cholerae* NO O1, *V. fluvialis* y *V. vulnificus* las cuales son especies asociadas a casos de gastroenteritis. Dados estos resultados este método sigue siendo el más efectivo.

Los fosfatos están presentes en una elevada concentración, por lo que el río esta limitado en ciertas ocasiones para utilizarse como fuente de abastecimiento de agua potable. Las posibles fuentes son las zonas agrícolas así como las descargas municipales.

La temperatura y el pH registrados en el río Chalma no son impedimento para que se desarrolle *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp.

## 9 RECOMENDACIONES

Se sugiere:

.Realizar el monitoreo de calidad del agua preferentemente en los siguientes puntos: Ahuehuate, y el Coco, ya que el estudio de los dos puntos de muestreo nos muestran las dos condiciones extremas que puede presentar el río: menor y mayor contaminación.

.Continuar estudiando los métodos de concentración de bacterias propuestos en los siguientes puntos:

.Realizar el estudio utilizando bacterias indicadoras de contaminación o aquellas que son más frecuentes en cualquier curso de agua que permita establecer un análisis cuantitativo, para evaluar con mayor precisión los métodos.

.Realizar ensayos variando el tiempo de arrastre con la red de plancton.

.Revisar la técnica de separación de bacterias en organismos que presentan quitina.

.Utilizar superficies naturales que están en estrecha relación a la corriente y arraigadas algún sustrato.

.Estudiar si existe alguna relación entre los distintos estados de desarrollo del lirio acuático con la presencia de *V. cholerae*.

.Concientizar a la población de la importancia de preservar el recurso. Mediante la aplicación de programas de saneamiento básico en el río.

. Instalar redes de alcantarillado que concentren las aguas residuales de los poblados para evitar las descargas dispersas y/o puntuales hacia el río y que sean dirigidos hacia algún sistema de tratamiento ubicado en el poblado Puente de Ixtla.

Finalmente es evidente la desvinculación que existe entre las dependencias gubernamentales para abordar y atacar los problemas de salud pública. Ya que no se tiene acceso oportuno a una referencia puntual de sitios donde se registren casos de cólera.

## 10 BIBLIOGRAFIA

1. APHA - AWWA- WPCF (1989) Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17 th. Washington, D.C., USA. 1143pp.
2. Bauman, P; A. L. Furniss y J. V. Lee (1984) Genus and Vibrio En: Bergey Manual of Sistematic Bacteriology Vol. 1 Krieg, N. R; Holt, J. G. The Williams and Wilkins Baltimore. London 367-368 pp.
3. Beneson S. (1987) El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. OMS. 45 pp.
4. Bitton G. (1994) Wastewater Microbiology USA. Wiley 48-51 pp.
5. Blake, P. A.; R. E. Weaver y D. C. Hollis (1982) Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. Ann. Rev. Microbil. 34:341-367.
6. Blake, P. A; M. H. Merson; R. E. Weaver; D.G. Hollis y P.C. Mheulein (1979) Disease caused by marine Vibrio. N. Engl. J. Med. 300:1-5.
7. Bowdre, J. H.; Poole y J.D Oliver (1986) Edema and hemoconcentración in mice experimentally infected with *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun. 32:1193-1199.
8. Brock D. T. y M. T. Madigan (1988) Biology of microorganisms 5 de. Prentice Hall. New Jersey 835 pp.
9. Burrows W. (1974) Tratado de Microbiología 3 Ed. Interamericana México 901 pp.
10. Capella et al. (1980) Nociones Elementales de Microbiología Medica 2 Ed.. Méndez Cervantes. 76 pp.
11. Coetzee, O. J. (1962) Coliform index its use limitations. publ. Hlth., Johannesburg, 8:16-25.
12. Colwell, R. R.; R. J. Seidler; J. Kaper; S. W. Joseph; S. Gorges; H. Lockman; D. Maneval; H. Brodford; N. Roberts; E. Rommers; I. Huq, y A. Huq. (1981) Ocurrencia of *V. Cholerae* serotipo O1 in Maryland and Louisiana estuaries Appl. Environ. Microbil. 41:555-558.
13. Colwell, R. R. (1983) A volumen in Enviromental Science and Technology, J. Wiley and Sons. 47-52 pp.
14. Collins, C. H. y P. M. Lyns. (1989) Microbiological methods. Butter Worths & Cac Publishers. Kingawa y London. 329 pp.
15. Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental (1984) Coliformes Fecais Determicao pela tecnica de Membrana filtrante. Sao Paulo (L5.221) 1-17 pp.
16. Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental (1987) *Salmonella* - isolamento e identificacao, sao Paulo (L5.218) 12-33 pp.
17. Davis B. D.; R. Dulbecco; H. N. Eisen (1990) Microbiologia. Salvat. España 1241 pp.
18. De Mayo, C. (1991). Aislamiento, identificación y cuantificación de *Vibrio cholerae* en agua potable, aguas superficiales y residuales, CEPIS, 37 p.
19. Dirección General de Epidemiología (1991) Cólera Vigilancia Epidemiología Internacional 27-31 pp.
20. Equihua L.; B. Jimenez; J. Cortes.; P. Ramirez y P. Memije (1992) El cólera: una enfermedad diarreica 2 de. Manual No 1 IMTA, México 39 pp.
21. Feachem, R.G; D. Bradley; H. Garelick y D. Mora (1983) Sanitation and Disease, Healt Aspects of Excreta and Watewater Management, John Wilwy & Sons, USA. 74 pp.
22. Fernandez, E. E. (1981) Microbiologia sanitaria agua y alimentos. México, Universidad de Guadalajara, Vol 1:37.
23. Freeman, B. A. (1986) *Vibrio cholera* En: Microbiología de Burrows ed. 22 Interamericana México. 49-53 pp.
24. Garcia, E. de M. y Z. Falcón. (1979) Nuevo Atlas Porrúa de la República Mexicana. 4 ed. Ed. Porrúa, México 147 pp.
25. Gerba, C. P. (1987) Phageas indicators of fecal pollution En: Phage Ecology, S. M. Goyal, C. P. Gerba y G. Bitton, Eds. Wiley Interscience, New York. 23 pp.
26. Geldreich E. E. y B. A. Kenner (1969) Concepts of fecal streptococci in stream pollution. J. water pollut. Control Fed. 41:R336-R341.
27. Ghosh, H.K. y T.E. Bowen (1980) Halophilic Vibrios from human tissue infections an the Pacific Coast of Australia. Pathology 12:397.

28. Giono, C. S; C. L. Gutiérrez, y A. A. Hinojosa (1991) Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. INDRE, No. 10 Secretaría de Salud. México. 49 pp.
29. González, S. N. y S. P. Saltigeral (1992) Cólera. Conceptos actuales, Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill, México. 37 pp.
30. González, A. M. (1992) Cólera en Latinoamérica 1991, Tesis UNAM. FO.
31. Grant, W. D. y P. E. Long (1989) Microbiología ambiental Acribia, S. A. España. 46 pp.
32. Grimes, D. J. y R. R. Colwell (1986) FEMS. Microbiol. Lett. 34:161.
33. Hollis, D. G; R. E. Weaver; C. N. Baker y C. Thornsberry (1976) Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures. J. Clin. Microbiol. 3:425-431.
34. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (1991a) Boletín quincenal. Cólera/diarreas Infecciones. Secretaría de Salud. México. 16/Mayo
35. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (1991b) Boletín quincenal. Cólera/diarreas Infecciones. Secretaría de Salud. México. 13/Dic.
36. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (1992c) Boletín quincenal. Cólera/diarreas Infecciones. Secretaría de Salud. México. 13/Ene.
37. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (1992d) Boletín quincenal. Cólera/diarreas Infecciones. Secretaría de Salud. México. 15/May.
38. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (1992e) Boletín quincenal. Cólera/diarreas Infecciones. Secretaría de Salud. México. 15/Jun.
39. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (1981) Síntesis Geográfica de Morelos. SPP. México. 27-36 pp.
40. Jenkins, R. B; y J. M. Johnston (1986) Inland presentation of *Vibrio vulnificus*; primary septicemia and necrotizing fasciitis, West. J. Med. 144:78-80.
41. Joklik, W. K; H. P. Willett y D. B. Amos (1989) Vibrionaceae En: Zinsser. Microbiología ed. 18 Médica Panamericana Argentina. 47 pp.
42. Kaneko, T. y R. R. Colwell (1978) The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. Microb. Ecol. 4:135-155.
43. Kaneko, T y R. R. Colwell (1975) Adsorción of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. Appl. Environ. Microbiol. 29: 269- 274.
44. Kaper, J; H. Lockman; R. R. Colwell y S. W. Joseph (1979) Ecology, serology and enterotoxin production of *V. cholerae* in Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol. 37:92-102.
45. Koneman W. E; S. D. Allen; V. R. Dowell y Sommers (1991) Diagnóstico microbiológico ed. 3 Edt. Médica Panoamericana, México 455 pp.
46. Kreger, A y D. Lockood (1981) Detection of extracellular toxin(S) produced by *Vibrio vulnificus* Infect. Immun. 33:583-590.
47. Kumate J. (1972) La serología en el diagnóstico de la Fiebre Tifoidea y sus complicaciones en la edad pediátrica. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 34 pp.
48. Leal, H. P. y A. J. Del Torno (1983) Indicadores de contaminación bacteriológica y biológica: Muestreo, Presentación e interpretación de datos", en: Estudios de calidad del agua, Dirección General de Usos del Agua y Prevención de la Contaminación. Subdirección de Investigación y Entrenamiento. Subsecretaría de Planeación, SARH, México. 251-280 pp.
49. Ludwig A. J; J. F. Reynolds (1988) Statistical Ecology A Primer on Methods and Computing, John Wiley & Sons. USA. 337 pp.
50. Norma Oficial Mexicana (1996) Límites permisibles del agua para uso y consumo humano. NOM- 127-SSA1-1994.

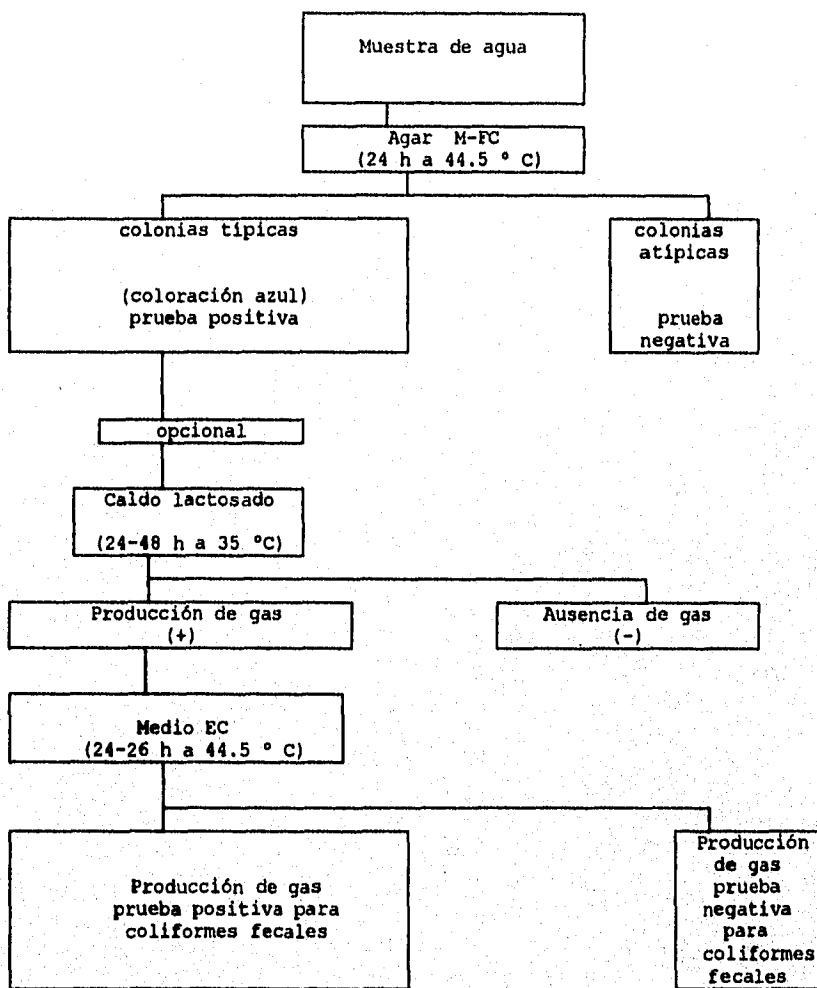
51. Marshall, K.C. (1976) Interfaces in microbial ecology. Cambridge Harvard University Press. 69 pp.
52. Matsuo T; S. Kohno T. Ikeda; K. Sarowato y H. Ninomiya (1978) Fulminating lactose-positive vibrio septicemia. Acta Pathol. Jpn. 28:937-978.
53. Marvin, L. S. (1984) Compendio de métodos para el análisis microbiológico en alimentos. USA 272 pp.
54. Mc Neely R. N; V. P. Neimanis y L. Dwyer (1979) Water Quality Sourcebook. A guide to water quality parameter, Environment Canada, Ottawa, Canada. 89 pp.
55. Mendieta, R y M. Blandino (1991) El cólera ataca de nuevo Información Científica y Tecnológica. 49 pp.
56. Mitchell R. (1992) Environmental Microbiology. Wiley-Liss. U. S. A. 411 pp.
57. Morris, J. G; Jr. Takeda; T. Tall; B. D. Losonsky (1990) Bhattacharya, S.K., Forrest non-o group, *Vibrio cholerae* gastroenteritis a human. J. Clin. Invest. 85:697.
58. Nalin, D.R. (1979) Cholera. copepods and chitinase. Lancet, 2:958.
59. Nalin, D. R; V. Daya; A. Reid; M. M. Levine y L. Cisneros (1979) Adsorción and growth of *V. Vibrio cholerae* on chitin. Infection Immunity 25:768-770.
60. Oliver, J.D (1981a) Lethal cold stress of *Vibrio vulnificus* in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 41:710-717.
61. Oliver, J.D (1981b) The pathogenicity and ecology of *Vibrio vulnificus*. Mar. Technol. Soc. J. 15:45-52.
62. Olivier y Stanislaw (1988) Improved Method for Determining Bacterial Filtration Rates in Zooplankton. Appl. Environ. Microbiol. 54:2149-2151.
63. Poole M. D. y J. D. Oliver (1978) Experimental pathogenicity and mortality in ligated ileal loop studies if the newly reported halophilic lactose-positive *Vibrio* spp. Infect. Immun. 20:126-129.
64. Rodier, J (1981) Análisis de aguas. Omega. Barcelona. 76 pp.
65. Sánchez S.P. (1991) Manual de métodos de aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en aguas, Instituto Mexicano de la Tecnología del Agua, Compañía de Tecnología de Saneamiento Ambiental, Organización Panamericana de la Salud, México. 33-47 pp.
66. Sandoval A. M. y G. Carlos (1992) Determinación de coliformes fecales, México, IMTA. 29 pp.
67. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (1981) Plan Nacional Hidráulico, anexo 4, Balance hidráulico regional, Comisión del Plan Hidráulico 4-13, 4-15 pp.
68. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (1982) Manual de muestreo de aguas y determinaciones en el campo, México, Dirección General de Usos del Agua y Prevención de la Contaminación, Subdirección de Investigación y Entrenamiento, 4 de., 75 pp.
69. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE) (1990) Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos de calidad del agua CECCA-001/89, Gaceta Ecológica, Vol. II, No. 6, México, 26-36 pp.
70. Secretaría de gobernación (1988) Los municipios de Morelos, Enciclopedia de los municipios de México, Gobierno del estado de Morelos, Centro Nacional de Estudios Municipales, Centro Estatal de Estudios Municipales, México, 137 pp. Secretaría de Recursos Hidráulicos (1970) Boletín hidrológico No. 47 Región hidrológica No. 18 (parcial). Cuenca del río amacuzac, México. Tomos I,II, 607 p.
71. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Fomento Sanitario. Laboratorio Nacional de Salud Pública (1992) Manual de Técnicas y procedimientos para la investigación de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos. México. 66 pp.
72. Shaffer, N; S. E. Silva; P. Anderson y J. J. Famer (1989) Rapid laboratory diagnosis of cholerae in the field. Trans. R. soc. Trop. Med. Hyg. 83:119-120.
73. Singleton, F. L; R. W. Attwell; M. S. Jangi y R. R. Colwell (1992) Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 43/5:1080-1085.

74. Sochard, M. R; D. F. Wilson; B. Austin. y R. R. Colwell (1979) Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. *Appl. Envir. Microbil.* 37: 750-759 .
75. Spira M. W; Anwarul, Qazi Shafi Ahmed y Yusuf A. Saeed (1981) Uptake of *Vibrio cholerae* biotype el tor from contaminated water by water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* ). *Appl. Environ. Microbiol.* 47:550-553.
76. Stainer, Y; Roger ; Michaez Doudoroff y E.A. Adelberg. (1981) *Microbiologia*. 2 ed. Aguilar. España.
77. Tacket D. C; F. Brenner y P. A. Blake (1987) Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J. Infect. Dis.* 149:558-561.
78. Tamplin G. E; Rodrick; N. J. Blake y T. Cuba (1982) Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida Estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1466-1470.
79. Valdespino, J. L; M. L. García; M. Hinojosa; E. Serti y J. Sepúlveda (1991) Epidemiología del cólera en America *Ciencia y desarrollo* 27:57-61.
80. World Health Organization (WHO) (1980) *Cholerae and other vibrio associated diarrheas* Bull. Scientific Working. 345 pp.
81. Global Environment Monitoring System (GEMS) (1987) World Health Organization and United Nations Environment Programme Global Pollution and Health Results of health-related environmental monitoring. 22



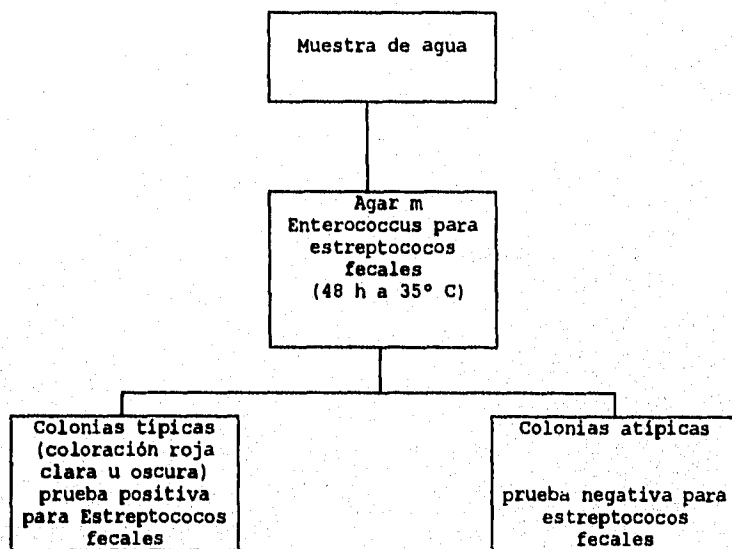
ANEXO I

Diagrama para el aislamiento de Coliformes fecales (APHA et al., 1989).



**ANEXO II**

**Diagrama para el aislamiento de Estreptococos Fecales  
(APHA et al., 1989).**



**Procedimiento para aislar coliformes fecales por la técnica de filtro de membrana.**

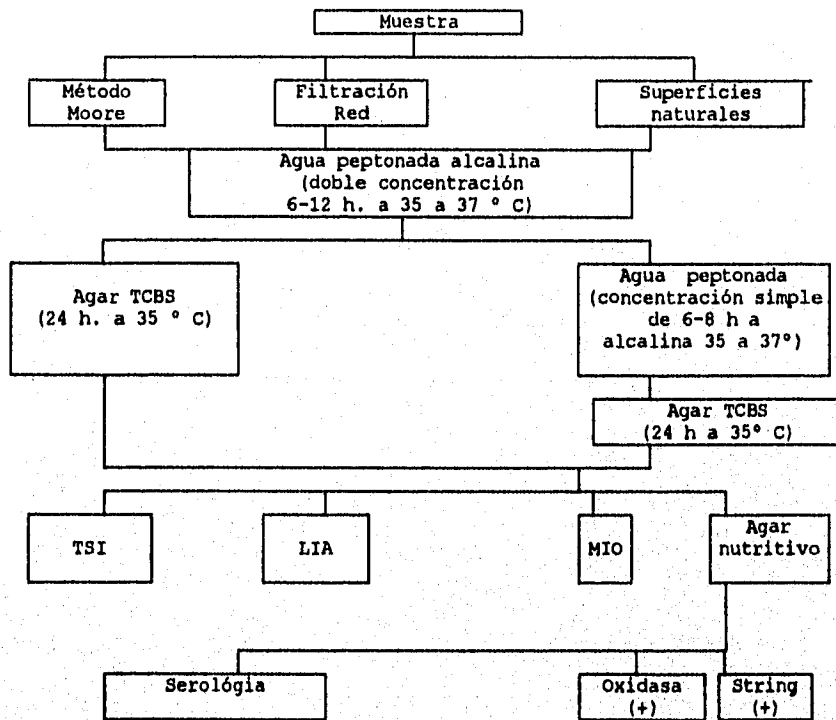
Se arma el equipo de filtración y se coloca una membrana filtrante estéril sobre el soporte poroso de la unidad de filtración tipo Millipore, utilizando para ello pinzas de punta roma estériles por flameo, colocar el embudo superior y asegurar con las pinzas en seguida añadir 10 ml de muestra y filtrar enjuagar con 20 ml de agua de dilución estéril. Desarmar el aparato de filtración y retirar la membrana para depositarla en una caja de Petri de cierre hermético que previamente contenía el medio M-FC e incubar a 44.5° C. La caja de invierte y se coloca dentro de una bolsa de plástico a prueba de agua y se sumerge en un baño de agua durante 24 horas.

Similar procedimiento se lleva a cabo para aislar estreptococos fecales solo que variando el medio, tiempo y temperatura en la incubadora.

La lectura de de coliformes fecales se realiza como la ayuda de un contador de colonias tipo Quebec; mientras el recuento de estreptococos fecales se utiliza una lámpara fluorescente y una lupa.

ANEXO III

Diagrama para la recuperación, aislamiento e identificación de *V. cholerae* O1 en muestras de agua (APHA et al., 1989).



#### Procedimiento para el aislamiento de *Vibrio cholerae*

Se abre cuidadosamente el saco plástico externo conteniendo la muestra. Con auxilio de una pipeta estéril unida a una perilla de goma, se perfora el saco interno, homogeneizando la muestra y se transfieren 10 ml a un erlenmeyer de 125 ml, que contiene 100 ml de agua peptonada alcalina (2 APA) de doble concentración para incubarse a 35-37 °C, durante 6 a 12 hrs. (primer enriquecimiento). Después del período de incubación, se retira cuidadosamente el matraz de la incubadora, evitando la agitación y con auxilio de un asa de inoculación debidamente flameada y enfriada, se toma el material sobrenadante del medio de enriquecimiento (APA), sembrando en dos placas de agar TCBS (Tiosulfato citrato bilis sacarosa), por muestra de cada método de concentración, y se incuban en posición invertida a 35° C durante 24 horas.

Paralelamente a la siembra de placa con auxilio de una pipeta estéril unida a una perilla de goma se transfieren 2 ml de muestra del primer enriquecimiento a dos tubos de ensayo previamente esterilizados y que contienen 10 ml de APA de simple concentración (segundo enriquecimiento), incubando a 35-37° C, durante 6 a 8 hrs. A partir del segundo enriquecimiento se inoculan dos placas de agar TCBS por tubo.

Con todos los cuidados de asepsia y utilizando un asa se selecciona del agar TCBS cinco colonias probables de ser *V. cholerae* por placa inoculando en tubos que contienen al medio selectivo TSI (AGAR - HIERRO TRES AZÚCARES) y en LIA (AGAR HIERRO-LISINA) por punción a profundidad y estría en la superficie inclinada, incubándose a 37° C por 24 horas; transcurrido el período de incubación se realiza la lectura.

La inoculación en tubos que contienen MIO (MOVILIDAD-INDOL-ORNITINA) se realiza por punción y se incuban a 37° C durante 24 horas.

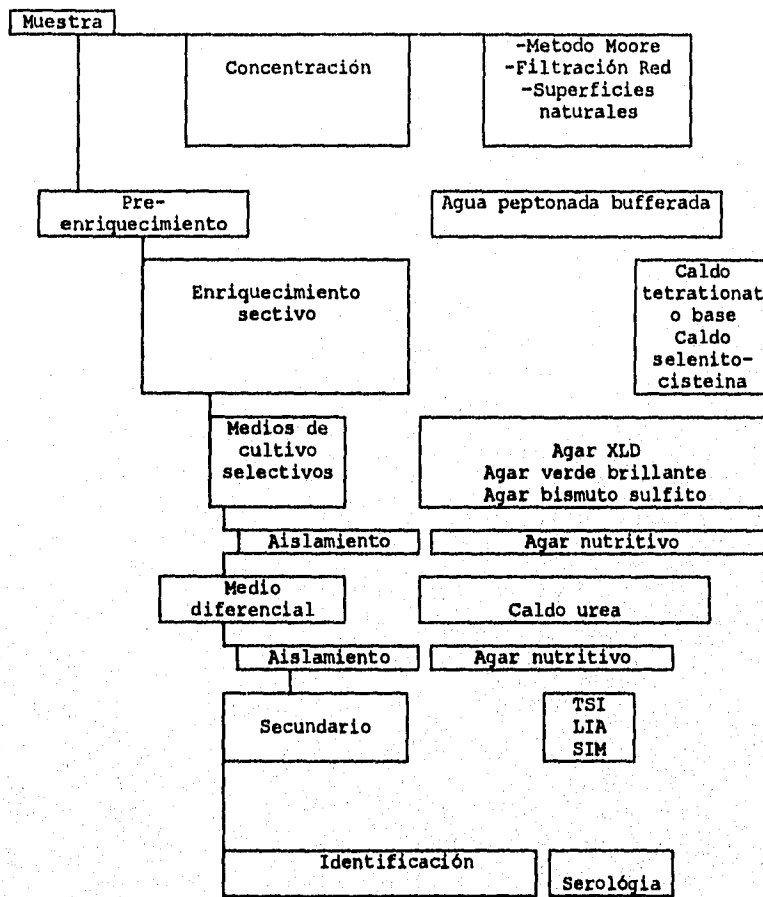
Las pruebas que resultan positivas de los medios TSI, LIA y MIO se transfieren a medio nutritivo que contenga 1 % de cloruro de sodio, inoculando por punción y estría, incubando a 37 ° C durante 24 horas. La prueba de oxidasa se realiza con un inóculo proveniente de agar nutritivo reciente, el cual se deposita sobre un pequeño trozo de papel filtro con ayuda de un palillo estéril, previamente se le adiciona dos gotas de reactivo de oxidasa (clorhidrato de N,N,N,N, tetrametil-p-fenilendiamina al 1%). Si la prueba resulta positiva se procede a efectuar la prueba de String, que consiste en colocar una gota de desoxicolato de sodio al 0.5 % sobre un portaobjetos y con ayuda de una asa se transfiere un pequeño inóculo, suspendiéndolo en la gota de reactivo con movimientos circulares para proceder a elevar el asa y observar si se forma el hilo mucoso. Aquellos cultivos que coincidan en un 100 % con las características bioquímicas efectuadas, se les realizara la serología utilizando el antisuero Poly-*Vibrio cholerae* O1. La prueba consiste en colocar en una lámina de vidrio una gota de suero fisiológico y agregar una pequeña porción del cultivo, mezclar. Luego incorporar una pequeña gota del antisuero Polivalente de *Vibrio cholerae* O1, mezclar ambas gotas hasta formar una suspensión uniforme. Hacer rotar la lámina y observar si aparece aglutinación antes de los 60 segundos.

Finalmente se verificó los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas con el sistema API 20E.

Los resultados obtenidos se reportaron como presencia ausencia de *V. cholerae* O1.

ANEXO IV

Recuperación aislamiento e identificación de *Salmonella spp*  
(APHA et al., 1989).



**Procedimiento para el aislamiento de *Salmonella* spp.**

Se abre cuidadosamente el saco plástico externo que contiene la muestra. Con auxilio de una pipeta estéril unida a una perilla de goma, se perfora el saco plástico interno y se homogeneizando la muestra, se transfieren 20 mL de muestra a un matraz erlenmeyer de 125 mL que contiene 100 mL de agua peptonada bufferada para incubar a 35-37 ° C durante 18 a 24 horas (pre-enriquecimiento). Lo anterior se realiza para los diferentes métodos de concentración de cada estación. Después del período de incubación se enriquece cada muestra de 20 mL con 100 mL de caldo tetrionato base y caldo selenito-cisteína. El primero se incuba a 35° C y el segundo a 43° C durante 18-24 horas.

Una vez concluido el período de incubación se siembra en medios selectivos: XLD, VB y sulfito bismuto, siendo una placa de cada medio, para cada uno de los medios de enriquecimiento e incubar a 35-37° C durante 24 horas. Una vez que se retiran los inoculos para la siembra en placas; nuevamente se incuban los medios de enriquecimiento durante 18-24 horas a su respectiva temperatura. Concluida su incubación se procede nuevamente a la siembra en placas con medios selectivos XLD, verde brillante y sulfito bismuto. Una vez retirados los inóculos descartar el caldo de enriquecimiento de tetrionato y continuar incubando las muestras de caldos selenito-cisteína durante tres días más (hasta completar cinco días de incubación).

Se selecciona cinco colonias típicas de *Salmonella* de cada placa y se aíslan en agar nutritivo inóculando con la ayuda de una asa flameada por punción y estria, manteniéndolas a 35-37° C, durante 24 horas. Todas las muestras aisladas en agar nutritivo se les realiza la prueba de Urea. Aquellos aislamientos que den reacciones positivas para *Salmonella* se aíslan nuevamente en agar nutritivo. El siguiente paso es efectuar la inóculación por punción y estria en los medios de TSI, LIA incubando 24 horas a 35-37° C. La inóculación en tubos que contienen SIM (movilidad-indol-sulfuro), se realiza por picadura incubandose 18-24 horas a 35-37° C.

Aquellos cultivos que coincidan en un 100% con las características bioquímica efectuadas se les realizara la serología utilizando el anti-*Salmonella* polivalente somático y anti-*Salmonella* polivalente flagelar.



ANEXO V

MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y SOLUCIONES

-Tiosulfato de sodio

Tiosulfato de sodio anhidro	18.0 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación:

Pesar 18 g de tiosulfato de sodio y disolver en 1000 mL de agua destilada. Guardar en frasco con tapón de rosca y esterilizar a 121°C. durante 15 min.

-Solución de EDTA al 15%

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	150.0 g
agua destilada	1000 mL

Preparación:

Pesar 150 g de EDTA y disolver en 1000 mL de agua destilada.

Ajustar el pH a 6.5. Esterilizar a 121° C durante 15 min. y guardar en frasco con tapón de rosca.

-Solución de hidróxido de sodio (2N)

Hidróxido de sodio	0.8 g
Agua destilada	100 mL

preparación:

Pesar 0.8 g de hidróxido de sodio y adicionar 100 mL de agua destilada, agitar hasta la completa disolución del reactivo.

-Agar M-FC

Triptosa	10.0 g
Polipeptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	12.5 g
sales biliares	1.5 g
Azul de anilina	0.1 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 7.4

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Preparación:**

Pesar 52.0 g de medio deshidratado MFC y adicionar 1000 mL de agua destilada fría, agregar 10 mL de solución de ác. rósolico al 1 %, dejando reposar durante 15 min. llevar a baño María, agitando frecuentemente hasta la completa disolución del agar, teniendo cuidado de no alcanzar la temperatura de ebullición. Enfriar el medio a 45 - 50° C, con todos los cuidados de asepsia, distribuir volúmenes de 4 mL en placas Petri de 48X8.5 mm previamente estériles. El medio preparado debe ser protegido de la luz y mantenerse a 2° C, durante dos semanas. Después de éste periodo debe ser descartado.

Nota El medio no debe ser esterilizado en autoclave.

**-Ác. rosólico**

Ac. rosólico	1.0 g
Hidróxido de sodio (2N)	100 mL

**Preparación:**

Pesar 1.0 g de ác. rosólico y adicionar 100 mL de solución de hidróxido de sodio 2 N, agitar hasta completa disolución ( no debe esterilizado en autoclave).

**-Caldo lactosado**

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	5.0 g
Lactosa	5.0 g
agua destilada	1000 ml

pH final después de la esterilización 6.9

**Preparación:**

Pesar 13 g de caldo lactosado y adicionar 1000 ml de agua destilada fría. Calentar, agitando frecuentemente hasta su completa disolución, teniendo cuidado de no alcanzar el punto de ebullición. En tubos de ensayo de 18 mm X 180 mm, que contengan en su interior tubo Durham invertido, distribuir 10 ml. Tapar los tubos y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

**-Medio E.C.**

Triptosa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Fosfato dipotasico	4.0 g
Fosfato monopotasio	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada	1000 ml

pH final después de la esterilización 6.9

**Preparación:**

Pesar 37 g de medio deshidratado E.C. y adicionar 1000 ml de agua destilada. Calentar, agitar frecuentemente hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la ebullición. En tubos de ensayo de 12 mm X 120 mm, conteniendo en su interior tubo Durham invertido adicionar 5 ml. Tapar y esterilizar en autoclave a 121° C, durante 15 minutos.

**-Agar m enterococcus para streptococos fecales**

Triptosa	20.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Glucosa	2.0 g
Fosfato dipotasico	4.0 g
Azida de sodio	0.4 g
Cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio	0.1 g
Agar	10.0 g
Agua destilada	1000 mL

**Preparación:**

caliéntese hasta que se disuelvan los ingredientes. No se pasa por autoclave. dividase en porciones de 4 mL por placa Petri de 48X8.5 mm y déjese solidificar preparándose medio fresco para cada lote de muestras.

**-Medio de transporte Cary-Blair**

Tioglicolato de sodio	1.5 g
Fosfato disodico	1.1 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar bacteriológico	5.0 g
Cloruro de calcio al 1 %	9.0 mL
Agua destilada	991.0 mL

pH final después de la esterilización: 8.4

**Preparación:**

Pesar 12.6 g de medio deshidratado ó Cary and Blair Transport Medium y agregar 991 mL de agua destilada fría dejándolo en reposo durante 15 min. Calentar, agitando frecuentemente hasta disolverlo completamente y sin llegar a la temperatura de ebullición. Estabilizar en baño María a 50° C. agregar asépticamente 9 mL de una solución de cloruro de calcio al 1 % (estéril). Homogeneizar y esterilizar el medio en flujo de vapor durante 15 min. o en baño María, dejado el recipiente medio abierto, cerrando inmediatamente después de esterilizado. Distribuir asépticamente 300 mL en bolsas plásticas de 5 litros. Sellar y almacenar en la oscuridad a una temperatura de 2 a 8 ° C.

-Agua peptonada alcalina (APA)

a) Concentración simple:

Peptona	10 0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 9.0

Preparación:

Pesar la peptona y el cloruro de sodio y agregar 1000 mL de agua destilada dejándolos en reposo aproximadamente 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta que el medio se disuelva completamente, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo de (16X150 mm). Taponar y esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 min.

b) Concentración doble:

Peptona	20 g
Cloruro de sodio	20 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 9.0

Preparación:

Pesar la peptona, el cloruro de sodio y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejado en reposo aproximadamente 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta que el medio se disuelva completamente, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Ajustar el pH con hidróxido de sodio 1 N y distribuir volúmenes de 10 mL en tubos de ensayo de (16X150 mm), con tapón de rosca evitar que el pH descienda después de la esterilización a 121° C durante 15 min. guardar en refrigeración hasta el momento de usarlos.

-Agar tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa ( TCBS)

Extrato de levadura	5.0 g
Peptona proteasa ( o peptona)	10.0 g
Citrato de sodio	10.0 g
Tiosulfato de sodio	10.0 g
Bilis de buey deshidratada	8.0 g
Sacarosa	20.0 g
Cloruro de sodio	10.0 g
Citrato férrico	1.0 g
Azul de bromotimol	0.04g
Azul de timol	0.04 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 8.6

**Preparación:**

Pesar 89.0 g de medio deshidratado ó TCBS ó y agregar 1000 mL de agua destilada fría, dejando en reposo durante 15 min. Calentar, agitando hasta su completa disolución, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir 15 mL en cajas Petri de 15X100 mm, previamente esterilizadas. Las placas con agar deben mantener refrigeradas a 2 a 8 ° C. Este medio no debe ser esterilizado en autoclave.

**-Agar hierro-tres azúcares (TSI)**

Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Bacto peptona	15.0 g
Proteosa peptona	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Sulfato ferroso	0.2 g
Cloruro sódico	5.0 g
Tiosulfato sódico	0.3 g
Bacto agar	12.0 g
Rojo de fenol	0.024 g
Agua destilada	1000 mL

**Preparación:**

Disolver 65 gramos de los componentes indicados en un litro de agua destilada o desmineralizada y dejar remojar durante 15 min. A continuación, se hierve a vapor fluente hasta alcanzar su disolución completa. Después de su distribución en tubos de 120 mm/12 mm, a razón de 3-4 ml, se efectúa la esterilización en autoclave (15 min. a 121° C). Luego de la esterilización, los tubos se colocan en posición inclinada hasta la solidificación del medio de cultivo. El pH listo para el uso es de 7.3. El cultivo puro del germen se siembra en la superficie inclinada por frotis, y por picadura en la parte columnar. Se incuba a 37° C por 24 h.

**-Agar hierro-lisina (LIA)**

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Dextrosa	1.0 g
L-lisina	10.0 g
Citrato férrico de amonio	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	13.5 g
Agua destilada	1000 mL

**Preparación:**

Disolver 33 gramos de los componentes indicados en un litro de agua destilada. Calentar con agitación frecuente hasta su ebullición. A continuación se distribuye en tubos de 120 mm/12 mm con tapa de rosca, a razón de 3-4 ml. La esterilización se efectúa en autoclave ( 15 min. a 121° C). Luego de la esterilización, los tubos se colocan en posición inclinada hasta la solidificación del medio cultivo. El valor de pH listo para su uso es de 6.7. El cultivo puro del germen se siembra en la superficie inclinada, por frotis y por picadura en la parte columnar. Se incuba a 37° C por 24 h.

**-Medio MIO ( movilidad-indol-ornitina )**

Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	10.0 g
Triptona	10.0 g
L-ornitina hidrocloreto	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	2.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1000 mL
pH final 6.5 a 25° C	

**Preparación:**

Disolver 31 gramos por litro de agua destilada, calentar a ebullición hasta la disolución completa. Distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13X100. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos, enfriar y dejarlos en reposo en posición vertical.

**-Reactivo de Kovacs**

p-dimetilaminobenzaldehído	10.0 g
alcohol amílico o isoamílico	150.0 mL
HCl concentrado	50.0 mL

**Preparación:**

Disolver 10 g del paradimetilaminobenzaldehído en 150 ml de alcohol isoamílico y adicionar 50 ml de ácido clorhídrico. El reactivo debe ser amarillo.

**-Agar nutriente modificado (AGAR Manutención)**

Extracto de carne	4.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7.4 25° C.	

**Preparación:**

Pesar 20 g de medio deshidratado y adicionar 1000 mL de agua destilada fría. Calentar, agitando continuamente hasta su completa disolución, teniendo cuidado de no alcanzar la temperatura de ebullición. Se esteriliza en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos.

**-Caldo Tetrionato base**

Extracto de levadura	5.0 g
Peptona	10.0 g
cloruro de sodio	3.0 g
Carbonato de calcio	45.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.2 a 25° C	

**Preparación:**

Pesar 46 g de medio deshidratado y adicionar 1000 mL de agua destilada calentando y agitando frecuentemente hasta su completa disolución, evitar alcanzar la temperatura de ebullición. Después de enfriar a menos de 45° C añadir 20 mL de solución yodo-potásio yoduro.

**-Solución yodo-potásio yoduro**

Yodo	6.0 g
Yoduro de potásio	5.0 g
Agua destilada	20 mL

**-Caldo selenito - cisteína**

Selenito de sodio	4.0 g
Peptona	5.0 g
Lactosa	4.0 g
Fosfato disódico	9.5 g
Fosfato monosódico	0.5 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7.0	

**Preparación:**

Calientese el agua destilada a 80 °C. Disuélvase los ingredientes en el orden indicado. Distribuyendo en cantidades de 100 mL en un matraz erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizado. Almacenar a 2 °C, durante un período máximo de una semana.

**Nota.** El medio final es de color amarillo pálido que puede contener un ligero precipitado rojo.

**-Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)**

Extracto de levadura	3.0 g
L-lisina	5.0 g
Xilosa	3.75 g
Lactosa	7.5 g
Sacarosa	7.5 g
Desoxicolato de sodio	2.5 g
Citrato férrico amoniacal	0.8 g
Tiosulfato de sodio	6.8 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo de fenol	0.08 g
agar	15.0 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.4 a 25° C	

**Preparación:**

Pesar 57 g de medio deshidratado XLD adicionar 1000 mL de agua destilada dejando en reposo 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta su completa disolución, evitar la ebullición. Esterilizar el medio en baño María a 55-60° C y distribuir en cajas Petri previamente esterilizadas.

**-Agar verde brillante**

Extracto de levadura	3.0 g
Polipeptona	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Agar	20.0 g
Sacarosa	10.0 g
Rojo de fenol (0.2 %)	40.0 mL
Verde brillante (0.5 %)	2.5 mL
Agua destilada	960.0 mL
pH final: 6.9	

**Preparación:**

Añadense todos los ingredientes al agua y caliéntense hasta la ebullición agitando la mezcla frecuentemente para obtener una solución completa. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 12 min. Enfríese a 50 - 60° C y viértase en cajas Petri previamente estériles. (Con el caliente adicional del medio disminuye la selectividad mientras que al reducirlo aumenta).



**-Agar sulfito - bismuto**

Extracto de carne	5.0 g
Peptona	10.0 g
glucosa	5.0 g
Fosfato de monohidrógeno de sodio	4.0 g
Sulfato ferroso	0.3 g
Indicador de sulfitobismuto	8.0 g
Agar	20.0 g
Verde brillante (5 %)	5.0 mL
Agua destilada	1000 mL

**Preparación:**

Añádanse los ingredientes al agua, mézclense bien y caliéntese hasta la ebullición agitándolo con frecuencia. Se forma un precipitado que no desaparecerá. Enfríese a 40 - 50° C y viértase en cantidades de 15 a 20 mL en placas Petri. No se debe esterilizar en autoclave. Transcurridas 48 hrs. después de la preparación, la selectividad del medio disminuye.