

## Calidad microbiológica de aguas costeras en climas tropicales. Microbiological quality of coastal waters in tropical climates.

María Isabel González González\*

Teresa Torres Rojas\*\*

Sergio Chiroles Rubalcaba\*\*\*

\*Dr. C. en Ciencias de la Salud, Investigador Auxiliar, Profesor Instructor

\*\*Dr.C. en Ciencias Tecnológicas, Investigador Auxiliar

\*\*\*Lic. en Microbiología, Aspirante a Investigador

Laboratorio de Microbiología de Aguas, Vicedirección Salud Ambiental

Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología

Infanta 1158 e/ Clavel y Llinás, Centro Habana,

CIP 10 300, Cuba.

Tel. (53-7) 870-5531-34 Ext.254, Fax. (53-7) 66-2404

E-Mail: [isa@inhem.sld.cu](mailto:isa@inhem.sld.cu); [mariaisa@infomed.sld.cu](mailto:mariaisa@infomed.sld.cu)

### Resumen

Se llevó a cabo una actualización en las normativas de las aguas costeras con fines recreativos con la problemática actual con relación a las aguas en climas tropicales. Se establece una discusión de los indicadores microbiológicos utilizados en estas aguas y de las enfermedades transmitidas más frecuentemente asociadas, además de destacar las diferencias de ecosistemas acuáticos y el comportamiento de algunos microorganismos en climas tropicales.

### Abstract

It was carried out an actualization of coastal water standards with recreational uses and actual problems with relation of water in tropical climates. It was discussed about microbiological indicators used in these water and water borne diseases most frequently associated and the difference between of water ecosystems and behavior of some microorganisms in tropical climates.

**Palabras Clave:** AGUAS COSTERAS; CLIMAS TROPICALES; ECOSISTEMAS MARINOS; MICROORGANISMOS

La calidad del agua está estrechamente unida a la calidad de vida. La exposición a agentes infecciosos y compuestos químicos tóxicos puede ocurrir por medio de la ingestión directa de agua, mariscos (principalmente bivalvos) y otros alimentos cosechados en aguas contaminadas o irrigados, lavados o preparados con ellas y además, por el contacto con aguas contaminadas al bañarse o actividades recreativas (nado, buceo, etc.) y una higiene deficiente asociada al déficit del agua.

Un aspecto fundamental es la evaluación de los requisitos necesarios asociados con la calidad microbiológica del agua. Por lo general, ella se mide por medio de los indicadores bacterianos de contaminación fecal como los coliformes y se relacionan con la posible presencia de microorganismos patógenos que pueden causar enfermedades por transmisión hídrica. Sin embargo, cada día se hace más notable que dicha relación muchas veces no se cumple, especialmente en países de clima tropical, donde se hace necesaria la implementación de técnicas apropiadas para el control de la contaminación.

Uno de los problemas sanitarios más críticos en los países de América Latina y el Caribe, es la descarga incontrolada de aguas residuales domésticas sin tratamiento, las cuales contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras. La inadecuada disposición de excretas y la ausencia o el deficiente sistema de alcantarillado y tratamiento, están asociados a la contaminación del agua causando

numerosas enfermedades, tales como el cólera, la amebiasis, la hepatitis, la fiebre tifoidea y paratifoidea, entre otras. La epidemia del cólera y los brotes causados por microorganismos patógenos como *Cryptosporidium*, cuya vía de transmisión fundamentalmente es el agua, han originado una alerta en diferentes países para tratar de prevenir estos eventos que han provocado una alta morbilidad y mortalidad en la población mundial.

### Principales microorganismos patógenos transmitidos por las aguas costeras.

El hombre puede estar expuesto al riesgo de contaminación por microorganismos transmitidos por el agua principalmente con aquellas utilizadas para consumo humano, las de fines recreativos y las aguas residuales que se utilicen para la agricultura o acuicultura. Estas aguas deben tener un tratamiento adecuado y mantenerse una vigilancia constante a través de las normas de cada país (Havelaar et al., 2001). Sin embargo, los países en vías de desarrollo tienden a adoptar los lineamientos y normativas de la calidad de agua de los países desarrollados, aunque los riesgos, hábitos en la población y condiciones climáticas son diferentes.

Las aguas costeras con fines recreativos como las playas, por lo general se encuentran en las proximidades de áreas urbanas donde los vertimientos sin depurar, con altos contenidos de microorganismos patógenos y otros agentes contaminantes, representan uno de los principales problemas sanitarios y ecológicos de las zonas costeras (Borrego y Mariño, 1995). El agua residual se vierte en muchas ocasiones directamente a la línea de costa o a través de emisarios submarinos, lo que puede afectar algunas zonas de importancia turística o pesquera. El riesgo se incrementa si existe una mayor época de baño como en Cuba u otros países tropicales, donde gran parte de la población local y turística disfrutan más tiempo de las actividades recreativas tales como, natación, surfing, canotaje y se exponen más a estas aguas costeras.

Entre los microorganismos que afectan la calidad de las aguas costeras se encuentran bacterias, virus y parásitos de origen alóctono, fundamentalmente procedentes de las aguas servidas y especies de *Vibrio* y *Aeromonas*, bacterias naturales del medio marino, que pueden estar asociadas con infecciones en el hombre tales como, gastroenteritis, infecciones en heridas y otitis (**Tabla 1**)

La base ambiental de la transmisión de dichos microorganismos patógenos depende de la concentración de patógenos excretados, con las siguientes propiedades relacionadas con la supervivencia ambiental de importancia notable: latencia, persistencia y multiplicación de dichos patógenos, y ellas están relacionadas con la dosis infectiva (Havelaar et al., 2001; Roszak y Colwell, 1987).

Esta transmisión de microorganismos patógenos está estrechamente asociada a la alteración, a menudo dramática e irreversible de los ecosistemas costeros naturales. La contaminación del mar y de las aguas interiores se debe fundamentalmente, al rápido crecimiento de la población costera, a la expansión de las áreas recreativas, a prácticas inadecuadas de agrosilvicultura y a la concentración del desarrollo industrial en las zonas costeras (UNEP, 1993). En la región del Gran Caribe, que incluye a Cuba, la degradación física y ecológica de las áreas terrestres costeras y el aumento de la contaminación de las aguas interiores y cercanas a las costas, a partir de fuentes terrestres, se ha incrementado de forma alarmante.

El tratamiento debe estar dirigido a la reducción de la contaminación de la fuente, en los casos donde sea posible, mediante la instalación de plantas de tratamiento de aguas residuales y la construcción de emisarios para llevar los efluentes a mar

adentro, además de la vigilancia de la calidad del agua en zonas recreativas con el cumplimiento de criterios y normativas basados en estudios epidemiológicos llevados a cabo en países de climas tropicales.

### **Criterios de calidad microbiológica de aguas costeras.**

#### **Organismos indicadores.**

La calidad microbiológica del agua se mide por organismos indicadores cuyas densidades o concentraciones en el agua pueden ser cualitativamente relacionadas con el riesgo a la salud que implica el uso de ésta. El criterio de la calidad del agua se considera como la relación cuantificable de exposición-efecto basada en evidencias científicas entre el nivel de un indicador de calidad del agua y los riesgos potenciales para la salud asociados con su uso (Ashbolt et al., 2001, Salas, 1997).

Los atributos fundamentales que deben tener los organismos indicadores en el agua por lo general son los siguientes (Ashbolt et al., 2001; Figueras et al., 1994):

- 1) Deben medirse fácilmente, ser inequívocos y consistentes.
- 2) Deben estar presentes en mayor número que los microorganismos patógenos.
- 3) Deben tener mayor y más predecible tiempo de supervivencia que los patógenos.
- 4) Deben ser inocuos.
- 5) No deben multiplicarse en el medio ambiente.
- 6) Deben ser más resistentes a procesos de tratamiento que los microorganismos patógenos.
- 7) Deben incrementar su número al aumentar el grado de contaminación.
- 8) Su concentración en el agua debe tener una relación cuantitativa con los riesgos para la salud.
- 9) Deben ser aplicables para cualquier tipo de agua.

Muchas veces, estos atributos de indicador "ideal", no se cumplen en su totalidad, sobre todo en aguas tropicales. A través de los años, los indicadores de contaminación convencionales propuestos para la evaluación sanitaria en aguas recreativas han sido los coliformes totales y fecales, estreptococos fecales/enterococos, algunas bacterias patógenas (Salmonella, Pseudomonas aeruginosa), Candida albicans, enterovirus y bacteriófagos (APHA, 1992), que no cumplen con todas las características anteriormente señaladas.

Existen discrepancias en las recomendaciones con relación a los indicadores más confiables a utilizar para las aguas costeras. Diversos estudios epidemiológicos llevados a cabo en su mayoría en aguas recreativas de climas templados han recomendado a los estreptococos fecales/enterococos para la evaluación sanitaria de estas aguas, demostrándose una correlación mejor entre los niveles de enterococos en el agua con la incidencia de enfermedades gastrointestinales en los bañistas (Bandarana-yake et al., 1995; Kay et al., 1994).

En una revisión más reciente de estudios epidemiológicos sobre el efecto a la salud y la exposición a aguas recreativas, se demostró también el incremento del riesgo relativo en nadadores con relación al incremento de los conteos de los indicadores (Pruss, 1998). Además, el grupo estreptococos fecales/enterococos obtuvo mejor correlación para aguas marinas y superficiales interiores.

Las recomendaciones propuestas por diferentes organizaciones (CEE, 1994; USEPA, 1986, WHO, 2000) consideran en la actualidad este grupo entre sus criterios microbiológicos. Por ejemplo, la USEPA (1986), basados en los estudios de Cabelli et

al. (1983) sugiere que en aguas marinas los enterococos no se deben exceder de 35/100ml, calculados estos valores como la media geométrica de un número de muestras representativas, por lo general no menos de cinco muestras tomadas a iguales períodos de tiempo con un nivel de riesgo aproximado de ocho y 19 enfermedades gastrointestinales en 1000 bañistas. Sin embargo, pocos países en la actualidad utilizan este grupo en el monitoreo de la calidad microbiológica de las aguas recreativas.

Estos estudios epidemiológicos son difíciles de llevar a cabo, no sólo por las condiciones del laboratorio sino también por la dificultad de evaluar todos los factores posibles que podrían afectar a la población en estudio. Además, en su mayoría, se han desarrollado en aguas de climas templados y son muy escasos los efectuados en climas tropicales, que presentan diferentes características en sus ecosistemas acuáticos.

A ello se le puede agregar que en determinadas situaciones, la ausencia de coliformes fecales no infiere la de ausencia de patógenos bacterianos de riesgo para la salud. Por ejemplo, los estudios de Koh et al. (1994) determinaron las relaciones de los indicadores bacterianos (coliformes totales y fecales, *E. coli*, enterococos) y las concentraciones de *Vibrio* sp. (NMP/100ml) con los efectos del día, la profundidad y los niveles de las mareas en dos estaciones de la bahía de Apachicola, Florida, Estados Unidos. En el estudio, también se demostró que no existía correlación entre ninguno de los indicadores bacterianos analizados; sin embargo sí hubo diferencias entre las concentraciones de vibrios detectadas en muestras tomadas en diferentes días, a diferentes profundidades y con distintos niveles de las mareas, lo que indicaba que estos factores debían ser bien analizados en estudios futuros del género.

En otras investigaciones tales como las desarrolladas por Borrego y Mariño (1995) en aguas costeras de Málaga, España, se relacionaron la concentración de algunos microorganismos patógenos en zonas de baño con la ocurrencia de efectos adversos a la salud entre bañistas y no bañistas. Las infecciones en la piel reportadas se asociaron con los niveles de algunos patógenos detectados tales como, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Aeromonas hydrophila*, los que se habían asociados con los indicadores de contaminación fecal.

Por otra parte se debe destacar el buceo, considerado como una actividad recreativa e investigativa de considerable importancia en diferentes países, el cual hace algún tiempo no se consideraba que los que la practicaban pudieran tener riesgo alguno de contraer una infección. Sin embargo, en una investigación llevada a cabo en tres países (Estados Unidos, Ucrania y Rusia), con buceadores profesionales saludables y muestras de agua colectadas en los sitios de buceo, se detectó la presencia de *Vibrio cholerae* O1, toxigénico (Huq et al., 1994), lo que justificaba el mayor riesgo de adquirir infecciones transmitidas por el agua con este patógeno, particularmente si el buceo se realizaba en aguas con inadecuada calidad microbiológica.

Los sistemas eutróficos como las bahías cerradas y los estuarios con numerosos aportes orgánicos, pueden servir como reservorios naturales de microorganismos autóctonos y alóctonos, pudiendo estar la supervivencia de ellos muy condicionada a los organismos que forman la flora y la fauna de estos ecosistemas, por ejemplo las algas, el plancton, los peces, moluscos y crustáceos, etc. En algunas investigaciones realizadas en estos ecosistemas, se han reportado infecciones asociadas con el consumo de mariscos crudos o mal cocidos cultivados en estuarios (Hlady y Klontz, 1996) y en algunos estudios, tales como los llevados a cabo por Barbieri et al. (1999) en la costa del Adriático italiano, se demostró que la mayoría de las cepas aisladas de diferentes especies de diferentes especies de *Vibrio*, eran capaces de producir

toxinas, lo que indicaba su importancia como patógenos potenciales, por lo que se propuso un programa de monitoreo continuo y el estudio de la contaminación de esta zona como una medida urgente y necesaria para la protección a la salud humana.

La importancia epidemiológica de estas áreas es notable, debido al riesgo para la salud que pueden presentar, si no se mantiene el tratamiento adecuado de los efluentes de aguas residuales que llegan al estuario, asociado con el consumo de alimentos marinos crudos o mal cocidos. Por otro lado, si se considera que las normativas para el consumo de mariscos en estas zonas, se basan solamente en la determinación de cero coliformes fecales en las aguas de cultivo de mariscos, y no la detección de especies del género en determinadas ocasiones, esto es más alarmante, sobretodo cuando se han señalado estudios donde la relación de estos indicadores y algunos microorganismos patógenos no se cumple, en especial en aguas tropicales.

### **Organismos indicadores.**

La calidad de las aguas en áreas tropicales difiere de las de países templados en tres características fundamentales: física y química, biológica y social-económica (Hazen y Toranzos, 1990).

Por ejemplo, la temperatura del agua en áreas tropicales es mayor, raramente desciende por debajo de 15°C, puede llegar a ser mayor de 35°C en algunas partes y la variación anual de la intensidad de la luz es menor en los trópicos. Ambos factores (temperatura alta y constante y la intensidad de la luz con poca variación), provocan un estado hipereutrófico en todo el año en presencia de nutrientes. En áreas templadas, la luz es a menudo un factor limitante para los organismos fotosintéticos en el invierno y por ende, se disminuye la productividad del ecosistema.

La lluvia en países tropicales húmedos como el nuestro, es en algunos casos peligrosa, debido a que en ocasiones algunas cuencas reciben más de 500 mm. de agua en 24 horas. Esta intensidad de lluvia hace que fluyan los microorganismos, los nutrientes del suelo y la vegetación a la cuenca, causando cambios extremos con la incorporación de ellos, lo que provoca un incremento en las densidades de bacterias indicadoras de contaminación fecal y microorganismos patógenos.

Además, por lo general, estos países presentan condiciones socio económicas diferentes, algunos con pobreza, mayor incidencia de enfermedades, malnutrición, problemas de saneamiento básico y suministro de agua para beber sin el tratamiento adecuado, lo que contribuye al aumento de los microorganismos patógenos en las aguas y su transmisión a través de ellas.

La diversidad microbiana de las aguas tropicales es mayor que en países templados, así como la flora y la fauna. No sólo existe un mayor porcentaje de microorganismos autóctonos sino también una gran variedad de microorganismos alóctonos y nutrientes, por lo que la supervivencia y diversidad de los microorganismos son muy diferentes.

Por ejemplo, se ha demostrado la capacidad de supervivencia de algunas bacterias en agua de mar, en su forma viable y no cultivable y que los procesos de osmoregulación eran bastante efectivos para mantener la concentración iónica, el pH y los niveles de metabolitos del citoplasma dentro de los límites requeridos.

Lo anteriormente planteado, reafirma la importancia de la búsqueda de determinados patógenos y considerar su supervivencia en estas aguas y su correlación con indicadores bacterianos. Si se considera que el grupo coliforme y en particular *Escherichia coli*, son los indicadores de contaminación más utilizados en las

normativas de las aguas recreativas, sería interesante señalar que existen investigaciones donde la correlación de éstos microorganismos autóctonos como *Vibrio cholerae*, no se cumple, en especial en aguas tropicales costeras. En un interesante estudio llevado a cabo "in situ" en un arrecife coralino de aguas tropicales de Puerto Rico, se demostró que *V. cholerae* podía sobrevivir y constituir una fuente de contaminación para los peces y mariscos de esta zona (Pérez-Rosas y Hazen, 1988).

En Cuba, se han llevado a cabo diferentes estudios en aguas recreativas donde se observaron correlaciones directas entre los indicadores bacterianos analizados (coliformes totales y fecales y estreptococos fecales) y *Salmonella*, sin embargo no se encontraron resultados similares con otras bacterias patógenas de los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* (González et al., 1996).

Por otra parte, se ha planteado que en países de climas tropicales, las bacterias indicadoras como *Escherichia coli*, pueden crecer y multiplicarse en ausencia de contaminación fecal, por lo que su utilidad es limitada y también pueden adoptar un estado viable y no cultivable, que no se detecta por los métodos convencionales recomendados en el monitoreo. Además, la presencia de *E. coli* no se debe relacionar con bacterias patógenas de fuentes ambientales tales como, *Legionella* y especies de *Vibrio* y *Aeromonas*, ni tampoco con protozoarios o virus.

Todo lo anteriormente planteado, justifica más la necesidad futura de estudios integrales en climas tropicales como el de Cuba que permitan perfeccionar la vigilancia ambiental en aguas costeras con relación a su calidad sanitaria para fines recreativos, con el apoyo de los organismos y organizaciones que pueden apoyar y ayudar a que se cumplan las medidas y recomendaciones propuestas para mejorar la calidad microbiológica del agua y por ende, la calidad de vida.

**Tabla1. Principales microorganismos patógenos transmitidos por aguas recreativas.**

ORGANISMO	INFECCIÓN
<b>BACTERIA</b>	
<b>A) Contacto con el agua</b>	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Infección en heridas
<i>Citrobacter sp.</i>	Infección en heridas
<i>Leptospira icterohemorrhagia</i>	Leptospirosis
<i>Mycobacterium marinum</i>	Otitis externa
<i>M. balnei</i>	Otitis externa
<i>Pseudomonas sp.</i>	Otitis externa
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infección en heridas
<i>Vibrio sp.</i>	Otitis externa
<b>B) Transmitidas por el agua (por ingestión)</b>	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenteritis
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea
<i>Salmonella sp.</i>	Gastroenteritis
<i>Shigella dysenteriae</i>	Disentería bacilar
<i>Shigella sp.</i>	Gastroenteritis

Vibrio cholerae Cólera	Gastroenteritis
Vibrio sp.	Gastroenteritis

## VIRUS

### A) Contacto con el agua

Adenovirus	Faringitis, infección ocular
------------	------------------------------

### B) Transmitidas por el agua (por ingestión)

Adenovirus	Enteritis
Coxsackievirus y echovirus	Meningitis, miocarditis
Hepatitis A y virus E	Hepatitis
Norwalk virus	Enteritis
Poliovirus	Poliomielitis
Rotavirus	Enteritis
Calicivirus y astrovirus	Enteritis

## PROTOZOO

### A) Contacto con el agua

Naegleria sp. Meningoencefalitis	
----------------------------------	--

### B) Transmitidas por el agua (por ingestión)

Giardia lamblia	Giardiasis
Entamoeba histolytica	Amebiasis
Cryptosporidium sp.	Criptosporidiosis

## Bibliografía:

American Public Health Association. 1992. Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18 ed. Washington, DC: APHA.

Ashbolt NJ, Grabow, WOK, Snozzi M. 2001. Guidelines: the current position. En: Water Quality: guidelines, Standards and Health. Assessment of risk and risk management for water-related infectious diseases. Fewtrell L, Bartram J (eds.) IWA-Publishing, London UK, pp. 440.

Bandaranayake DR, Turner SJ, McBride GB, Lewis GD, Till DG. 1995. Health effects of bathing at selected New Zealand marine beaches. New Zealand.

Barbieri E, Falzano L, Forentini C, Pianetti A, Baffone W, Fabbri A, Matarrese, P, Casiere A, Katouli M, Kuhn I, Molby R Bruscolini F, Donelli G. 1999. Ocurrance, diversity, and pathogenicity of halophilic Vibrio spp. and non-O1 Vibrio cholerae from estuarine waters along the Italian Adriatic Coast. Appl Environ Microbiol 65:2748-2753.

Borrego JJ, Mariño FJ. 1995. Estudio epidemiológico de zonas de baño de la Provincia de Málaga. Sevilla:Junta de Andalucía, Consejería Salud, pp.1-217.

Cabelli VJ. 1983. Health effects criteria for marine recreational waters. US Environmental Protection Agency. EPA 600/1-80-01. Cincinnati, 98 pp.

European Economic Committee (EEC).1976. Council Directive concerning the quality of bathing waters (76/160/ECC). Brussels.

European Economic Committee (EEC).1994. Proposal for a Council Directive concerning the quality of bathing waters (94/C112/03). Brussels.

Figueras MJ, Polo FL, Inza I, Guarro J. 1994. Situación actual y perspectivas de la normativa legal sobre

el control microbiológico del agua de baño. *Técnicas de Laboratorio* 189:86-93.

González MI, Torres T, Nolasco T. 1996. Bacterias enteropatógenas e indicadores de contaminación en aguas recreativas para campismo. En: *Serie Salud Ambiental No 4*. Cuba: ECIMED, pp.127-135.

Havelaar A, Blumenthal UJ, Strauss M, Kay D, Bartram J. 2001. Guidelines: the current position. En: *Water Quality: guidelines, Standards and Health. Assessment of risk and risk management for water-related infectious diseases*. Fewtrell L, Bartram J (eds.) IWA-Publishing, London UK, pp. 440.

Hazen TC, Toranzos GA. 1990. Tropical Source Water. En: *Drinking Water Microbiology*. McFeters GA (eds.) New York:, Springer-Verlag, pp.33-53.

Hlady WG, Klontz KC.1996. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *J Infect Dis* 173:1176-1183.

Huq A, Hasan JAK, Losonsky G, Diomin V, Colwell RR. 1994. Colonization of professional divers by toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio cholerae* non O1 at dive sites in the United States, Ukraine and Russia. *FEMS Microbiol Lett*, 120:137-142.

Kay D, FleisherJM, Salmon RL, Jones F, Wyer MD, Godfree AF, Zelenauh-Jacquotte Z, Shore R. 1994. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomized exposure. *Lancet* 344:905-909.

Koh EGL, Huyn JH, La Roux PA. 1994. Pertinence of indicator organism and sampling variables to *Vibrio* concentrations. *Appl Environ Microbiol* 60:3897-3900.

Pérez-Rosas N, Hazen TC. 1988. In situ survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in tropical coral reefs. *Appl Environ Microbiol*, 54:1-9.

Pruss A. 1998. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *Int Epidemiol Assoc*, 27:1-9.

Rozsak DB, Colwell RR. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev* , 51:365-379.

Salas H. 1997. Historia y aplicación de normas microbiológicas de calidad de agua en el medio marino. OPS/CEPIS/PUB/97.30.

United Nations Environment Protection (UNEP). 1993. Report on the Second CEPPOP Seminar on Monitoring and Control of Sanitary Quality of Bathing and Shellfish-Growing Marine Waters in the Wider Caribbean. Kingston. Jamaica. August 1993:9-13.

US Environmental Protection Agency (USEPA). 1986. Ambient water quality criteria for bacteria. EPA 440/5-84-002. Washington.

World Health Organization (WHO). 2000. Monitoring Bathing Waters. A practical guide to the design and implementation of assessments and monitoring programmes (CEC-EPA-WHO), 350p.