



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA DEL
CANAL BAJO AL MEZCLARSE CON EL
EFLUENTE DE LA PLANTA SUR DE
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTAN

**SANDRA ORTEGA IBARRA
VÍCTOR MANUEL AIROLA GALLEGOS**

CD. OBREGÓN, SONORA

SEPTIEMBRE DE 2005



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIAS ALIMENTARIAS

Los miembros del comité revisor recomendamos que la presente tesis sea aceptada como requisito parcial para la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo.

COMITÉ REVISOR

Asesor: _____
M.C. Luciano Castro Espinoza.

Revisor: _____
Ing. Susana Margarita Quintero Pérez.

Revisor: _____
M.C. Norma Patricia Silva Beltrán.

Revisor: _____
Ing. Luis Arturo López López

Cd. Obregón, Sonora; México. Septiembre de 2005.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos Víctor:

- A mis padres, Víctor Manuel Airola Palma y Carmen Cecilia Gallegos de Airola, por su apoyo incondicional hasta este momento, y por su carácter para salir adelante en todas las adversidades, son mi motor para superarme. ¡Gracias!
- A mi hermana Ana Cecilia, a quien quiero mucho y a quien le agradezco su apoyo y carisma en todo momento.
- A todos mis familiares, por ser un apoyo invaluable y quienes me apoyaron hasta este momento.
- A todos mis amigos de la carrera con quienes logre uno de los mejores momentos de mi vida. ¡Nunca los olvidaré!
- A todos mis tutores de la carrera, por mostrarme las herramientas para poder desempeñarme en mi carrera.
- Al M.C. Luciano Castro Espinoza, por su sencillez, orientación en esta investigación y sus consejos. ¡Gracias!
- Al M.C. Luís Arturo López y a Ing. Ciria Cota por su apoyo para la realización y orientación en esta tesis. ¡Gracias!

Agradecimientos Sandra:

- A mis padres Segismundo Ortega y Lourdes Ibarra quienes me apoyaron en todo momento y enseñaron a salir adelante.
- A mis hermanas, a quienes quiero mucho, les doy gracias por su cariño y amistad.
- A Mario quien siempre me apoyo y creyó en mí.
- Al M.C. Luciano Castro gracias por sus consejos, por transmitirnos sus conocimientos y por su gran apoyo para la realización de esta tesis.
- A Luis Arturo y Ciria Cota, a quienes aprecio, gracias por su orientación y apoyo durante esta investigación.
- A la Ing. Susana Quintero y a la M.C. Patricia Silva gracias por sus comentarios tan oportunos.

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
Índice de tablas.....	iv
Índice de figuras.....	v
Resumen.....	vii
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Antecedentes.....	3
1.3 Planteamiento del problema.....	4
1.4 Justificación.....	4
1.5 Objetivos.....	5
1.6 Hipótesis.....	6
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1 Reuso de agua.....	7
2.2 Generalidades de los microorganismos en estudio.....	9
2.2.1 <i>Clostridium perfringens</i>	9
2.2.2 Colifago (MS-2).....	12
2.2.3 Coliformes Fecales.....	15
2.2.4 <i>Cryptosporidium spp.</i>	18
2.2.5 <i>Giardia spp.</i>	22
2.2.6 <i>Listeria spp.</i>	25
2.3 Transporte de microorganismos en Agua.....	27
2.4 Introducción a los modelos.....	29
III MÉTODO Y MATERIALES.....	32
3.1 Localización de la zona de muestreo.....	32

3.2 Estimación de la concentración de microorganismos en la mezcla del ARMT y el agua del canal bajo.....	33
3.3 Preparación de medios y reactivos.....	34
3.3.1 Medio para <i>Clostridium perfringens</i>	34
3.3.2 Medios para el Colifago (MS-2).....	35
3.3.3 Medio para Coliformes fecales.....	35
3.3.4 Soluciones para <i>Giardia</i> y <i>Cryptosporidium</i>	35
3.3.5 Medios para <i>Listeria spp.</i>	38
3.4 Análisis y recolección de muestras.....	39
3.4.1 Cuantificación de <i>Clostridium perfringens</i>	40
3.4.2 Cuantificación del colifago MS-2.....	40
3.4.3 Cuantificación de Coliformes fecales.....	41
3.4.4 Cuantificación de <i>Giardia lamblia</i> y <i>Cryptosporidium parvum</i>	41
a) Recolección de la muestra.....	41
b) Elución del filtro y concentración.....	42
c) Flotación y Purificación del sedimento.....	42

d) Prueba de inmunofluorescencia.....	43
3.4.5 Identificación de <i>Listeria spp.</i>	43
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1 Coliformes Fecales.....	45
4.2 Colifago (MS-2).....	47
4.3 <i>Giardia lamblia</i>	50
4.4 <i>Cryptosporidium parvum</i>	52
4.5 <i>Clostridium perfringens</i>	53
4.6 <i>Listeria spp.</i>	55
V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
VI BIBLIOGRAFÍA.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. Prevalencia de infecciones intestinales de acuerdo a la exposición y edad.....	9
Tabla 2. Condiciones para el desarrollo de <i>E.coli</i>	17
Tabla 3. Proporción utilizada para las series de etanol-glicerol.....	37
Tabla 4. Concentración de coliformes fecales en muestras de agua del canal y salida de la planta.....	46
Tabla 5. Concentración del colifago (MS-2) en muestras de agua del canal y salida de la planta.....	48
Tabla 6. Concentración <i>Giardia lamblia</i> en muestras de agua del canal y salida de la planta.....	50
Tabla 7. Concentración <i>Cryptosporidium parvum</i> en muestras de agua del canal y salida de la planta.....	52
Tabla 8. Concentración <i>Clostridium perfringens</i> en muestras de agua del canal y salida de la planta.....	54
Tabla 9. Presencia y ausencia de <i>Listeria spp.</i> en muestras de agua del canal y salida de la planta.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1. Vista microscópica del grupo de Coliformes fecales.....	17
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium parvum</i>	21
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	24
Figura 4. Ubicación de los puntos de muestreo en el recorrido del canal principal bajo.....	32
Figura 5. Esquema de la mezcla canal – ART en Vensim.....	34
Figura 6. Cuantificación de coliformes fecales por extensión en placa.....	41
Figura 7. Identificación de <i>Listeria spp</i>	44
Figura 8. Concentración de coliformes fecales en la mezcla con diferentes gastos.....	47
Figura 9. Concentración de coliformes fecales en la mezcla con diferentes gastos, en caso que se cumpliera con la norma.....	47
Figura 10. Concentración del colifago MS-2 en la mezcla, con diferentes gastos.....	49
Figura 11. Concentración de <i>Giardia lamblia</i> en la mezcla, con diferentes gastos.....	51

Figura 12. Concentración de <i>Cryptosporidium parvum</i> en la mezcla, con diferentes gastos.....	53
Figura 13. Concentración de <i>Clostridium perfringens</i> en la mezcla, con diferentes gastos.....	54

RESUMEN

La reutilización de las aguas residuales tratadas (ART) mezcladas con el agua del canal principal bajo, se ha planteado como una opción alternativa para el riego de cultivos. Esta opción se debe a la necesidad de agua en la localidad la cual limita los cultivos en la zona. Sin embargo, para la reutilización se requiere hacer un estudio microbiológico del ART y del agua del canal bajo en diversos puntos de su recorrido.

Por lo anterior se realizó la presente investigación donde se evaluaron diversos microorganismos como indicadores microbiológicos, además de los propuestos por las normas mexicanas. Los microorganismos evaluados fueron *Clostridium perfringens*, colifago (MS-2), coliformes fecales, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* y *Listeria spp.* Además se realizó una estimación de la concentración de microorganismos que se tendrían al mezclarse un volumen de agua del canal bajo con un volumen del efluente de la planta de tratamiento.

Los muestreos se llevaron a cabo en los meses de enero a junio del 2005 donde se seleccionaron siete puntos de muestreo de los cuales uno corresponde a la salida de la planta tratadora, y los restantes comprenden el trayecto del canal bajo, asimismo los experimentos se realizaron en el laboratorio de Ecodesarrollo del ITSON Unidad Centro en Ciudad Obregón.

Los resultados para la mezcla de las aguas indican que la concentración de coliformes fecales excede las norma NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT, 2005 a) mientras que para *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* se exceden las dosis mínimas infectivas y en el caso de los colifagos la presencia de estos

está asociada con una concentración de virus entéricos que podría causar infección, por lo que no se recomienda el consumo con fines domésticos de esta agua. Sin embargo se podría utilizar esta agua con fines agrícolas tomando ciertas consideraciones al respecto, como el tipo de cosecha y el volumen de agua que maneja el canal bajo en ese momento.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Dada la creciente necesidad de agua en Ciudad Obregón se plantea la posibilidad de incorporar el agua residual tratada (ART) al canal principal bajo del distrito de riego, del valle del Yaqui, con el fin de que éstas sean reutilizadas en actividades agrícolas fundamentalmente.

La función principal, del canal principal bajo, es la conducción y distribución de agua requerida por las actividades agrícolas del valle del Yaqui. Sin embargo, las aguas conducidas por los canales tanto principales y secundarios ocasionalmente son empleadas para usos domésticos, incluido el consumo humano y con fines recreativos. La consideración de gran importancia para el reuso de las aguas residuales, tratadas o sin tratar, es el aspecto de salud pública que puede representar la incidencia de microorganismos patógenos en el agua tanto de uso diario como de uso agrícola.

La reutilización de aguas residuales en México esta regido por las Normas oficiales Mexicanas Ecológicas NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT, 2005 a) y NOM-003-SEMARNAT-1997 (SEMARNAT, 2005 b). La NOM-001-SEMARNAT-1996 establece los límites máximos permisibles para la descarga de aguas residuales a ríos y embalses naturales y artificiales que pudieran ser empleados para riego agrícola. Mientras que la NOM-003- SEMARNAT-1997, establece los límites máximos permisibles para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios públicos.

Actualmente en Ciudad Obregón, Sonora, se cuenta con dos plantas de tratamiento de las aguas residuales municipales, denominadas Norte y Sur, que en conjunto generan alrededor de 1m^3 / segundo de aguas residuales tratadas. Debido a la escasez de agua, en la localidad se plantea reutilizar, en primera instancia, la mitad de ésta cantidad ($0.5\text{ m}^3/\text{segundo}$) en actividades agrícolas mediante su descarga al canal principal bajo.

El reuso de ART permitirá contar con una cantidad de 31.536 millones de metros cúbicos anualmente, si se considera el agua residual tratada generada por las dos plantas de tratamiento de aguas residuales de Cd. Obregón. Tal cantidad de agua, representa irrigar alrededor de 3,000 a 4,500 hectáreas por año. Lo que a su vez, contribuiría a la solución de las grandes necesidades de agua del Valle del Yaqui, ya que por la sequía, el agua que es suministrada de la presa Álvaro Obregón es insuficiente y limita los cultivos en la zona.

En el ámbito internacional se ha visto la necesidad de incluir nuevos indicadores microbiológicos debido a que se ha encontrado que algunos microorganismos patógenos pueden ser más resistentes a cloración y otros factores de estrés ambiental que los coliformes. Algunos de éstos organismos son los siguientes: virus entéricos, quistes de *Giardia*, ooquistes de *Cryptosporidium*, y esporas de *Clostridium perfringens*.

Para el aprovechamiento de las ART, es necesario tener la certeza de que la calidad del agua, particularmente la microbiológica, no representará algún problema en la agricultura y sobre todo en la salud pública, debido a que los canales sirven como centros de recreación y en algunos casos las poblaciones cercanas la utilizan para sus necesidades básicas. Por lo cual es necesario conocer la calidad microbiológica resultante después del tratamiento que actualmente reciben las aguas residuales generadas en Ciudad Obregón, Sonora. Asimismo, es necesario determinar la calidad del agua en el canal principal bajo una vez que se lleve a cabo la descarga de las aguas residuales tratadas a éste.

La concentración microbiana resultante de la descarga continua de un afluente a una corriente puede estimarse a través de la ecuación general de la conservación de masa, la cual incluye procesos de transporte (advección y difusión), procesos de transformación (muerte microbiana, sedimentación, entre otros) y aporte de otras descargas (Metcalf & Eddy, 1991).

1.2 Antecedentes

La distribución desigual de los recursos hidráulicos, han obligado a numerosos organismos y redes de distribución hidráulicos a buscar nuevas e innovadoras fuentes de abastecimiento de aguas (Pettygrove y Asano, 1985). Las aguas residuales tratadas, permiten aumentar las fuentes de abastecimiento locales y contribuyen a satisfacer la demanda cada vez mayor de este recurso. Las aguas potencialmente recuperables, tales como las excedentes del riego agrícola o las generadas en las zonas urbanas, podrían ser realmente recuperadas y reutilizadas (Pettygrove y Asano, 1985).

En el Instituto Tecnológico de Sonora se han realizado diversas investigaciones al agua municipal tratada, al agua residual sin tratar y al agua para irrigación de cultivos. Además, se realizaron estudios del impacto microbiológico que presentaron los vegetales al irrigarse con las aguas mencionadas anteriormente.

En un estudio realizado por Gortáres *et al.*, (2001 b), donde analizaron la calidad microbiológica y fisicoquímica del efluente de la planta tratadora, encontraron que el nivel de *Cryptosporidium* (18 ooquistes / 100 ml) y *Giardia* (1200 quistes / 100 ml) es ligeramente superior a la dosis infectiva. Además, los resultados confirman una remoción eficiente de coliformes fecales (99.9987%), colifagos (99.4091%), *Streptococos* (99.9286%) y virus entéricos (99.08%) por el proceso de tratamiento de aguas. En contraste, con el bajo porcentaje de remoción para la

materia orgánica expresada como DBO (60.44 %), Helmintos (> 84.61%), ooquistes de *Cryptosporidium* (68.40 %), y quistes de *Giardia* (50.00 %).

En otros estudios realizados se encontró que al analizar microbiológicamente los vegetales irrigados con agua residual tratada, agua residual y agua de riego las concentraciones de microorganismos eran relativamente bajas. A pesar de que en agua residual la concentración de microorganismos era mayor que en el agua tratada y en el agua utilizada comúnmente para irrigar cultivos, no se encontraron diferencias significativas en la calidad microbiológica de los vegetales. Mas si encontraron acumulación de *Giardia* y *Cryptosporidium* en el suelo irrigado con agua residual y con agua residual tratada, lo cual atribuyen a que el tamaño de los ooquistes de *Cryptosporidium* (2 - 4 μ) y los quistes de *Giardia* (6 -10 μ) son mayores que el poro del suelo (1 - 2 μ) (Gortáres *et al.*, 2001 a, b).

1.3 Planteamiento del problema

Dada la necesidad de agua en la localidad, especialmente en el sector agrícola, la posibilidad de incorporar el agua residual tratada al canal principal bajo, se contempla como una alternativa. Por lo que resulta necesario conocer la calidad microbiológica resultante de la mezcla de esta agua.

El principal uso que se le pretende dar es agrícola. Sin embargo, es evidente que las aguas conducidas por el canal son empleadas para usos domésticos, consumo humano y recreativo, debido a los asentamientos que hay a lo largo del canal. Por lo cual es importante, evaluar la calidad microbiológica y establecer volúmenes de mezcla de ambas aguas.

1.4 Justificación

La función primordial del canal principal bajo, es la conducción del agua requerida para las actividades agrícolas del valle del Yaqui. Además, las aguas conducidas por los canales ocasionalmente son empleadas para usos domésticos, consumo humano y fines recreativos. Por esta razón es importante determinar y cuantificar microorganismos tales como: coliformes fecales, *Giardia lamblia*, *Listeria spp.*, *Clostridium perfringens*, colifago (MS-2), *Cryptosporidium parvum*; los cuales nos indican la calidad microbiológica tanto del efluente de la planta de tratamiento como del canal bajo, para su posible mezcla y uso en riego agrícola.

1.5 Objetivos

Objetivo general

Determinar el nivel de mezclado del agua residual tratada con el agua del canal bajo, para que la mezcla pueda ser utilizada en riego agrícola.

Objetivos específicos

- Cuantificar coliformes fecales, *Giardia lamblia*, *Listeria spp.*, *Clostridium perfringens*, colifago (MS-2), *Cryptosporidium parvum* en los efluentes de la planta de tratamiento sur y agua superficial.
- Diseñar un modelo mediante los programas Excel 2002 y Vensim PLE 32 Versión 3.0. que permita predecir la concentración de microorganismos al ser mezclados un volumen de agua del canal bajo con un volumen del efluente de la planta de tratamiento.

1.6 Hipótesis

El agua residual tratada al ser mezclada con la del canal bajo, tendrá una calidad microbiológica apta para uso de riego de cultivos en el Valle del Yaqui, cumpliendo con las normas para coliformes fecales y no rebasando los estándares o dosis infectivas para *Giardia lamblia*, *Listeria spp.*, *Clostridium perfringens*, colifago (MS-2) y *Cryptosporidium parvum*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Reuso de agua

En muchos países los estándares para la reutilización de las aguas residuales han sido influenciados por las pautas de salud establecidas por la WHO (World Health Organization) y la USEPA (United States Environmental Protection Agency). Sin embargo, debido a los estándares microbiológicos tan exigentes requeridos por la USEPA y la WHO para el uso de las aguas residuales tratadas, puede ser difícil de alcanzar estos estándares sobre todo en los países en desarrollo, ya se requiere de una gran inversión. (Blumenthal *et al.*, 2000).

Por su parte la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 (SEMARNAT, 2005 a) establece que para la contaminación por patógenos se tomará como indicador a los coliformes fecales. El límite máximo permisible para las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, así como las descargas vertidas a suelo (uso en riego agrícola) es de 1,000 y 2,000 como número más probable (NMP) de coliformes fecales por cada 100 ml para el promedio mensual y diario, respectivamente. Además también establece que para la contaminación por parásitos se tomará como indicador a los huevos de helminto y el límite máximo permisible para las descargas vertidas a suelo (uso en riego agrícola), es de un huevo de helminto por litro para riego no restringido, y de cinco huevos por litro para riego restringido.

En un estudio realizado por Blumenthal *et al.*, (2000) utilizaron tres métodos para establecer nuevas pautas de calidad microbiológica, en las aguas residuales tratadas, utilizadas en la agricultura. Los resultados encontrados en el estudio fueron los siguientes: la guía basada en la ausencia de indicadores fecales en el agua tratada, resultó ser innecesariamente conservadora y un instrumento costoso para la protección sanitaria pública. Mientras que, cuando se usó un método que utilizó estudios epidemiológicos y estudios microbiológicos de transmisión de patógenos, resultó más rentable que el primer acercamiento (método de cero indicadores fecales) y además protege adecuadamente la salud pública.

En el Valle del Mezquital, ubicado en el estado de Hidalgo se realizó un estudio epidemiológico del uso agrícola del agua residual, en donde se evaluó la prevalencia de enfermedades diarreicas e infecciones intestinales en los siguientes grupos: 1. Trabajadores con exposición alta, que comprende trabajadores que realizan labores con agua residual cruda (108 coliformes fecales/ 100ml y 70 huevecillos de *Ascaris lumbricoides*) 2. Exposición media, donde están los trabajadores que riegan con agua residual que sale de una presa de almacenamiento (10 coliformes fecales / 100 ml y 0 huevecillos de *Ascaris lumbricoides*) y 3. Baja exposición de las aguas, que comprenden familias dependientes del temporal (lluvia). De esta manera Cifuentes *et al.*, (1994) encontraron los resultados que se presentan en la Tabla 1.

De acuerdo a la tabla 1 se observa que las prevalencia de infección por *Giardia lamblia* fueron similares entre los niños menores de 15 años de los tres grupos de exposición, pero entre la población adulta la prevalencia fue mayor en el grupo de exposición media, lo que se relaciona con las carencia higiénico sanitaria en este grupo. Además al usar el agua residual se aumentó el riesgo por *A. lumbricoides* y probablemente también por *E.histolytica*. En contraste, cuando se utilizó el agua retenida en las presas de almacenamiento, para irrigar cultivos, se redujo el riesgo de infección por *A. lumbricoides* (Cifuentes *et al.*, 1994).

Tabla 1. Prevalencia de infecciones intestinales de acuerdo a la exposición y edad.

Edades	Grupos de exposición		
	Expuesto	Control	Semi-expuesto
<i>Ascaris lumbricoides</i> ^a			
0-4 años	1.53	2.7	3.3
5-14 años	16.1	1.0	2.0
15 + años	5.3	0.5	1.2
<i>Giardia lamblia</i> ^a			
0-4 años	13.6	13.5	15.9
5-14 años	9.6	9.2	10.8
15 + años	2.3	2.5	4.8
<i>Entamoeba histolytica</i> ^a			
0-4 años	7.0	7.3	5.4
5-14 años	16.4	12.0	16.1
15 + años	16.0	13.8	14.5

a. Resultados expresados en porcentajes de infección= individuos infectados/ número de individuos muestra.

Fuente: Cifuentes *et al.*, 1994.

El usar agua residual o agua residual tratada presenta beneficios tales como: el permitir que se obtengan grandes cosechas en extensiones consideradas semiáridas e improductivas, el aprovechamiento de los elementos nutritivos contenidos en el agua mediante su asimilación por los cultivos agrícolas, entre otros. Sin embargo, también existen riesgos para la salud pública y deterioro en la calidad del ambiente, por lo que se requiere de una evaluación permanente de las aguas (Cifuentes *et al.*, 1994; Pettygrove y Asano, 1985).

2.2 Generalidades de los microorganismos en estudio

2.2.1 *Clostridium perfringens*

Morfología. Es un bacilo gordo, inmóvil, anaerobio, Gram positivo, de longitud variable, que aparece aislado y en cadenas. La formación de esporas es escasa, y sólo se produce en ausencia de glúcidos fermentables (Freeman, 1989). Por esta razón, al momento de analizar las muestras de agua se hace un choque térmico para estimular la esporulación de las células vegetativas de *C. perfringens*.

Fisiología. Es un anaerobio estricto y su crecimiento en medios que carecen de azúcar es limitado. En presencia de glúcidos fermentables tienen las condiciones óptimas de crecimiento sin embargo, su vida en estos medios es corta por la baja formación de esporas y de la acción destructiva que ejercen los ácidos formados en el proceso de fermentación sobre las células vegetativas (Freeman, 1989).

La clasificación serológica de *C. perfringens* no tiene gran aplicabilidad, debido al gran número de antígenos que tiene reacción cruzada, los diferentes tipos de *C. perfringens* se distinguen por los antígenos liberados por la célula, muchos de los cuales resultan ser tóxicos. Los tipos de *Clostridium perfringens* de acuerdo a los antígenos se clasifican en A, B, C, D y E; la mayoría de las enfermedades causadas por este microorganismo son debidas al tipo A, mientras que el tipo C es principalmente un patógeno animal, pero algunas cepas del tipo C provoca una enterocolitis necrotizante en el hombre. Los tipos restantes son patógenos animales que rara vez se encuentran en infecciones del hombre (Freeman, 1989).

Las toxinas más importantes producidas por los distintos tipos de esta bacteria son la α , β , ι y ϵ . La toxina de mayor relevancia es la α debido a que es la que ha sido relacionada con la virulencia de *C. perfringens* en las infecciones de las heridas. Esta toxina es una fosfolipasa C dependiente del calcio, con propiedades letales. Además *C. perfringens* tipo A produce una colagenasa, llamada toxina-ktoxina K, la cual actúa como un factor de virulencia (Freeman, 1989).

Naturaleza de la enfermedad. *Clostridium perfringens* es una importante causa de intoxicación alimentaria en Estados Unidos. La enfermedad aguda es causada por cepas del tipo C que producen la toxina β , ésta enfermedad es llamada enteritis necrotizante o pig-bel, la cual es poco común y está asociada con los banquetes en Nueva Guinea donde se consume la carne con batatas. La toxina β es sensible a la digestión por tripsina pero las batatas contienen un inhibidor de la tripsina de manera que la toxina no se inactiva (Freeman, 1989; Madigan *et al.*, 1999).

La forma común de envenenamiento de *perfringens* se caracteriza por intensos calambres abdominales y diarrea la cual comienza en aproximadamente un intervalo de 8-22 horas después de ingerir alimentos contaminados. Los síntomas normalmente duran 24 horas, pero en algunos individuos síntomas menos severos pueden persistir por 1 o 2 semanas (FDA, 2005). Aunque los casos mortales por esta enfermedad son escasos se han presentado muertes por resultado de deshidratación y otras complicaciones.

De acuerdo con diversos autores (FDA, 2005; Madigan *et al.*, 1999) la enfermedad es el resultado de haber ingerido una gran dosis de células vegetativas (más de 10^8 células) de *C. perfringens* y está especialmente asociada al consumo de carne o productos cárnicos contaminados. La producción de la toxina en la zona digestiva se asocia a la esporulación.

Hábitat. *Clostridium perfringens* es bastante común en una variedad de alimentos cocinados y crudos, especialmente en la carne, las aves y el pescado, además de en el suelo y en las aguas residuales (Madigan *et al.*, 1999). Los clostridios son encontrados en varias concentraciones en el agua residual (típicamente 10^4 a 10^5 / 100ml en agua sin tratar y de 10^3 a 10^4 /100ml en efluentes de aguas residuales).

La semejanza de las cuentas obtenidas en diversos estudios sugieren que la mayoría de los clostridios sulfito reductores (CSR) en el agua residual son *Clostridium perfringens*. En las aguas superficiales como ríos y lagos son encontrados bajos conteos de *C. perfringens*, la principal fuente de CSR son aguas residuales municipales. El rango de conteos para *C. perfringens* o clostridios sulfito reductores varía de menos de 1 a 2000 por 100 ml (Bitton, 2002).

Clostridium perfringens como indicador. Este microorganismo es considerado como uno de los principales indicadores bacterianos anaerobios, además de las *Bifidobacterias* y *Bacteriodes spp*, y representa el 0.5% de la microflora fecal. Entre los beneficios del uso de *C. perfringens* esta el hecho que esta bacteria no se reproduce en el ambiente y es exclusiva de origen fecal. Pero como contraparte las esporas que produce son muy resistentes al estrés ambiental y a la desinfección, por lo que no pueden representar una contaminación fecal reciente, ya que pueden permanecer incluso por años en el ambiente, además se requiere incubación anaeróbica (Bitton, 1999).

No obstante ha sido sugerido el uso de este microorganismo como un indicador de contaminación pasada y como marcador para seguir el destino de los patógenos (Bitton, 1999). También ha sido sugerido como un conveniente indicador para virus y quistes de protozoarios en las aguas de tratamiento (Payment y Franco, 1993), y para los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* después de la desinfección con oxidante (Venczel *et al.*, 1997).

2.2.2 Colifago (MS-2)

Los bacteriófagos (fagos), son por definición virus que infectan bacterias; y aquellos fagos que infectan específicamente a *E. coli* se les llama colifagos. Los bacteriófagos constan de una cubierta protéica y una base interna que contiene su material genético. Estos usualmente infectan a la bacteria hospedadora

uniéndose a la célula bacteriana del hospedador receptor específico e inyectando su ácido nucleico dentro de la bacteria (Bitton, 2002). Los virus bacterianos están ampliamente difundidos en la naturaleza e infectan una amplia gama de géneros bacterianos; sin embargo, los hospederos posibles de cualquier virus específico se limitan normalmente a una o pocas especies bacterianas (Freeman, 1989).

Taxonomía. En 1966 se estableció el Comité Internacional de Nomenclatura de Virus, para desarrollar sistemas de clasificación para los virus y fagos. Desde el establecimiento de este comité han surgido disputas acerca de los sistemas taxonómicos a seguir (Bitton, 2002). Actualmente este comité reconoce 13 familias, y 30 géneros en fagos. Los criterios más importantes para la clasificación dentro de las familias son tipo de ácido nucléico, forma de la partícula, y la presencia o la ausencia de cubierta (Lederberg, 2000).

Los fagos pueden clasificarse según su morfología en aquellos que tiene cola, en cúbicos, filamentosos y pleomórficos. El colifago MS-2 pertenece a los fagos de RNA cúbicos de la familia Leviviridae (Lederberg, 2000). Los Levivirus se asemejan a los enterovirus, la mayoría de ellos son colifagos plasmido-específicos que se adsorben por los filamentos sexuales F también llamados fimbrias o pilis. MS-2 es un fago macho-específico que usualmente infecta cepas de E. coli F+ (Bitton, 2002).

Fisiología: ciclo lítico. De acuerdo con Freeman (1989) los virus bacterianos se pueden clasificar en dos categorías principales, según sus ciclos vitales: virulentos o atemperados. La infección de las bacterias con un bacteriófago virulento desemboca en la replicación y liberación de las nuevas partículas virales, causando la muerte y la lisis de la bacteria hospedadora. Los virus atemperados pueden persistir en la célula hospedadora en estado inactivo (como profago), como una entidad genética heredable, además de ser capaces de en dado momento seguir la ruta lítica.

El ciclo lítico también es llamado vegetativo o productivo, resulta en la producción de nuevos fagos. Los ciclos líticos muestran varios pasos y varían considerablemente de acuerdo al tipo de fago. Estos ciclos se llevan a cabo en cuatro pasos que incluyen la adsorción, infección, multiplicación y por último la liberación.

La adsorción del colifago MS-2 se lleva a cabo cuando este se fija a los lados de los filamentos usando la proteína A (proteína de maduración), e inyecta su material genético en el hueco del tubo de conjugación, permitiendo la migración del RNA del fago por el tubo de conjugación a la célula huésped (Bitton, 2002). El RNA del MS-2 sirve como su propio mRNA, y una vez que entra al citoplasma de la bacteria hospedadora, puede empezar inmediatamente con la producción de un nuevo fago (Madigan *et al.*, 1999). El colifago codifica para cuatro proteínas conocidas. La proteína de la cubierta o cápsida, la proteína de la maduración (proteína - A), la proteína de la lisis (o proteína L) y una subunidad de la RNA replicasa, la enzima que lleva a cabo la replicación del RNA vírico. La RNA replicasa es una proteína mixta que está formada por un polipéptido del virus y otros polipéptidos del hospedero (Madigan *et al.*, 1999).

De los cuatro sitios de iniciación AUG, el que resulta de más fácil acceso es el que corresponde al de la proteína de la cápsida por lo que su traducción comienza muy pronto, de igual manera la secuencia de mRNA de la replicasa también se traduce tempranamente. Debido a la estructura secundaria del RNA el codón de iniciación de la proteína lítica no es fácilmente accesible a los ribosomas, pero una vez que termina la traducción de la proteína de la cápsida esta región cambia, lo que permite a veces iniciar la lectura del gen de la proteína lítica. Finalmente ocurre el ensamblaje del fago y tiene lugar la liberación de viriones a la célula a consecuencia de la lisis celular (Madigan *et al.*, 1999).

Bacteriófagos como indicadores. Se han considerado tres principales grupos de bacteriófagos que infectan a las bacterias entéricas unos son los colifagos

somáticos, los bacteriófagos con RNA F- específicos, al cual pertenece el colifago MS-2, y los bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis*. Los bacteriófagos de los tres grupos anteriormente mencionados son encontrados en aguas residuales sin tratar y en los efluentes de las aguas residuales. La mayoría de los reportes indican que los colifagos somáticos son los que se presentan en mayor abundancia en el agua municipal sin tratar, siguiéndoles en abundancia los bacteriófagos con RNA F-específicos. Los valores mas frecuentes van de 5×10^5 a 5×10^6 UFP/ 100 ml, usualmente un orden menos que los colifagos somáticos (Bitton, 2002).

Los fagos se han usado principalmente como modelos o sustituto para determinar el destino de los virus entéricos patogénicos para los humanos, como indicadores de patógenos, como vectores para el transporte de la información genética, e incluso como agentes de biocontrol (Bitton, 2002).

Los colifagos han sido propuestos como índices potenciales de la presencia de virus humanos debido a su parecido a los virus entéricos humanos en tamaño, forma y punto isoeléctrico; además estos se encuentran en mayores cantidades que los virus patogénicos, resultan más fácil de identificar y la técnica es rentable (Gerba, P. y Brooks, J., 2004).

2.2.3 Coliformes Fecales

Los coliformes fecales o coliformes termotolerantes incluyen a todos los coliformes que fermentan lactosa a 44.5 ± 0.2 °C. Los coliformes fecales comprenden bacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La presencia de coliformes fecales indica la presencia de materia fecal de animales de sangre caliente. Sin embargo, no se ha podido distinguir si la contaminación proviene de fuentes humanas o animales. Se ha sugerido el uso de *E. coli* como único indicador de contaminación fecal, ya que puede ser fácilmente distinguida

de otros miembros del grupo coliforme fecal por la ausencia de ureasa y presencia de β -glucoronidasa (Bitton, 1999).

Por si mismos los coliformes fecales generalmente no presentan un peligro para la gente o animales pero indican la presencia de otras bacterias causantes de enfermedades, tales como aquellas que causan la tifoidea, disentería y cólera (EPA, 2003). Los coliformes fecales presentan un patrón de sobrevivencia similar al de las bacterias patógenas, sin embargo, su utilidad como indicadores de contaminación viral o con protozoarios es limitado ya que son menos resistentes a la desinfección (Bitton, 1999).

Escherichia coli

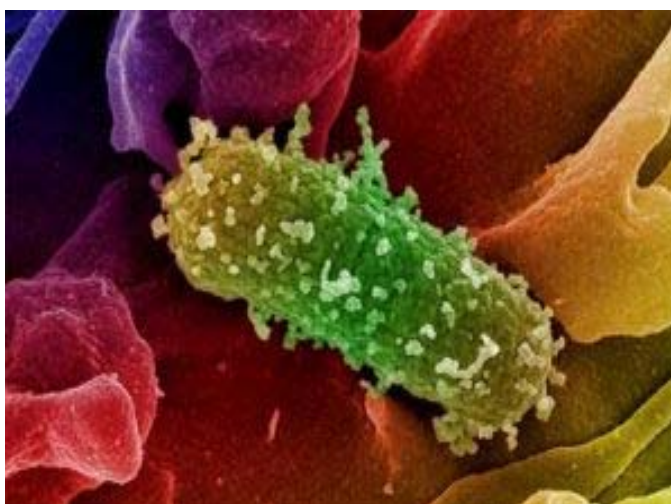
Taxonomía. Es un bacilo Gram. negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002). La bacteria *E. coli* puede sobrevivir a ciertas condiciones de pH, y temperatura las cuales se muestran en la tabla 2.

En el tracto intestinal existen un gran número de *E. coli* y estas son las enterobacterias asociadas con más infecciones del tracto urinario y gastroenteritis. La composición antigénica de *E. coli* es compleja y se han descrito gran número de antígenos O, H y K. La clasificación serológica de los aislados de *E. coli* tiene utilidad para fines epidemiológicos y ciertos serotipos específicos se asocian con virulencia aumentada (Murray *et al.*, 1997).

Supervivencia Esta bacteria representa un riesgo en efluentes de distribución de aguas para irrigar cultivos. Banning *et al.*, (2002) estudiaron el tiempo de supervivencia de *E. coli* en agua de estanque incubada y observaron que el tiempo de supervivencia fue de 132 días, además mostró un menor tiempo de supervivencia en agua no incubada, esta fue afectada por los factores abióticos atribuidos principalmente a la competencia de nutrimentos, antagonismo con otras bacterias y un posible ataque de bacteriófagos.

En la figura 1 se muestra una imagen de los coliformes fecales, o también llamadas coliformes termotolerantes.

Figura 1. Vista microscópica del grupo de Coliformes fecales.



Fuente: SEMARNAT, 2003.

Tabla 2. Condiciones para el desarrollo de *E. coli*.

Factores fisicoquímicos	Valor
pH mínimo	4
pH máximo	9
Temperatura mínima	6.5°C
Temperatura máxima	49.4°C
Requerimiento de oxígeno	Anaerobio facultativo

En un estudio efectuado por Guan y Holley, (2003), experimentaron con la supervivencia de *E. coli* en agua filtrada, esterilizada y de lago, donde encontraron que independientemente de la fuente de agua la supervivencia era mayor a bajas temperaturas, asimismo se demostró que puede encontrarse viable pero no cultivable, ya que los métodos convencionales de recuperación no los identifican, por esta razón mencionan que existe una estrategia de supervivencia a las condiciones de estrés del medio ambiente.

Enfermedades y Patogenicidad. Actualmente, hay cuatro clases reconocidas de *E. coli* enterovirulento (designado colectivamente el grupo de EEC) que causan gastroenteritis en seres humanos. Entre estas EEC se encuentran las cepas enterotoxigénicas (ETEC), la *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* O157:H7 y por último la *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). La primera, ha sido asociada con enfermedades diarreicas de todas las edades y requiere una dosis infectiva alta para causar la enfermedad, alrededor de 10 millones de bacterias; al igual que la anterior la *E. coli* Enteropatógena requiere también de una dosis infectiva alta de un millón de bacterias aproximadamente, mientras que para la *E. coli* O157:H7 se desconoce su dosis infectiva. Por su parte para la *E. coli* enteroinvasiva se cree que su dosis infectiva es de 10 organismos al igual que *Shigella* (FDA, 2005).

2.2.4 *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium es un protozoario cocoidal que fue descrito por primera vez por Tyzzer en 1907 cuando identificó el organismo en el tejido del intestino de un ratón. Sin embargo, no fue hasta el año de 1976 cuando fue identificado como un patógeno humano, cuando fue encontrado en heces de pacientes inmunodeficientes, y desde entonces es considerado como una causa común de diarrea alrededor del mundo (Maier *et al.*, 2000; Wiley, 1998). Las principales rutas de transmisión de *Cryptosporidium* es fecal-oral, persona-persona y animal-

persona debido a la ingestión de agua o comida contaminada (McAnulty *et al.*, 1994; Maier *et al.*, 2000).

Taxonomía. *Cryptosporidium parvum* es un protozooario miembro del género *Cryptosporidium* familia Cryptosporidiidae. *Cryptosporidium* es un pequeño parásito que infecta las microvellosidades de las células epiteliales en el aparato respiratorio y digestivo de vertebrados (ITIS, 2004). Se han descrito varias especies de *Cryptosporidium* y sus posibles hospederos. De esta manera *C. parvum* puede encontrarse en mamíferos incluyendo humanos; *C. baileyi* y *C. meleagridis* en los pájaros; *C. muris* en los roedores; *C. serpentis* en los reptiles y *C. nasorum* en los peces (EPA, 2001). Actualmente se cree que la forma que infecta a los humanos es la misma especie que causa la enfermedad en los carneros jóvenes. Las formas que infectan a los hospederos aviares y a los ratones se cree que no son capaces de infectar a los humanos (FDA, 2005).

Ciclo de Vida. *Cryptosporidium spp.* es monoxeno (completa su ciclo en un hospedero). El ciclo de vida ocurre cuando la persona o animal infectado libera ooquistes a través de sus heces fecales, pudiendo permanecer en el ambiente por largos periodos sin perder su viabilidad, debido a la gruesa pared del ooquiste que protege a los esporozoitos (Soto, 2004).

Cryptosporidium parvum tiene un ciclo de vida complejo que envuelve etapas sexuales y asexuales. En el intestino delgado los ooquistes, por acción de jugos gástricos y sales biliares, liberan cuatro esporozoitos que parasitan las células epiteliales de la mucosa. El desarrollo de diferentes estadios del parásito ocurre intracelularmente (Maier *et al.*, 2000; Soto, 2004).

Cada generación de parásitos se desarrollan y maduran en un periodo de 12 a 24 horas (Maier *et al.*, 2000). Los ooquistes son esféricos con un diámetro de 4-6 μm . Formando ooquistes de pared delgada y gruesa. Los ooquistes de pared delgada

pueden desenquistarse dentro del mismo hospedero y comenzar un nuevo ciclo (autoinfección) (Figura 2). Mientras que los ooquistes de pared gruesa son liberados al medio ambiente donde permanecen por largos periodos de tiempo (Soto, 2004).

Patogenicidad. Diversos estudios han demostrado que *Cryptosporidium parvum* afecta también a personas con sistema inmunológico normal, siendo más susceptibles niños y ancianos (FDA, 2005). Ono *et al.*, (2001), mencionan que se ha demostrado que la dosis infectiva es de nueve quistes en individuos sanos. Además, la FDA (2005) menciona que presumiblemente un organismo puede iniciar la infección.

Enfermedad. El periodo de incubación es normalmente de 7 a 10 días, pero se tiene un rango de 4 – 28 en algunos casos. El principal síntoma de la enfermedad es la diarrea, otros síntomas son heces acuosas y ofensivas que pueden contener moco, pero rara vez pus o células sanguíneas. También puede presentarse dolor abdominal y una fiebre leve (Wiley, 1998). La criptosporidiosis en individuos sanos se autolimita, pero los pacientes muy jóvenes, o muy viejos, pueden desarrollar serias complicaciones, e incluso en los individuos con alteraciones inmunológicas tales como el SIDA, la enfermedad puede llevar a la muerte (Madigan *et al.*, 1999; Wiley, 1998).

La excreción de ooquistes por las personas infectadas se encuentra en el rango de 10^6 a 10^{11} por gramo de heces (Rose *et al.*, 2002). Estos ooquistes pueden permanecer viables por largos períodos de tiempo; además *Cryptosporidium* es muy resistente al cloro (hasta 14 veces mas resistente que las cepas de *Giardia* resistentes al cloro), y por ello los métodos para eliminarlo se basan en la sedimentación y filtración (Madigan *et al.*, 1999).

2.2.5 *Giardia spp.*

Giardia lamblia, es un protozoario que se mueve con ayuda de cinco flagelos. En Europa en ocasiones se refieren a este protozoario como *Lamblia intestinalis* (FDA, 2005). Fue descrito por primera vez en 1681 por Antonie van Leewenhoek, que los encontró en sus propias heces. Pero no fue hasta principios del siglo 20 cuando los médicos empezaron a asociar la diarrea con la presencia de *Giardia* en las heces (Maier *et al.*, 2000).

Taxonomía. *Giardia lamblia*, es un protozoario flagelado, que pertenece a la clase Zoomastigophora, orden Diplomonadida y familia Hexamitidae (FDA, 2005; ITIS, 2004; Wiley, 1998). Hasta la fecha se han reportado en la literatura científica, cinco especies de *Giardia*: *G. muris* (presente en roedores, pájaros y reptiles), *G. intestinalis* (sinónimo: duodenalis y lamblia en mamíferos incluyendo al hombre, roedores, reptiles y probablemente pájaros), *G. agilis* (en anfibios), *G. ardae* (en Garza azul) y *G. psittaci* (en pericos) (Medema, 1999).

Ciclo de vida. *Giardia lamblia* se presenta en forma de trofozoito o forma móvil, y quiste o forma de resistencia: el trofozoito es un microorganismo simétrico en forma de corazón, 10 a 20 µm de longitud. Tiene cuatro pares de flagelos, dos núcleos con cariosomas centrales prominentes y dos axostilos. Un gran disco sector en la porción anterior el cual ocupa gran parte de la superficie ventral (Soto, 2004).

Los humanos contraen la infección con *Giardia lamblia* por la ingestión de los quistes. Una vez que los quistes son ingeridos, éstos pasan a través del estómago y al intestino. El incremento de la acidez a través del estómago estimula la liberación de dos trofozoitos que colonizan las células epiteliales del intestino delgado (Maier *et al.*, 2000), donde se multiplican por fisión binaria, favorecida por el pH alcalino de esta zona y permanecen firmemente unidos a las

microvellosidades por medio de un potente disco succionador, o bien, pueden encontrarse libres dentro de la luz intestinal; muy raramente invaden aquélla (Díaz-Carbonell y Fernández-Alonso, 1996; Adam, 2001).

La adherencia de los trofozoitos a las células causa mala absorción y diarrea, debido a que no permite la absorción de agua y nutrientes (Medema, 1999). Posteriormente se dirigen al colon, donde *Giardia* genera su estructura quística para ser liberada al medio ambiente (Soto, 2004) (Figura 3).

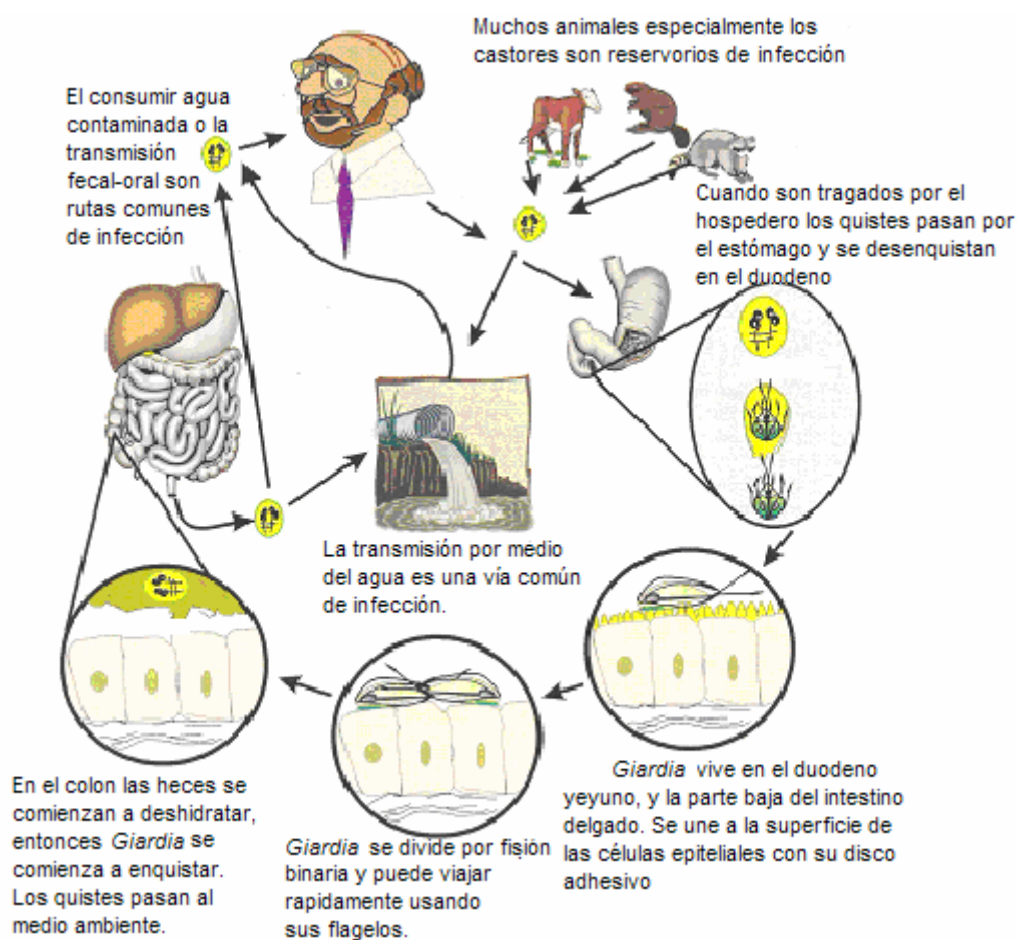
Los quistes excretados en las heces de un hospedero infectado se mueven pasivamente a través del ambiente. Tienen un tamaño de 8 a 14 μm de longitud y de forma elipsoide, tienen dos núcleos cuando son quistes inmaduros y cuatro cuando maduran, la sobrevivencia de los quistes en el ambiente se ve afectada por la temperatura, disminuyendo conforme aumenta la misma. La sobrevivencia de los quistes de 2 a 3 meses en agua cuya temperatura es menor de 10° C y a temperaturas de 21° C, los quistes pueden permanecer viables por 1 mes (Soto, 2004). Aunque a la temperatura de 54° C se pueden inactivar los quistes en un lapso de 10 minutos (EPA, 2000). Los quistes de *Giardia* son bastante resistentes al cloro y muchos brotes se han asociado a los sistemas de potabilización del agua que utilizan solamente métodos a base de cloro. El agua sometida a una adecuada sedimentación, cloración y filtración generalmente esta libre de quistes de *Giardia* (Madigan *et al.*, 1999).

Patogenicidad. La dosis mínima infectiva para *Giardia lamblia* se considera en el rango de 10 – 100 quistes, sin embargo en algunos casos la ingestión de un solo quiste puede causar la enfermedad (FDA, 2005; Bitton, 1999).

Enfermedad. La enfermedad causada por *Giardia* es llamada giardiasis, la cual es una forma de gastroenteritis aguda. El periodo de incubación es usualmente de 1 - 2 semanas teniendo un promedio de 7 días, después de la ingestión del quiste.

Normalmente la enfermedad dura de 1 – 2 semanas, pero hay casos de giardiasis crónica que puede durar meses o años (FDA, 2005; Wiley, 1998). La severidad del cuadro clínico varía considerablemente y solamente cerca de un cuarto de la población tiene síntomas. En los casos sintomáticos las características principales una diarrea acuosa y maloliente, y calambres abdominales, flatulencia, náuseas y malestar. La ausencia de sangre o mucus en las heces, y el olor hediondo de la diarrea ayuda a la diferenciación de esta enfermedad de las diarreas de origen bacteriano o vírico (Maier *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 1999; Wiley, 1998).

Figura 3. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.



Fuente: Maier *et al.*, 2000.

Prevalencia y brotes. La giardiasis es una parasitosis de distribución mundial, encontrada comúnmente en climas cálidos, sobre todo en ríos, lagos, estanques y arroyos. Afecta con mayor frecuencia a los niños, pudiendo retardar su crecimiento y desarrollo por deficiencia nutricional (Maier *et al.*, 2000). La giardiasis es la causa más frecuente de diarrea por causas no bacteriales en América del norte (FDA, 2005). Aunque los casos pueden ocurrir de forma esporádica los brotes han sido bien documentados. Durante el período 1991 – 2000 *Giardia* fue identificado como agente causal de 9.4% (10 de 106) de los reportes de brotes asociados con agua recreacional y del 16.2% (21 de 130) de los reportes de brotes asociados con agua de beber (CDC, 2005).

2.2.6 *Listeria spp.*

Es una bacteria Gram positiva aeróbica, microaerófila, anaerobia facultativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, con morfología de coccobacilos (0.4, 0.5 a 2µm) (Novak, 2003). Es considerada un organismo obicuo, que puede ser aislado de diferentes fuentes del medio ambiente (superficies de agua, suelo, agua tratada, mamíferos, aves, peces, insectos y material vegetativo), además se encuentra en altas concentraciones en aguas residuales, que por escurrimiento llega a fuentes de agua para riego, aumentando la probabilidad de contaminar los cultivos (Garrec *et al.*, 2003).

Brotes y Enfermedad. La listeriosis humana es una enfermedad esporádica que se encuentra a lo largo de todo el año, con un pico de incidencia en los meses más cálidos. Las epidemias han sido asociadas al consumo de alimentos cocinados contaminados y vegetales crudos sin lavar (Murray *et al.*, 1997). Entre los síntomas ocasionados con esta bacteria se presentan diarrea, fiebre y dolor muscular. Puede causar serias complicaciones si no se atiende a tiempo, como septicemia y daño al sistema nervioso central (meningoencefalitis, encefalitis) (Novak, 2003).

Taxonomía. El género *Listeria* contiene 6 especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, y *L. grayi*. De estas especies *L. grayi* y *L. ivanovii* cada una contiene dos subespecies. Son bacterias hemolíticas, patógenas intracelulares facultativas, *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* son patogénicas para los ratones y otros animales. Sin embargo, solamente *L. monocytogenes* se asocia comúnmente a la listeriosis humana. La listeriosis asociada a la infección por *L. ivanovii*, e incluso por *L. seeligeri* es extremadamente rara en humanos (FDA, 2003).

Ciclo de vida. Este microorganismo tiene la habilidad de crecer y sobrevivir en diferentes condiciones, su distribución mundial hace que se considere una bacteria cosmopolita. Una de las propiedades más importantes es la resistencia intrínseca en el medio ambiente, ya que su crecimiento se establece dentro de rangos amplios de pH (4.5 a 9), baja concentración de oxígeno, temperatura (0 a 45°C), por esta última característica es considerado un organismo psicotolerante. Pero no solamente tiene la capacidad de desarrollarse a temperaturas de refrigeración, de igual manera, a altas concentraciones de solutos en diferentes alimentos ahumados (Copes *et al.*, 2002).

Patogenicidad. La contaminación de cuerpos de agua con *Listeria spp.* ocurre principalmente por escurrimientos de agua residual y heces de ganado vacuno, iniciando así el mecanismo de transmisión, que después llegan a la superficie de las hortalizas y subsecuentemente hacia el hospedero de la bacteria (Al-Ghazali y Al-Azawi, 1990). Garrec *et. al.*, (2003), demostraron que *Listeria spp.* Sobrevive por largo tiempo en tanques de agua para uso agrícola y hacen evidente que existe la posibilidad de encontrarse de manera viable pero no cultivable, así como mencionan que el agua no tratada es un reservorio natural de este microorganismo.

Existen diferentes estudios donde se ha comprobado la resistencia de esta bacteria a las condiciones adversas extremas, tal es el caso reportado por Szabo

et al., (2003), donde observaron la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en lechuga congelada, reportan que fue evidente su desarrollo a 8° C con un crecimiento de dos unidades exponenciales, es decir, un incremento de 1 a 100, aún encontrándose a bajas concentraciones de oxígeno.

2. 3 Transporte de microorganismos en Agua

El conocimiento del transporte de las bacterias en acuíferos proporciona información útil en 1) el transporte de los organismos patogénicos, 2) el transporte facilitado de contaminantes orgánicos por las bacterias móviles, 3) el movimiento de las bacterias genéticamente diseñadas que pueden ser inyectadas en un acuífero para bioremediación, y 4) los procesos implicados en la recuperación de petróleo (Bitton, 1999).

Una vez que los microorganismos son liberados al medio ambiente, su destino se sujeta a las condiciones de ese ambiente. El factor más inmediatamente evidente es que los organismos se dispersan conforme son añadidos al agua o suelo. El movimiento de los microorganismos liberados es facilitado por el flujo de agua, que puede ser superficial o subterránea (Hurst *et al.*, 2002).

Además de las características hidrológicas del acuífero (ejemplo, la porosidad, conductividad hidráulica), varios factores fisicoquímicos y biológicos afectan el transporte de bacterias y virus en los acuíferos. Los factores fisicoquímicos comprenden advección, dispersión, filtración y adsorción - desorción. Mientras que los factores biológicos comprenden la supervivencia y crecimiento, tamaño de la célula, y la habilidad de adsorción a las superficies (Bitton, 1999).

El transporte a través del agua se ve influenciado por la densidad y tamaño de partícula. Partículas pequeñas y de baja densidad viajan más lentamente que

partículas grandes y con alta densidad. La baja densidad de los microorganismos (1.1 gr. /cm^3) y su tamaño pequeño ($1\text{-}2 \text{ }\mu\text{m}$), determina que una vez que son arrastrados, estos permanecerán en suspensión. También es de esperarse que un microorganismo libre viaje más rápido que aquellos que se encuentren unidos a cualquier partícula (Tyrrel y Quinton, 2003).

Sin embargo, en los flujos superficiales, existe la tendencia de los microorganismos a adsorberse en partículas suspendidas lo que facilita la sedimentación. La sedimentación ocurre cuando la densidad de los microorganismos es mayor al medio líquido y las velocidades del flujo son lo suficientemente bajas. Estos sedimentos pueden servir como depósitos de microbios, pero cuando hay flujo turbulento las corrientes pueden resuspender los microbios asociados a las partículas (Hurst *et al.*, 2002; Maier *et al.*, 2000).

En la adhesión de los microorganismos a las partículas sólidas se deben considerar una variedad de interacciones entre la superficie celular y el medio poroso. Los factores claves de la superficie de la célula que influyen la adherencia son la carga y la hidrofobicidad. La adhesión de los microbios a las partículas de suelo requiere de una interacción inicial entre la célula y la superficie de la partícula, esta interacción inicial puede ocurrir de tres maneras: difusión, transporte por convección o por movimiento activo de la célula. En general, las interacciones electrostáticas son repulsivas porque tanto la célula como la superficie de la partícula están cargadas negativamente. En contraste, las interacciones hidrófobas y las fuerzas de van der Waals tienden ser atractivas. Así la adhesión inicial ocurre cuando las fuerzas atractivas superan a las repulsivas. (Maier *et al.*, 2000).

Otro mecanismo por el cual el transporte de los microorganismos se ve limitado es por la filtración de las células por pequeños poros. La filtración en el suelo arenoso tiene relativamente poco impacto en la retención de las bacterias de $0.3 \text{ -- } 2 \text{ }\mu\text{m}$. Sin embargo, en un suelo que contiene una porción significativa de arcilla o

sedimento (con partículas de un diámetro de 0.2 – 50 μm , la filtración será el mecanismo de mayor remoción de células. En contraste las partículas de menos de 50 μm de diámetro, como las partículas virales, han mostrado que la filtración tiene poco efecto en su movimiento (Maier *et al.*, 2000).

El pH de la solución de la matriz dentro de un medio poroso no parece tener un efecto grande en el transporte bacteriano. Sin embargo, el transporte viral puede variar grandemente dependiendo del pH de la solución del medio poroso. La diferencia del impacto en el transporte de bacterias y virus puede deberse a una serie de factores uno de ellos es que las bacterias tienen superficies químicamente diversas, así un cambio en el pH no se espera que cambie la carga superficial neta. Finalmente, las cargas totales en la superficie de bacterias y virus se verán afectadas de forma diferente por los cambios de pH, lo que puede ser expresado en términos del punto isoelectrico. Así para la mayoría de las bacterias el pI (punto isoelectrico) esta entre 2.5 a 3.5 y en general, los suelos con un $\text{pH} < 5$ tienden a favorecer la adsorción de virus (Maier *et al.*, 2000).

2. 4 Introducción a los modelos

Para tomar las decisiones que continuamente se requieren, se acude a los modelos mentales. No obstante estos modelos mentales no siempre acercan a la solución de un problema, ya que presentan ciertas desventajas como el hecho que no son fáciles de entender por otras personas, las interpretaciones a menudo difieren y las asunciones en las cuales están basadas usualmente son difíciles de examinar (García, Curso de Creación de Modelos; Sterman, 1991).

Por su parte, los modelos computacionales están enunciados de una manera explícita; el lenguaje matemáticos que se emplea para la descripción del modelo no deja lugar a la ambigüedad. Un modelo de dinámica de sistemas es más explicito que un modelo mental y, por tanto, puede ser comunicado sin

ambigüedad. Las hipótesis sobre la que se ha montado el modelo, así como las interrelaciones entre los que lo forman, aparecen con toda claridad en el mismo, y son susceptibles de discusión y revisión (García, Curso de Creación de Modelos).

Los modelos computacionales matemáticos han sido usados desde hace tres décadas, se realizan para analizar todo tipo sistemas desde inventarios de corporaciones, el diseño de economías nacionales, interaccionar en el crecimiento de la población mundial, de recursos, comida, población, recursos en general. Como el uso de las computadoras ha sido más común, y estas más rápidas, los modelos computacionales se han utilizado para pronosticar y analizar los sistemas (Stermán, 1991).

Un modelo debe de tener un claro propósito, y este propósito debe de resolver un problema en particular. Un claro propósito es el ingrediente más importante para tener éxito al realizar modelos. Por supuesto, un modelo con un objetivo puede tener errores, y a la vez sea difícil de comprender. Pero un propósito claro permite que los usuarios de los modelos puedan realizarse preguntas que les revelen si el modelo es útil para solucionar el problema bajo consideración (Stermán, 1991).

Cada modelo es la representación de un sistema –un grupo de funciones interrelacionando elementos formando un todo-. Pero para que el modelo sea útil este debe de tener direcciones específicas del problema y debe ser lo mas simple, procurando detallar por parte todo el sistema. Hay muchos tipos de modelos, y ellos pueden ser clasificados en muchas formas. Los modelos pueden ser estáticos, dinámicos, matemáticos, físicos, al azar o exactos. Una de las clasificaciones más usuales, sin embargo, es la que divide los modelos en los que simulan y los que optimizan (Stermán, 1991).

Un modelo de optimización típico incluye tres partes. La función *objetivo* que especifica la meta, la decisión de la *variable*, que son las opciones que se van a realizar y las *constantes* las cuales restringen las opciones de la decisión variable. Los modelos de optimización son válidos para hacer declaraciones preceptivas. Y

son validos para pronosticar solo si hace lo óptimo, si se toma la decisión más correcta (Stermán, 1991).

Los modelos de simulación son para realizar análisis de tipo descriptivos, un modelo de simulación no calcula el que “debería hacerse” para el alcance de un objetivo, pero clarifica el “que sucedería” en una situación. El propósito de las simulaciones es que pueden prever (predecir el como el sistema puede comportarse en un futuro bajo las decisiones asumidas) o prevenir (diseñando nuevas estrategias de manejo u organizando estructuras y evaluando sus efectos en el comportamiento del sistema). De esta manera se puede decir que el propósito de un modelo de simulación es imitar al sistema real, para que su comportamiento pueda ser estudiado. El modelo es una réplica de laboratorio del sistema real, un mundo en miniatura (Morecroft, 1983).

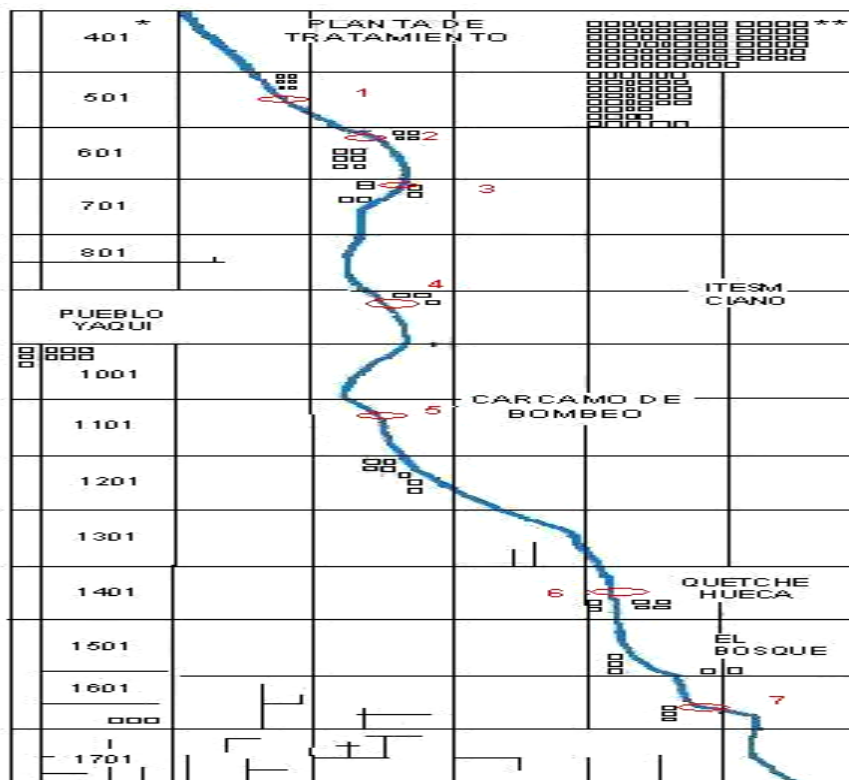
Los modelos de simulación tienen limitaciones, ya que cualquier modelo es tan efectivo como sus asunciones. En el caso de los modelos de simulación, las asunciones consisten en la descripción física del sistema y las reglas de decisión. La representación adecuada de lo físico en el sistema no es el problema; en el ambiente físico puede ser olvidado cualquier detalle, y este afectaría el propósito del modelo (Stermán, 1991).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización de la zona de muestreo

La selección de los puntos se realizó en base a la presencia de viviendas en la zona y también se tomó en cuenta la distancia existente entre cada punto de muestreo. Se determinaron en total siete puntos de muestreo, de los cuales el punto número uno corresponde a la salida de la planta tratadora de agua residual sur, y los seis puntos restantes corresponden al trayecto del canal bajo hacia la costa. En la figura 4 se muestran en círculos los lugares seleccionados.

Figura 4. Ubicación de los puntos de muestreo en el recorrido del canal principal bajo



* En la parte izquierda del mapa se indican las calles en las que se encuentra la zona de muestreo.

** Los cuadros encontrados en el mapa (□) son indicaciones de viviendas.

3.2 Estimación de la concentración de microorganismos en la mezcla del ARMT y el agua del canal bajo

Para la determinación de los microorganismos de cada punto muestreado (carcamo o salida de la planta y canal bajo), se realizó una estimación conforme al volumen sembrado en los medios de cultivo.

Para la determinación del nivel de mezclado del agua residual tratada con el agua del canal bajo se realizó una mezcla hipotética de las aguas a distintos gastos, esto debido a que el canal bajo maneja diferentes caudales dependiendo de la época del año y de si hay sequía. Los gastos (caudales) que maneja el canal principal bajo fueron proporcionados por el distrito de riego del Valle del Yaqui, donde manejan volúmenes de $0.5 \text{ m}^3/\text{s}$ hasta $100 \text{ m}^3/\text{s}$, y en la planta tratadora se maneja un gasto de 0.5 m^3 , que se considera constante.

Para el balance de masa se tomaron las concentraciones más altas de microorganismos obtenidas en los diversos muestreos, (tanto del efluente de la planta tratadora, como del canal) ya que lo que se pretende es calcular el máximo riesgo. El balance de masa se calculó de la siguiente manera: La concentración de la solución (de la mezcla) = $(\text{flujo 1} \times \text{concentración 1} + \text{flujo 2} \times \text{concentración 2}) / \text{suma de los flujos}$. Donde el flujo 1 y concentración 1 corresponden a la salida de la planta tratadora y el flujo 2 y concentración 2 corresponden al canal bajo. Y con ayuda de los programas Excel 2002 y Vensim PLE 32 Versión 3.0 se calculó la concentración que tendría la solución a diferentes gastos del canal bajo. El esquema para determinar la concentración de microorganismos en mezcla con el programa Vensim se muestra en la figura 5.

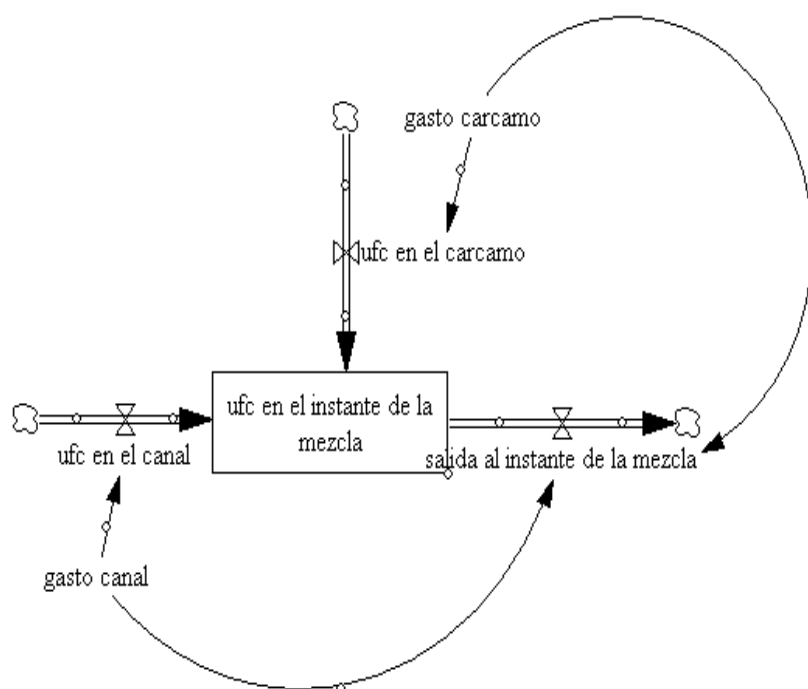


Figura 5. Esquema de la mezcla Canal – ART en Vensim

3.3 Preparación de medios y reactivos

Los medios de cultivo fueron adquiridos de manera comercial y se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

3.3.1 Medio para *Clostridium perfringens*

- Agar mCP, (Acumedia). Se pesaron 71.1 gr. de medio, y agregó 900 ml de agua destilada, el medio se dejó hervir por 1 minuto y esterilizó en autoclave a 121° c por 15 min., antes de agregar las soluciones se dejó enfriar el medio a una temperatura aproximada de 50° C, una vez enfriado se agregó asépticamente 0.4 gr. de D-cicloserina, 0.025 gr. sulfato de polymixin-B, 2ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ al 4.5% esterilizado con filtro, 20 ml de fenolftaleína difosfato al 0.5% esterilizada por filtro y 80 ml de indoxyl- β -D

glucosido al 0.075%. Todos los componentes se mezclaron y se depositó el agar a cajas de petri.

3.3.2 Medios para el Colifago (MS-2)

- Caldo de triptocaseína de soya (TSB, DIFCO). Para preparar el caldo se suspendieron 30 gr. del polvo (TSB) en 1 litro de agua purificada, el caldo mezcló y calentó hasta la completa disolución. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 min.
- Agar de triptocaseína de soya (TSA, DIFCO). Se suspendió 30 gr. de TSB en 1 litro de agua purificada y añadió 10 y 15 gr. de agar bacteriológico, para obtener TSA al 1 y 1.5% respectivamente, el cual fue utilizado para las cajas de petri y para los tubos.

3.3.3 Medio para Coliformes fecales

- Agar mFC (Difco, Detroit, MI). Se pesaron 52 gr. en una balanza (OHAUS) y se disolvieron en 1 lt de agua destilada. Se calentó agitando frecuentemente e hirvió durante 1 minuto para lograr una homogenización completa. Se agregaron 10 ml de una solución 1% de ácido rosólico en 0.2N NaOH. El medio no se esterilizó, ya que así se indica. Antes de vaciar el medio en cajas de petri estériles se dejó enfriar.

3.3.4 Soluciones para *Giardia* y *Cryptosporidium*

Para la técnica de *Giardia* y *Cryptosporidium* se requirió preparar una serie de soluciones que se mencionan a continuación:

- Solución buffer de Formalina al 10%. Se disolvieron 0.762 gr. de fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4), 0.019 gr. de fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4), en 100 ml. de la solución de formalina en agua a un volumen final de 1 litro.
- Buffer de fosfatos salino (PBS). Se preparó una solución patrón a 10X, disolviendo 80 gr. de NaCl, 2 gr. de fosfato dibásico de potasio (KH_2PO_4), 29 gr. de fosfato monobásico de sodio duodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) y 2 gr. de cloruro de potasio (KCl) en agua y aforo a un volumen final de 1 lt. La solución de 10X es utilizada para preparar 1X de PBS diluyendo 1 volumen de la solución de 10X con 9 volúmenes de agua y ajustando el pH a 7.4 ± 0.2 .
- Solución Patrón de dodecil sulfato de sodio al 1% (SDS). Para la solución patrón se requirió disolver 1 gr. de SDS en agua a un volumen final de 100 ml.
- Solución Patrón de Tween 80 al 1%. Para la solución de Tween se mezcló 1 ml de monoelato de polioxietilensorbitan 80 (Tween 80) con 99 ml de agua destilada.
- Solución de elución (Solución buffer detergente). La solución se preparó mezclando 100 ml de SDS al 1%, 100 ml de Tween 80, 100 ml de PBS10X y 1 ml de antiespumante con 500 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a

7.4 usando un potenciómetro, la solución se aforo a un volumen final de 1 litro.

- Solución de flotación Percoll - sacarosa. Con una densidad de 1.10. Se mezclaron 45 ml de Percoll (densidad 1.13) en 45 ml de agua y 10 ml de solución de sacarosa al 2.5 M. Se revisó la densidad con un densímetro. La densidad debía estar en el rango de 1.09 a 1.1 (No se use si es menor de 1.09). Esta solución se almacenó a 4° C, y antes de usarse se colocó a temperatura ambiente.
- Serie de etanol- glicerol. Las series de etanol – glicerol se prepararon de acuerdo a la tabla 3.

Tabla 3. Proporción utilizada para la preparación de las series de etanol – glicerol.

SERIES DE ETANOL- GLICEROL				
95% etanol (ml)	Glicerol (ml)	Agua Destilada (ml)	Volumen Final (ml)	% final de Etanol
10	5	80	95	10 %
20	5	70	95	20%
40	5	50	95	40%
80	5	10	95	80%
95	5	0	100	90.2%

Fuente: Shay *et al.*, 1990.

- Kit A 100 FL AquaGlo G/C para la detección simultánea de inmunofluorescencia de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de agua. La muestra se colocó a una concentración de 1X, ya que normalmente viene a una concentración de 20X. Además el kit se almacenó de 2-8° C y guardaba después de cada uso.

- Albúmina Suero de Bovino (BSA) al 1%. Se requirió agitar 1 gr. de cristales de (BSA) sobre 85 ml de solución 1X PBS, con un pH de 7.4 y agitó. Disuelto el BSA, se procedió a ajustar a un volumen de 100 ml con PBS. Se filtró a través de una membrana de 0.22 micras dentro de un frasco estéril y por último la albúmina se guardó a 4° C.

3.3.5 Medios para *Listeria spp.*

- Listeria Caldo Base de Enriquecimiento (UVM) (OXOID, CM0863). Se añadieron 27.2 gr. de UVM a 500 ml de agua destilada; posteriormente se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 minutos, se dejó enfriar hasta 50° C y se agregó asépticamente el contenido de un vial, de suplemento selectivo de enriquecimiento SRO143E (OXOID). Se mezcló bien y se distribuyó en recipientes estériles.

Vial SRO143E

Se agregaron 2 ml de agua destilada al vial, se mezcló bien y se depositó en los 500 ml de UVM CM0863.

- Caldo Base Fraser (OXOID, CM0895). Se disolvieron 28.7 gr. en 500 ml de agua destilada, se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 minutos; el caldo se dejó enfriar hasta aproximadamente a 50° C y se agregó asépticamente el contenido de un vial de suplemento Fraser (SRO156E).

Vial SRO156E

Se agregaron 5ml en una proporción 1:1 etanol – agua destilada, se mezcló y se depositó el vial en los 500 ml, se agitó y se distribuyó en medios estériles.

- Agar Base selectivo de *Listeria* (CMO856). Se añadieron 27.75 gr. a 500 ml de agua destilada, se llevó a ebullición hasta disolución completa, para una posterior esterilización en autoclave a 121° C por 15 minutos. El medio se enfrió a 50° C y se le agregó el contenido de un vial previamente reconstituido de *Listeria* suplemento selectivo SR140, se mezcló bien y colocó en cajas petri estériles.

Vial SR140

Se agregaron 5 ml de etanol al 70%, se mezcló hasta disolución, y agregaron a los 500 ml de CMO856, se mezcló el contenido del vial con el medio el cual se vació en cajas petri.

3.4 Análisis y recolección de muestras

La recolección de las muestras para *Clostridium perfringens*, colifagos, coliformes fecales, *Listeria spp.*, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* (los dos protozoarios se muestrearon de esta manera solo en la salida de la planta tratadora) se realizó de la siguiente manera: en la salida de la planta tratadora se tomó una cantidad aproximada a un litro de muestra, la cual se colocó en un envase plástico estéril, se anotó la hora de muestreo, número de muestra y el envase se colocó dentro de una hielera. Mientras que para las muestras del canal bajo se necesitó de un recipiente que tenía una cuerda amarrada a un extremo, esto con el fin de arrojar el recipiente y tomar la muestra del agua que estaba en circulación y no la que estaba estancada en las orillas. Después de tomar la muestra del canal se llenaron los envases de plástico estériles, se anotaron los datos de la muestra como hora, número de muestra, y temperatura, y por último los envases se colocaron en la hielera.

3.4.1 Cuantificación de *Clostridium perfringens*

La cuantificación de *Clostridium perfringens* se llevo a cabo por el método de filtro de membrana descrito por Bisson y Cabelli (1979) entre otros, el cual consiste en:

Someter la muestra de agua a un choque térmico, que consiste en poner la muestras a una baño maría por 20 minutos a 70°C, para estimular la esporulación, dicha muestra se filtró e hizo pasar por membranas de 0.45 µm. Las membranas son colocadas en cajas de petri con medio mCP, a su vez las cajas fueron transferidas a una jarra anaerobia, en la cual se incubaron por 24 horas a 45° C. Las colonias amarillas que cambian a rosa-rojo después de ser expuestas a NH₄OH son de *Clostridium*.

3.4.2 Cuantificación del colifago MS-2.

La cuantificación del colifago se llevó a cabo por la técnica de doble capa de agar, (Adams, 1959; Pepper *et al*, 1995) donde se inoculó un frasco, conteniendo de 25-50 ml de caldo triptocaseína de soya (TSB, por sus siglas en inglés), con la bacteria hospedadora, *E. coli* ATCC 15597. Se Incubó el frasco inoculado, a 36° C por un intervalo de 3-4 horas, para que la bacteria alcanzara la fase exponencial. Se prepararon diluciones del agua a tratar, utilizando una nueva pipeta para cada dilución, o una punta nueva si se utilizan micropipetas.

El agar contenido en los tubos (TSA al 1% de agar) se fundió y los tubos colocaron en un baño a 48-50° C. A los anteriores se les añadió 0.5 ml de *E. coli* en fase logarítmica y de 0.1 a 1 ml de la muestra de agua. Se agitaron los tubos en un vortex y se pasó a las cajas con TSA, las cajas se invirtieron e incubaron a 37° C por 24 horas. Una vez formada la monocapa se contaron las placas líticas en donde hubo lisis de la bacteria.

3.4.3 Cuantificación de Coliformes fecales

La técnica utilizada para la cuantificación de coliformes fecales fue la de extensión en placa y filtración (APHA, 1998). Una vez obtenida la muestra, se hicieron diluciones; en la técnica de extensión en placa (figura 6) se pasó 1 ml de la muestra a una placa con agar, ya depositada la muestra, con una varilla flameada con alcohol, se extiende por toda la placa la muestra, las cajas se incubaron a una temperatura de 44.5 °C. En la técnica de filtración se hizo pasar la muestra por membranas de 0.45 µm, las membranas se colocaron en el las cajas, las cuales se incubaron a 44.5 °C.

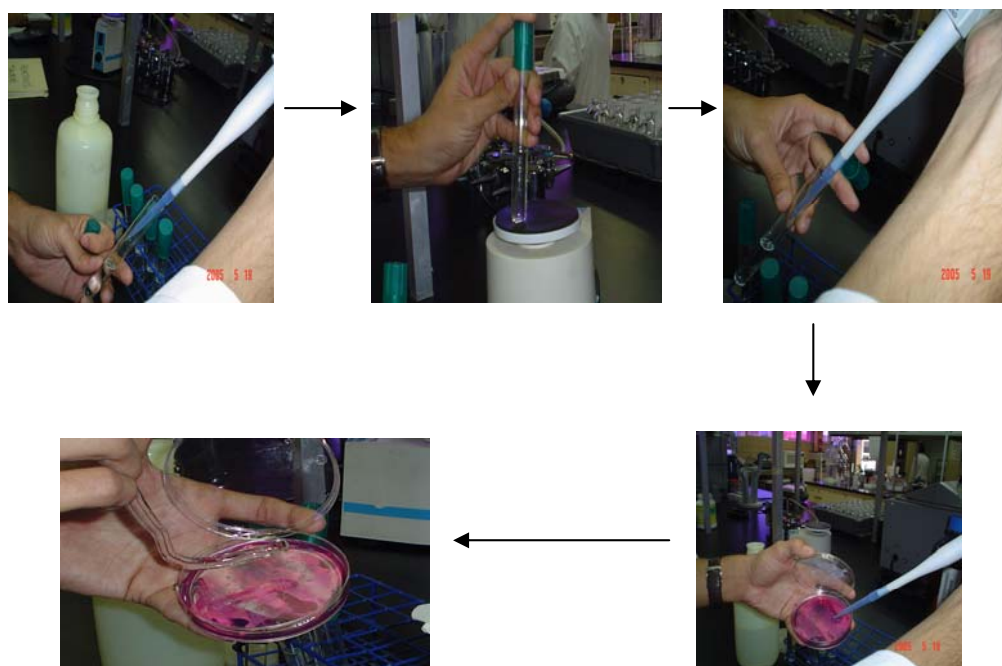


Figura 6. Cuantificación de coliformes fecales por extensión en placa.

3.4.4 Cuantificación de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*

Las muestras se procesaron de acuerdo con el procedimiento de anticuerpos fluorescentes descrita en el ICR Microbial Laboratory Manual (Shay *et al.*, 1990).

a) Recolección de la muestra.

Se conectó el equipo que consta de mangueras, conectores, bomba, portafiltros, el filtro y un medidor de agua que va a ser muestreada. Antes de pasar la muestra a través del filtro se revisó el medidor. Una vez que paso el volumen de agua requerido, se desconectaron los aparatos muestreadores, y se anotó la hora, fecha de muestreo y volumen total de muestra. Las muestras se transportaron en hielo al laboratorio para ser analizadas.

b) Elución del filtro y concentración.

El análisis del filtro se realizó antes de 96 horas, después de la recolección. El filtro se removió del recipiente y se colocó en papel aluminio para cortarlo a lo largo con una navaja. Se tomó la mitad más sucia del filtro y deshebro manualmente. La mitad más sucia fue colocada en una cubeta con solución eluyente y agitó por 15 minutos. La misma operación se realizó con la otra mitad del filtro.

La solución de elución se colocó en botellas de centrífuga, el filtro deshebrado es descartado, se realizó una operación de balanceo antes de centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue aspirado y descartado, para combinar los sedimentos; las botellas se enjuagaron con solución eluyente. La operación de centrifugación, se repitió hasta que el sedimento pudo ser contenido en tubos de 50 ml. El sobrenadante se descartó y resuspendió en un volumen igual de formalina al 10%. La muestra se marcó con el volumen final (sedimento + formalina), y guardó a 4°C hasta realizar la flotación.

c) Flotación y Purificación del sedimento.

Se determinó la cantidad de sedimento a ser flotado, no es recomendable exceder los 0.5 ml de sedimento (pellet) / 1 ml de formalina. El sedimento fue colocado en un tubo limpio y se resuspendió con solución eluyente a un volumen final de 20 ml. A la muestra se le agregaron 30 ml de percoll -sacarosa, a temperatura ambiente, cuidando que dicha solución quedara en la parte inferior del tubo. Después de agregarle la solución se llevó a cabo una centrifugación a 2800 rpm

por 10 minutos, donde se colectó la porción de 20 ml de encima de las muestras y 5 ml debajo de la interfase con una pipeta de 25 ml. La muestra se colocó en un tubo de centrifuga de 50 ml limpio y llevó a un volumen final de 50 ml con solución de elución, hecho lo anterior se llevo a cabo una nueva centrifugación a 2800 rpm por 10 minutos, donde se aspiró la capa de encima dejando 5 ml sobre el sedimento, por último se registró el volumen y datos de la muestra.

d) Prueba de inmunofluorescencia

Antes de empezar con la prueba todos los reactivos fueron puestos a temperatura ambiente. El soporte y el filtro de membrana se remojaron con PBS 1X y se colocó el filtro en el soporte. Al llevarse a cabo la filtración se cuidó que la presión de vacío no excediera de 2-4 pulgadas de Hg., cada membrana se lavó con 2 ml de BSA al 1%.

Las llaves de paso del soporte se cerraron bien y apagó la bomba para añadir 0.5 ml del anticuerpo a cada muestra, las muestras se cubrieron e incubaron por 25 minutos. Una vez pasado el tiempo de incubación se dejó pasar el exceso de anticuerpo y lavó con 10 ml de PBS 1X. Posteriormente se enjuagaron las muestras con series de etanol-glicerol, agregando 1 ml de dilución por muestra empezando con la de 10, 20, 40, 80 y 90.2%, teniendo cuidado de drenar el etanol completamente entre diluciones.

El filtro se removió y colocó en un portaobjeto que contenía una gota de DABCO – glicerol, previamente incubado a 37°C por 20 minutos, ya colocado el filtro en el portaobjetos se añadió una nueva gota de DABCO-glicerol y se incubó de nuevo por 20 minutos. Después de la incubación se colocó un cubreobjetos, y se sellaron los bordes con barniz claro. Las muestras se colocaron en refrigeración y se leyeron en un período menor de 5 días.

3.4.5 Identificación de *Listeria spp.*

La técnica empleada fue la de APHA, (1998). Se tomaron 100 ml de muestra de agua, y colocaron en 200 ml de caldo de enriquecimiento UVM, el caldo con la muestra se sometió a incubación a 30° C por 24 horas; pasado este tiempo se tomo 1 ml de la muestra-UVM y colocó en 10 ml de Caldo Base Fraser e incubó por 48 horas a 35° C, por último se sembró en medio Oxford (figura 7).

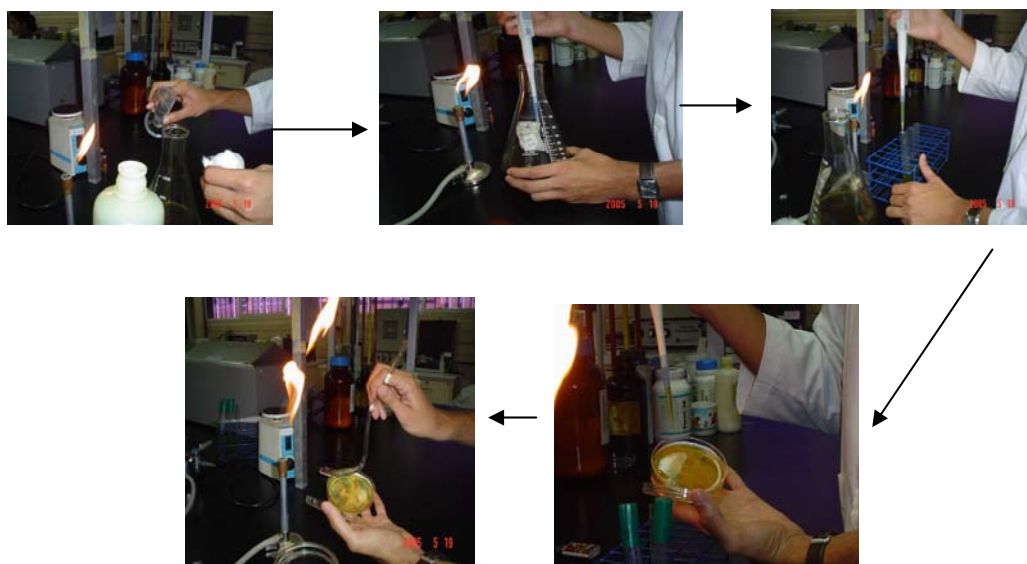


Figura 7. Identificación de *Listeria spp.*

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al momento de realizar la simulación de la mezcla entre las aguas del canal bajo con la del carcamo de bombeo, se manejaron diferentes gastos en los programas, estos fueron en base a los volúmenes mínimos y máximos que puede captar el canal bajo. Mientras que el gasto de la salida de la planta se tomó como constante.

4.1 Coliformes Fecales

Se realizaron seis muestreos para coliformes fecales en cinco diferentes meses del año. En los días de muestreo se realizó la siembra de coliformes fecales en su medio correspondiente, en cada punto se realizaron repeticiones y los resultados se muestran en la Tabla 4.

Los datos obtenidos para coliformes en la salida de la planta, están muy por encima de los valores esperados, ya que se esperaría que los efluentes de la planta estén en un margen de 1000 UFC /100ml (10 UFC /ml). Las concentraciones de coliformes fecales están en el mismo orden de magnitud que aquellas encontradas anteriormente en el agua residual sin tratar (ARST) reportadas en otros estudios (Gortáres *et al.*, 2001b). Por el contrario, los puntos muestreados en el canal no exceden los límites máximos permisibles de coliformes fecales antes mencionados. Este exceso de coliformes fecales puede ser atribuido a que los métodos implementados para depurar el agua en la planta de tratamiento son insuficientes.

Como se muestra en la Figura 8, la concentración de coliformes fecales en la mezcla hipotética de las aguas (ART y agua del canal) está muy por encima de la norma, y resulta insuficiente el gasto máximo en el canal (99.5 m³) para lograr

disminuir la carga de coliformes fecales. La concentración a la cual se logra disminuir las coliformes es de 123296 UFC/ 100 ml, que es cuando se da un gasto al canal de 99.5 m³ y 0.5 m³ del carcamo. Así cuando el gasto del canal sea el mínimo (es decir, de 1 m³ cúbico donde 0.5 serían de ART y 0.5 del canal), se tendrá una concentración en la mezcla de 12, 250, 400 UFC/ 100 ml. Por lo que el agua no es recomendada para consumo directo. Sin embargo, según estudios realizados por Gortarés *et al.*, (2001b) indican que al regar vegetales con agua con una concentración coliformes fecales entre 220 y 17, 000,000 NMP / 100 ml, no se encontró una diferencia significativa en la calidad microbiológica de los vegetales regados con estas aguas.

Tabla 4. Concentración de Coliformes Fecales en muestras de agua del canal y salida de la planta.

Fecha	Salida planta UFC/ml	Canal UFC/ml
16 febrero	16,300	4.5
3 marzo	39,000	5
17 marzo	40,000	5
4 abril	30000	5.5
24 mayo	150,000	8
9 junio	245,000	6

Ahora si se analiza el caso hipotético donde a la salida de la planta se cumpliera con la norma, NOM-001-SEMARNAT-1996 en cuanto a coliformes fecales, y se grafica la máxima cantidad de microorganismos monitoreados en el canal (que fue de 8 UFC/ ml); se puede apreciar que se logra cumplir con la norma NOM-001-SEMARNAT-1996 al momento de la mezcla y se sigue disminuyendo la concentración de coliformes fecales, hasta un valor de 8 UFC / ml (800 UFC/100

ml), que es el valor máximo que se está obteniendo en las muestras del canal sin el agua mezclada con la del carcamo, como se observa en la Figura 9.

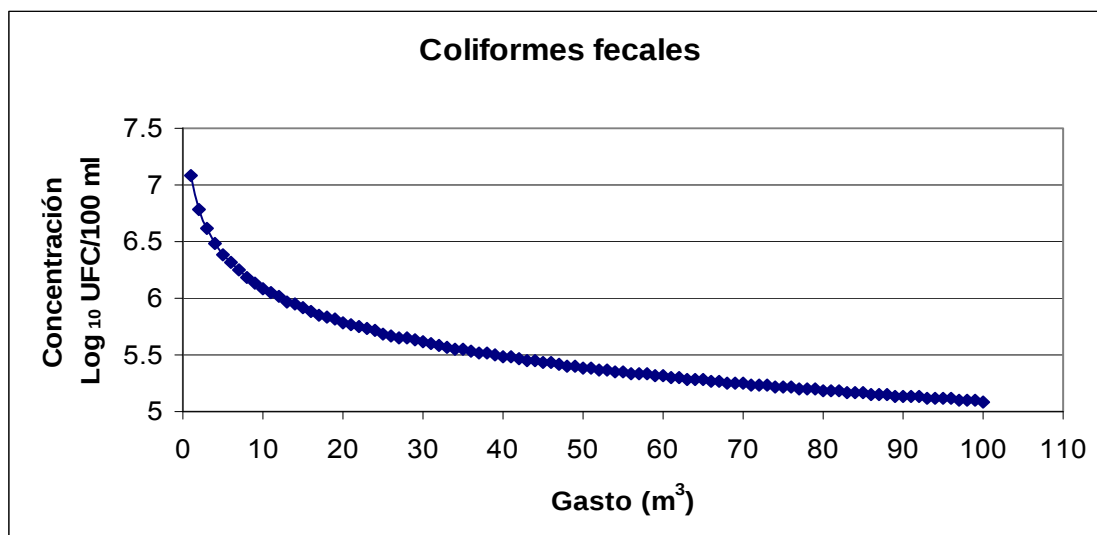


Figura 8. Concentración de coliformes fecales en la mezcla con diferentes gastos.

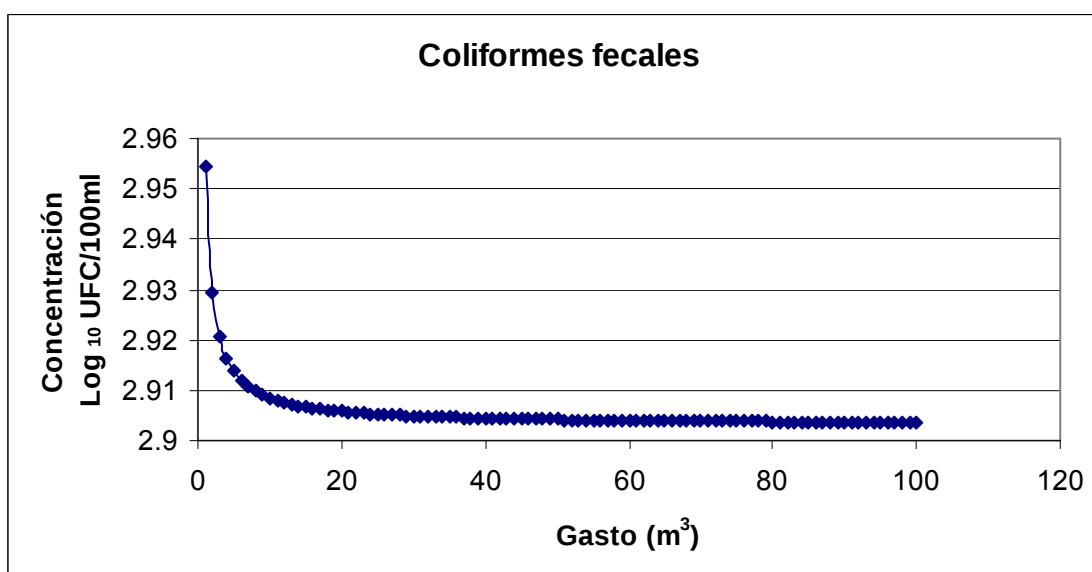


Figura 9. Concentración de coliformes fecales en la mezcla con diferentes gastos, en caso que se cumpliera con la norma NOM-001-SEMARNAT-1996.

4.2 Colifago (MS-2)

Los resultados de los análisis de bacteriófagos se presentan en la tabla 5 y en ella se puede observar la diferencia de concentraciones entre el ART y el agua proveniente del canal, donde en el agua del canal su presencia es menor al límite de detección, y la concentración máxima encontrada a la salida de la planta fue de 330500 UFP / 100 ml, la cual se encuentra en el mismo orden de magnitud que en estudios anteriores realizados en la región en donde Gortáres *et al.*, (2001a, b) encontraron una concentración media de 130,000 UFP/ 100 ml para el agua de la salida de la planta y para el agua de irrigación (agua del canal), estos investigadores obtuvieron concentraciones bajas de colifagos con 10 UFP / 100 ml.

Para el balance de masa realizado a diferentes gastos se tomó el dato mas alto obtenido en los diferentes muestreos, ya que lo que se pretende es calcular el máximo riesgo. En la figura 10 se muestra la concentración de colifagos en la mezcla de las aguas.

Tabla 5. Concentración del colifago (MS-2) en muestras de agua del canal y salida de la planta.

Fecha	Salida planta UFP/ml	Canal UFP/ml *
20 enero 2005	1276	<2.5
16 febrero 2005	1240	<2.5
4 marzo 2005	2800	<2.5
17 marzo 2005	2030	<2.5
24 mayo 2005	3305	<2.5

* Valores del límite de detección.

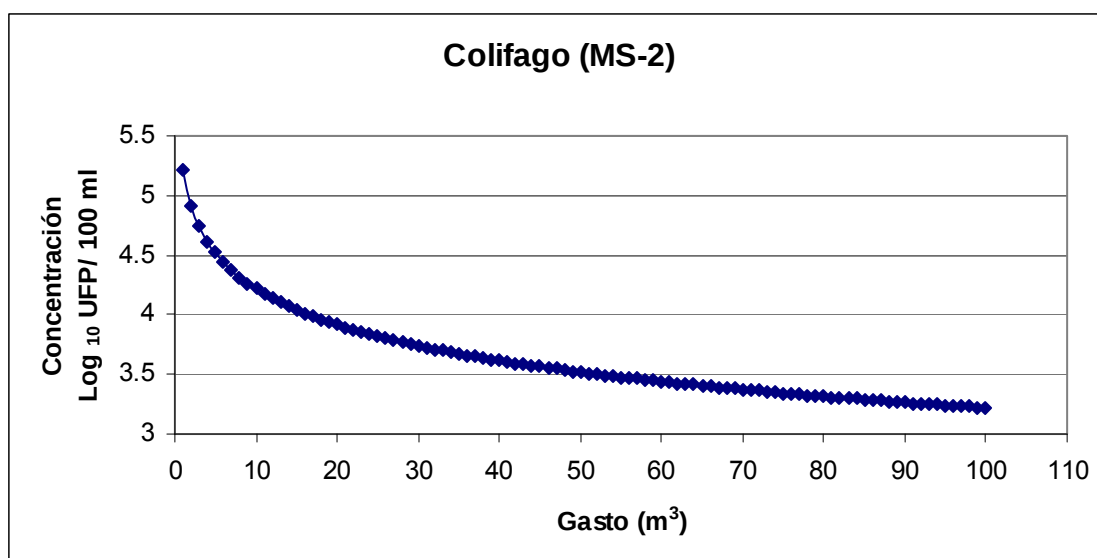


Figura 10. Concentración del colifago MS-2 en la mezcla, con diferentes gastos.

La mezcla del agua con el gasto mínimo de 1 m³ se tiene una concentración de 165250 UFP / 100 ml (lóg. ₁₀ 5.21 UFP / 100 ml) y a la máxima dilución en 100 m³ se baja la concentración del colifagos a 1652.5 UFP / 100 ml (que equivale a log. ₁₀ 3.21 UFP / 100 ml).

Los bacteriófagos han sido propuestos como indicadores de contaminación viral por su resistencia en los procesos de desinfección similar a la de los enterovirus; en estudios realizados por Kott *et al.*, (1973) encontraron que hay cerca de un virus entérico humano por cada 1000 fagos, lo que equivaldría a un aproximado de 16 virus entéricos en un litro, cuando se tiene un gasto de 100 m³. Si se toma en cuenta que la mayoría de los virus como el virus de la Hepatitis A o los Rotavirus requieren de una dosis infectiva baja de 10 – 100 partículas víricas (FDA, 2005), entonces puede haber una probabilidad de adquirir enfermedades virales al consumir directamente esta agua.

Sin embargo, en estudios realizados donde se irrigaron vegetales con agua residual sin tratar de una concentración promedio de colifagos en el mismo orden de magnitud, que la de la mezcla de agua al mínimo gasto, no se detectó en ninguno de los vegetales la presencia de colifagos. Lo que indica que si el agua

es utilizada para irrigar vegetales probablemente no causaría un impacto nocivo para la salud.

4.3 *Giardia lamblia*

Los resultados del análisis de *Giardia lamblia* se presentan en la tabla 6, como se puede ver en esta tabla, la concentración de quistes en la salida de la planta tratadora esta muy por arriba en comparación con la concentración de quistes en el canal. Para la muestra número dos del día diez de mayo se aprecia un aumento en la concentración de quistes de *Giardia* lo cual puede ser explicado porque en la toma de la muestra se tomo sedimento, es decir, al filtrar el agua del canal también se aspiró accidentalmente sedimento.

Los resultados mostrados en la tabla 6 coinciden con otras investigaciones (Gortáres *et al.*, 2001b) realizadas al ART de la planta sur, en donde se obtuvo una media de 12000 quistes / l, cifra similar a la obtenida en esta investigación.

Tabla 6. Concentración de *Giardia lamblia* en muestras de agua del canal y salida de la planta.

Fecha de toma de muestra	Punto muestreo	<i>Giardia lamblia</i> quistes / l
13 abril 2005	1 ^a	20161
28 abril 2005	1 ^a	20308
	2 ^b	1
10 mayo 2005	1 ^a	20274
	2 ^b	47.9
	7 ^b	0.16
24 mayo 2005	2 ^b	<0.1
	7 ^b	<0.1

^a El punto de muestreo 1 es la salida de la planta tratadora.

^b El punto de muestreo 2 y 7 pertenecen al canal bajo a diferentes distancias.

La figura 11 muestra la concentración de *Giardia lamblia*, en donde se tomó como base para graficar la máxima concentración de quistes / l en la salida de la planta, que fue de 20308 quistes / l ($\log_{10} 4.3076$ quistes / l).

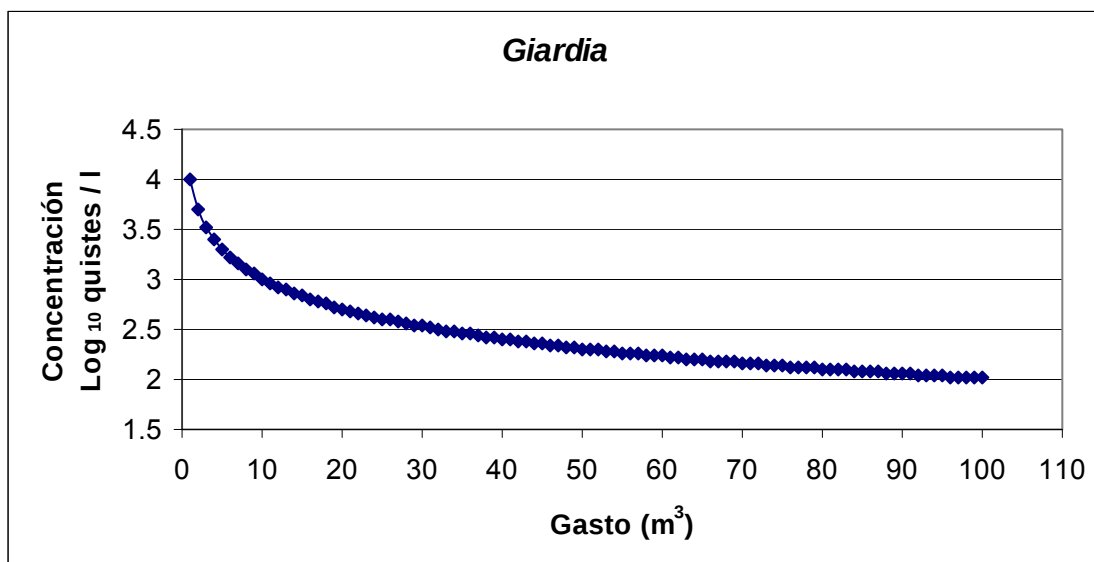


Figura 11. Concentración de *Giardia lamblia* en la mezcla, con diferentes gastos.

A pesar del gran efecto de dilución que se da al mezclar el agua del canal bajo con la el ART, es recomendable no ingerir esta agua ya que incluso cuando el gasto es de 100 m^3 , la concentración de quistes de *Giardia* es de 102.535 en un litro (2.3053 quistes / l en $\log_{10}$), nivel que sobrepasa la dosis infectiva que de acuerdo con diversos autores (Bitton, 1999; FDA, 2005) está en el intervalo de 10 - 100 quistes.

Más si esta agua se utilizara únicamente con fines de irrigación de cultivos podría no haber problemas sanitarios en los cultivos, ya que en un estudio llevado a cabo por Gortáres *et al.*, (2001a) en donde irrigaron vegetales con agua residual, (que tenía una concentración mayor por un orden de magnitud, que la que consideramos en este estudio), no se encontró la presencia de *Giardia* en ninguno de los vegetales irrigados. Por otra parte los mismos autores mencionan que este bajo nivel de organismos en los vegetales se puede deber también al método usado para eluir las muestras.

4.4 *Cryptosporidium parvum*

El análisis de este microorganismo se realizó al mismo tiempo que *Giardia*, y en la fecha del diez de Mayo para la muestra dos del canal, no se tomó el valor correspondiente, ya que al momento de bombear, se extrajo sedimento, dando un dato poco representativo de este microorganismo en el canal.

En la tabla 7 se muestran las fechas de muestreo, así como la concentración y su punto de muestreo. Estos resultados difieren por poco con los realizados en análisis de ARST (Aguas residuales sin tratar) donde Gortáres *et al.*, (2001 b) encontraron una concentración de ooquistes/ l con un orden de magnitud menor.

Tal como se muestra en la figura 12 en el gasto mínimo de 1 m³ la concentración de ooquistes/ l es de 4505.75, cifra muy por encima de la dosis infectiva, e incluso en la máxima dilución, que es de 47 ooquistes / l, la dosis infectiva que se considera de 1-10 ooquistes (Bitton, 1999; FDA, 2005) es rebasada.

Tabla 7. Concentración de *Cryptosporidium parvum* en muestras de agua del canal y salida de la planta.

Fecha de toma de muestra	Punto muestreo	<i>Cryptosporidium</i> ooquistes / l
13 abril 2005	1 ^a	2240
28 abril 2005	1 ^a	4389
	2 ^b	2.5
10 mayo 2005	1 ^a	9009
	2 ^b	23.9
	7 ^b	0.16
24 mayo 2005	2 ^b	0.7
	7 ^b	0.1

^a El punto de muestreo 1 es la salida de la planta tratadora.

^b El punto de muestreo 2 y 7 pertenecen al canal bajo a diferentes distancias.

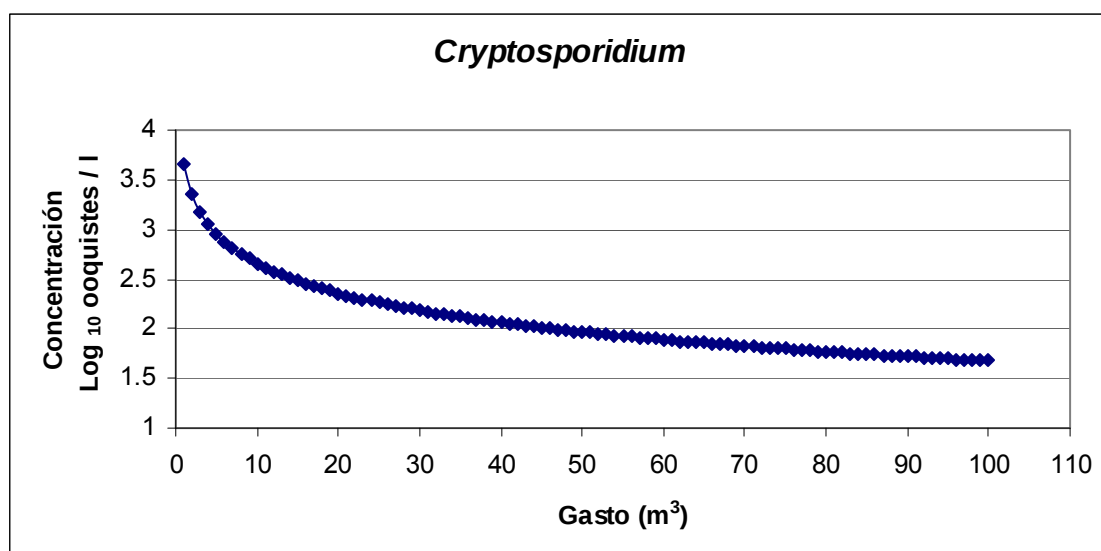


Figura 12. Concentración de *Cryptosporidium parvum* en la mezcla, con diferentes gastos.

Al igual que *Giardia* el protozooario *Cryptosporidium* no fue detectado en vegetales irrigados con agua residual en un estudio realizado por Gortáres *et al.*, (2001a) cuya concentración media era de 14,454 ooquistes/ l, que es mayor por un orden a la de la mezcla de las aguas a 1m³, que se presenta en este estudio. Por lo que la probabilidad de que *Cryptosporidium* represente un riesgo sanitario cuando el agua es usada para irrigar cultivos es mínima.

4.5 *Clostridium perfringens*

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para *Clostridium perfringens* en las distintas fechas de muestreo. Los resultados son menores a los obtenidos tanto en el agua de irrigación como en la salida de la planta, en comparación con estudios realizados (Gortáres *et al.*, 2001 a, b).

La mezcla de ambas aguas a diferentes gastos lleva a cabo un efecto de dilución, tal como se aprecia en la figura 13, esto es explicado porque el agua del canal contiene menor cantidad de este microorganismo.

Tabla 8. Concentración de *Clostridium perfringens* en muestras de agua del canal y salida de la planta.

Fecha	Salida planta UFC/ l	Canal UFC/ l
16 febrero 2005	600	150
18 marzo 2005	400	200
4 abril 2005	400	180

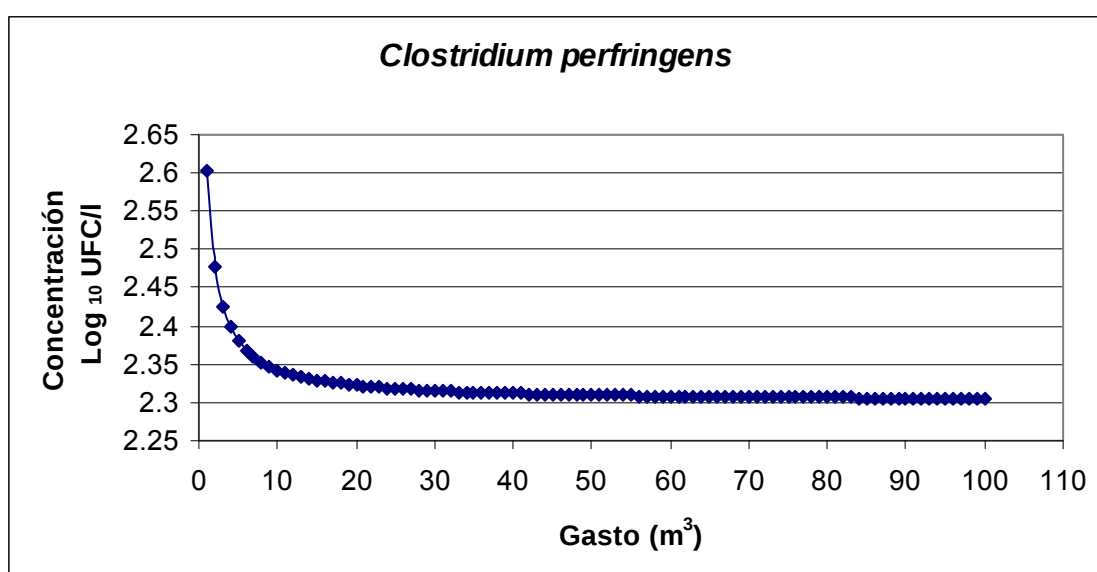


Figura 13. Concentración de *Clostridium perfringens* en la mezcla, con diferentes gastos.

En la mezcla de 1m³ (Figura 13) que es caudal mínimo considerado para el canal hay una concentración de 400 UFC/l, la cual resulta menor a la dosis infectiva, que es de más de 100, 000,000 células de *C. perfringens* para poder contraer la enfermedad (FDA, 2005; Madigan *et al.*, 1999) por lo que incluso con el mínimo gasto existe poco riesgo de contraer una enfermedad a causa de este microorganismo.

Considerando que el agua de la mezcla aún en su gasto mínimo está por debajo de la dosis infectiva, si esta agua es utilizada para regar cultivos, existe un riesgo sanitario menor, ya que el suelo actúa como un filtro. Incluso si los valores de *C.*

perfringens se encontraran tres ordenes más arriba, en la concentración del agua, de acuerdo con Gortarés *et al.*, (2001a) no encontraron diferencia significativa entre los vegetales irrigados con agua sin tratar a los irrigados con agua de los canales.

4.6 *Listeria spp.*

En la tabla 9 se aprecia que *listeria* es un microorganismo presente en los efluentes de la planta de tratamiento sur, más no así en las aguas del canal. Sin embargo la técnica utilizada (APHA, 1998) para la detección de *Listeria* no permite cuantificar este microorganismo, solo permite determinar si esta presente o ausente.

Tabla 9. Presencia y ausencia de *Listeria spp.* en muestras de agua del canal y salida de la planta.

Fecha	Salida de la planta	Canal
3 marzo 2005	Presencia	Ausencia
17 marzo 2005	Presencia	Ausencia
4 abril 2005	Presencia	Ausencia

Los datos obtenidos no permiten predecir en que volúmenes será posible realizar una mezcla, pero es un parámetro importante para tener en cuenta si se quiere realizar la mezcla de las diferentes aguas. También es importante realizar una cuantificación de este microorganismo principalmente en el carcamo ya que si se tiene un valor parecido al reportado al de la dosis infectiva (10^4 células / litro) no es recomendable mezclarla, y una vez obtenida la concentración poder predecir con que volúmenes lograr una disminución en la concentración de este microorganismo.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El análisis en el canal bajo mostró que la concentración de los microorganismos no sobrepasó la dosis infectiva para *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Clostridium perfringens*. Para *Listeria* no se cuantificó, pero se determinó su ausencia; en el caso de coliformes fecales el valor más alto obtenido no sobrepasa los límites marcados por la norma Mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996), sección de especificaciones, acentuación 4.2.
- La concentración de coliformes fecales, en la mezcla está por encima de lo establecido por la norma Mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996) de 1,000 y 2,000NMP /100 ml, para las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, así como las descargas vertidas a suelo (uso en riego agrícola), en cualquier volumen de mezcla.
- La concentración de quistes/l para *Giardia* y ooquistes/l de *Cryptosporidium* en la mezcla de las aguas se encuentra por arriba de la dosis infectiva en la máxima dilución. Por lo que no se recomienda la ingestión directa de esta agua.
- Para *Clostridium Perfringens* se logra disminuir la concentración, por debajo de la dosis infectiva por lo que existe un bajo riesgo de una enfermedad a causa de este microorganismo, por ingestión directa.
- Los bacteriófagos encontrados en la mezcla de aguas están en una concentración de 165250 UFP/100ml a 1652 UFP/100ml en el mínimo y máximo gasto respectivamente. Por lo que se tendría un aproximado de 16 virus entéricos por litro, a la dilución de 100m³, lo que significa una alta probabilidad de contraer una enfermedad entérica, dada la baja dosis infectiva de la mayoría de los virus.

- En el caso de *Listeria spp.* fue detectada su presencia en los efluentes de la planta de tratamiento sur, más no así en las aguas del canal, sin embargo se desconoce si este microorganismo sobrepasa la dosis infectiva, debido a que la técnica no lo permite.
- Se recomienda realizar estudios de cómo se transportan los microorganismos a través del canal bajo, después de la mezcla de las aguas, para saber su concentración.
- También es recomendable que cuando el canal bajo presente el mínimo flujo agua el agua de la mezcla sea utilizada para irrigar cultivos que presenten un menor riesgo de contaminación, como aquellos cultivos que no son de consumo directo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Adams, M. H. 1959. Bacteriophage. Interscience Publisher, Inc. New York, United States of America.

Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews. 14: 447 – 475.

Al-Ghazali, M.R, Al-Azawi, S. K. 1990. *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake, *Journal Applied Bacteriology*. 69: 642-647.

American Public Health Association (APHA). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 edition. American Public Health Association. Washington, D.C.

Banning, N., Toze, S, and Mee, B.J. 2002. *Escherichia coli* survival in groundwater and effluent measured using a combination propidium iodide and the green fluorescent protein. *Applied Microbiology*. 93:69-76.

Bisson, J.W., and V.J. Cabelli. 1979. Membrane filter enumeration method for *Clostridium Perfringens*. Appl. Environmental Microbiology. 37: 55-66

Bitton, G. 1999. Wastewater Microbiology. Second edition. Willey-Liss. New York, United States of America. pp 121-125.

Bitton, G. 2002. Encyclopedia of Environmental Microbiology. Wiley-Interscience Publication. New York, United States of America. pp 355-370 y 861-866.

Blumenthal, U., Mara, D., Peasey, A., Palacios, G., Stott, R. 2000. Guidelines for the microbial quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. Bulletin of the World Health Organization. 78: 1104-1113.

Centers for Disease Control and Prevention. (CDC). 2005. Giardiasis Surveillance-United States, 1998—2002.

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5401a2.htm>

Cifuentes, E., Blumenthal, U., Ruiz, P.G., Benett, S., Peasey, A. 1994. Escenario epidemiológico del uso agrícola del agua residual: El valle del mezquital, México. Salud Pública de México. 36: 3-9.

Copes, J. Pellicer, K. Malvestiti, Stanchi N. 2002. Sobrevivencia en tablas de cocina de madera y plástico inoculadas experimentalmente con *Listeria monocitogenes*. Anacleto Veterinaria. Volumen 20: 47-50

Díaz – Carbonell J. V; Fernández – Alonso B. M. E. 1996. Giardiasis: Una breve revisión. Perspectivas diagnosticas en el laboratorio clínico. Asociación española de pediatría. 44: 87 – 91.

Environmental Protection Agency (EPA). 2000. *Giardia*: Drinking Water Fact Sheet. Office of Water. Washington, D.C.

Environmental Protection Agency (EPA). 2001 Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. <http://www.epa.gov/nerlcwww/1623ap01.pdf>

Environmental Protection Agency (EPA). 2003. Mid-Atlantic Integrated Assessment. Fecal coliform. <http://www.epa.gov/maia/html/fecal.html>

Food and Drug Administration (FDA). 1998. Center for Food safety and applied nutrition. Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetable. <http://www.foodsafety.gov/dms/prodguid.html>

Food and Drug Administration (FDA). 2003. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Bacteriological Analytical Manual Online. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>

Food and Drug Administration (FDA). 2005. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>

Freeman, B. Microbiología de Burrows. 1989. 22 ediciones. Ed. Nueva Editorial Interamericana. México, D. F. pp 227-229 y 660-662.

García J.M. Construcción de un Modelo. En Apuntes del Curso de Creación de Modelos de Ecología y Gestión de Recursos Naturales.

Garrec, N., Picard-Bonnaud, F., Pourcher A.M. 2003. Occurrence of *Listeria spp.* And *L. monocytogenes* in sewage sludge used for land application: effect of dewatering, liming and storage in tank on survival of *Listeria species*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 35: 275-283.

Gerba, P. y Brooks, J. 2004. Curso de Transmisión de Patógenos en el Ambiente. Universidad de Sonora. Hermosillo, México.

Gortáres, P., Castro, L., Naranjo, J., Manshadi, F., Gerba, P., Karpiscak, M., Freitas, R.J. 2001 a. Enteric Pathogens in Raw Wastewater and Surface Irrigation Water and Its Impact on Fresh Vegetables. Artículo presentado en el 4th International Symposium on Wastewater Reclamation and Reuse. D.F, México. Noviembre 12 – 14.

Gortáres, P., Castro, L., Torres, A., Naranjo J. E., Karpiscak, M., Gerba, C. 2001 b. Recycling Municipal Treated Wastewater for Crop Irrigation. Artículo presentado en el 4th International Symposium on Wastewater Reclamation and Reuse. D.F, México. Noviembre 12 – 14.

Guan, Y.T. y Holley, R.A. 2003. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness. *Journal Environmental Quality*.32: 383-392.

Hurst, C. J. 2002. Modeling the Fate of Microorganisms in Water, Wastewater, and Soil. *Manual of Environmental Microbiology*. Second edition. ASM Press. Washington D.C, United States of America. pp 300 - 302.

Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 2004. Giardia
<http://www.itis.usda.gov/index.html>

Kott, Y., Roze, N., Sperber, S., and Betzer N. 1973. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research*. 8: 165 – 171.

Lederberg, J. 2000. *Encyclopedia of Microbiology*. Vol 1 Second edition. Academic Press. New York, United States of America. pp 400-409.

Madigan M, Martinko J. y Parker J. 1999. *Biología de los Microorganismos*. 8 edición. Prentice Hall. Madrid, España. pp. 260-265 y 972.

Maier, R.M., Pepper I.L. and Gerba C. P. 2000. *Environmental microbiology*. Academic Press. Canada. pp. 460-464.

McAnulty J. M., Fleming P., Gonzalez, A. H. 1994. A community - wide outbreak of Cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool. *Journal of American Medical Association*. 272: 1597 – 1600.

Medema G. J. 1999. *Cryptosporidium and Giardia: New Challenges to the Water Industry*. Thesis Universiteit Utrecht. Whit summaries in English and Dutch. Subject headings : intestinal protozoo- drinking water- water treatment.

Metcalf & Eddy, Inc. 1991. *Wastewater Engineering : Treatment , Disposal and Reuse*. Tercera edición. McGraw-Hill. Estados Unidos. pp. 1213-1216.

Morecroft, J. D. W. System Dynamics: Portraying Bounded Rationality. 1983. Omega II: 131-142. En Trabajos del Curso de Creación de Modelos.

Murray, P.R., Kobayashi, G.S., Pfaller, M. A., Rosenthal, K.S. 1997. Microbiología médica, editorial Harcourt Brace Publisher international, segunda edición. 210-235.

Novak, J.S., Sapers, G.M., Junega, V.K. 2003. Microbial safety of minimally processed foods, CRC Press. 57-58.

Ono K., Tsuji H., Kumar R.S., Yamamoto A., Masuda K., Kawuamura T., Uga S. 2001. Contamination of River Water by *Cryptosporidium parvum* oocysts in Western Japan. Applied Environmental Mycrobology. 67: 3832 – 3836.

Payment, P., E. Franco, and J.Siemiatycki. 1993. Absence of relationship between health effects due ti tapwater consumption and drinking water quality parameters. Water Sci. Technol. 27: 137-143.

Pepper, I. L., Gerba, C. P., and Biendecke, J. W. 1995. Environmental Microbiology: A laboratory Manual. Academic Press. San Diego, United States.

Pettygrove, S., Asano, T. 1985. Irrigation with Reclaimed Municipal Wastewater – A Guidance Manual. Lewis Publishers. United States of America.

Rodriguez, M. 2002. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness. Journal Environmental Quality.32: 383-392.

Rose, J. B., Gerba, C. P., Jakubouski, W. 1991. Survey of Potable Water Supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. Environmental Science Technology. 25: 1393 – 1340.

Rose J. B., Slifko T. R. 1999. *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Cyclospora* and Their Impact on Foods. Journal of Food Protection. 62 : 1059 – 1070.

Rose J. B., Huffman D. E., Gennaccaro, A. 2002. Risk and Control of Waterborne Cryptosporidiosis. FMS Microbiology Reviews. 26: 113 – 123.

Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2003. Programa integral de playas limpias. Ficha técnica del análisis del agua. http://www.semarnat.gob.mx/playas/nuevo/analisis_tecnico02.shtml

Secretaría de Medio Ambiente, y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2005 a. NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. <http://portal.semarnat.gob.mx/semarnat/portal/!ut/p/kcxml/>

Secretaría de Medio Ambiente, y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2005 b. NOM-003-SEMARNAT-1997. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público. <http://portal.semarnat.gob.mx/semarnat/portal/!ut/p/kcxml/>

Shay F. G., W. Frank, M. James, D. Daniel and E.S. Ronald. 1990. ICR Microbial Laboratory Manual, National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency , Cincinnati, Ohio. United States of America.

Soto, J. 2004. Presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en Agua Superficial de Uso Agrícola, Tinas de Lavado, Espreas y Superficie de Tomate. Tesis para obtener la Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Culiacán, Sinaloa.

Sterman, J.D. A Skeptic's Guide to Computer Models. 1991. In Barney, G. O. et al. (eds.), *Managing a Nation: The Microcomputer Software Catalog*. Boulder, CO: Westview Press, 209-229. En Trabajos del Curso de Creación de Modelos.

Szabo E. A., Simons, L., Coventry, M.J. and Cole, M.B. 2003. Assessment of control measures to achieve a food safety objective of less than 100 CFU of *Listeria monocytogenes* per gram at the point of consumption for fresh pre-cut iceberg lettuce. *Journal of Food Protection*. 256-264

Tyrrel S. F., Quinton J. N. 2003. Overland Flow Transport of Pathogens. In *Agricultural Land Receiving Faecal Wastes*. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 875 – 935.

Venczel, L. V., M. Arrowood, M. Hurd, and M.d. Sobsey. 1997. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst by a mixed-oxidant disinfectant and by free chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1598-1601.

Wiley, J. 1998. *Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology*. John Wiley & Sons. London, UK. pp. 69-83.