



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Bacteriófagos como indicadores de la calidad del agua en
Ciudad Universitaria**

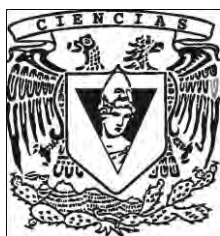
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

María Alejandra Fonseca Salazar



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ANA CECILIA ESPINOSA GARCÍA

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Fonseca Salazar María Alejandra 561887793 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 303252441</p>
<p>2. Datos del tutor Dra Ana Cecilia Espinosa García</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 M en C Irene Pisanty Baruch</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 M en C José Alberto Campillo Balderas</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 M en C Antonio Cruz Peralta</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dra Marisa Mazari Hiriart</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Bacteriófagos como indicadores de la calidad del agua en Ciudad Universitaria</p> <p>54 p</p> <p>2010</p>

Agradecimientos

Al Proyecto PUMAGUA e Instituto de Ingeniería UNAM por la beca que me otorgaron para realizar mi tesis de licenciatura. Especialmente al Dr. Fernando González Villarreal coordinador del proyecto PUMAGUA y al Dr. Rafael Val del Instituto de Ingeniería-UNAM.

Al Instituto de Ecología de la UNAM por ser el sitio en cual desarrollé y lleve a cabo mi investigación, así como una etapa importante de mi formación académica.

A la UNAM por todo lo que me ha dado como estudiante y como ser humano.

A mi asesora y madre académica Dra. Ana Cecilia Espinosa García por la enseñanza, paciencia, motivación, admiración y la amistad.

A la Dra. Marisa Mazari Hiriart por su apoyo incondicional, acompañamiento y dedicación para que saliera este trabajo.

A mis sinodales por sus críticas constructivas y el apoyo para esta tesis, en especial a la Dra. Castillo por sus valiosos comentarios y su apoyo para la realización en este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio: Miguel, Rosa, Toño, Gustavo, Jazmín, Dafne, Adriana, Irma y Marisol. Cada uno sabe en qué forma me apoyaron, gracias por el trabajo y la convivencia.

Este trabajo se lo dedico especialmente a mi abuelo, el Arquitecto Roberto Salazar Moreno, por todas sus enseñanzas y cariño.

A mi familia: mi madre Olga, mi padre Rodolfo, Enrique, Pablo, Magui, Ariel y Sofía, y mi abuela Olga. Gracias a todos por su apoyo y amor.

A mis amigas por revisar este escrito, Lucía y Eva. A mi prima política, Paulina por ayudarme con los mapas.

Índice

Resumen	
1. Introducción	1
2. Antecedentes	10
3. Hipótesis y Objetivo	12
3.1 Hipótesis	12
3.2 Objetivo	12
4. Área de estudio	13
5. Métodos	15
5.1. Métodos de campo	15
5.2. Determinación de parámetros físico-químicos	17
5.3. Concentración de muestras de agua	18
5.4. Muestras de pastos	18
5.5. Cultivo de la bacteria hospedera	19
5.6. Ensayo en placa	19
5.7. Determinación de coliformes y enterococos fecales	20
5.8. Análisis de datos	20
6. Resultados	22
6.1. Análisis de resultados por tipo de agua	22
6.2. Análisis por temporada de muestreo.	26
6.3. Matriz vegetal	36
7. Discusión	41
8. Conclusiones	48
9. Referencias	50

Índice de Tablas

Tabla 1. Características generales de los bacteriófagos propuestos en la evaluación de calidad del agua.	8
Tabla 2. Número de muestras por sitio.	17
Tabla 3. Muestras positivas y cuantificación de indicadores por tipo de agua.	23
Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos durante las tres temporadas de muestreo en agua subterránea.	25
Tabla 5. Coeficiente de correlación ente organismos indicadores en la temporada fría-seca y tipo de asociación.	27
Tabla 6. Coeficiente de correlación en la temporada cálida-seca y tipo de asociación.	31
Tabla 7. Coeficiente de correlación entre organismos indicadores en la temporada lluvias-cálida y tipo de asociación.	34
Tabla 8. Análisis de correlación para todas las muestras de las tres temporadas cálida y tipo de asociación.	36
Tabla 9. Resultados por sitio de muestreo de la matriz vegetal.	40

Índice de figuras

Figura 1 .Sitios de muestreo en el Campus de Ciudad Universitaria.	14
Figura 2 diseño del muestreo.	16
Figura 3. Indicadores en la temporada fría-seca en agua residual.	28
Figura 4. Presencia de indicadores estudiados durante la temporada fría-seca en agua residual tratada y agua residual tratada de reúso para riego.	29
Figura 5. Microorganismos indicadores estudiados respecto a la temporada cálida-seca en agua residual.	32
Figura 6. Agua residual tratada y agua residual tratada de reúso para riego.	33
Figura 7. Tendencia de los tres indicadores durante la temporada lluvias-cálida en agua residual.	35
Figura 8. Conteos de microorganismos indicadores en pastos durante la temporada fría-seca.	37
Figura 9. Conteos de los indicadores estudiados en pasotos durante la temporada cálida-seca.	38
Figura 10. Conteos de microorganismos indicadores en pastos durante la temporada lluvias-cálida.	39

Resumen

El análisis de la calidad del agua a partir de colifagos, como indicadores potenciales de contaminación fecal y viral, en Ciudad Universitaria responde a que es considerada un área representativa de la Ciudad de México por los problemas que presenta en el manejo del agua, que va desde dificultades en funcionamiento de la Planta de Tratamiento de Agua Residual, el mantenimiento de la red de abastecimiento de agua, el reúso del agua y el método de desinfección entre otros.

Se analizaron cuatro tipos de agua que se utilizan diariamente en Ciudad Universitaria: agua subterránea, agua residual, agua residual tratada y agua residual tratada de reúso para riego de las áreas verdes. El área de estudio fue el Campus de Ciudad Universitaria, donde se muestrearon tres pozos de extracción de agua subterránea, así como el efluente y el influente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales-Cerro del Agua (PTAR-Cerro del Agua), aspersores (agua residual tratada de reúso para riego) y pastos de las áreas verdes (matriz vegetal).

Se llevaron a cabo muestreos durante tres temporadas cubriendo un ciclo anual, con las estaciones, fría-seca, cálida-seca y cálida- lluvias; lo que corresponde del mes de enero a noviembre del año 2009.

Las bacterias indicadoras cuantificadas fueron coliformes fecales y enterococos fecales, y fueron analizados por el método de filtración a través de membrana. Se utilizaron colifagos, como indicadores de la calidad del agua, detectados por el método de doble capa de agar de acuerdo con la ISO 10705-1. En forma complementaria se determinaron parámetros físico-químicos.

La presencia de colifagos en los distintos tipos de agua analizados mostró una buena correlación con respecto a la calidad del agua.

Los resultados mostraron que durante la temporada fría-seca, los conteos de colifagos en las muestras de agua fueron mayores, en comparación con la época cálida- seca y cálida-lluvias. Por otro lado, la temporada de lluvias presenta la mayor asociación entre los colifagos y las bacterias indicadoras alternativas, que en este caso fueron coliformes fecales (CF) y enterococos fecales (EF), en comparación con la temporada seca-cálida.

En el material vegetal analizado se presentan datos interesantes respecto a la calidad del agua del Campus, el agua residual tratada de reúso para riego presentó un aumento en el número de conteos positivos de colifagos, CF y EF, en las muestras de material vegetal.

Los bacteriófagos son indicadores confiables que cumplen con los criterios de un buen indicador de contaminación, por ser más resistentes a condiciones ambientales adversas y a tratamientos de desinfección del agua, en comparación con las bacterias indicadoras convencionales.

1. Introducción

Actualmente el monitoreo de la calidad del agua es un mecanismo importante para el control de enfermedades, ya que el agua constituye un vehículo significativo de transmisión de patógenos que pueden generar diversos padecimientos, principalmente los gastrointestinales (Sardin *et al.*, 2009).

Las enfermedades transmitidas por el agua están íntimamente relacionadas con la alteración su calidad, así como por deficiencias en el tratamiento o por contaminación en los sistemas de distribución (WHO, 2003). La vía de contagio más frecuente es fecal-oral producida por la ingesta de alimentos, agua contaminada, por contacto directo con el agua, por aerosoles, de humano a humano o de animales a humano (Gerba, 2009a).

La calidad del agua y su tratamiento deben ir enfocados a la reducción de riesgos tanto para la salud como para el ambiente. Las descargas de agua residual y agua residual tratada en los cuerpos de agua conllevan un riesgo para la población expuesta, así como para la flora y fauna. El tratamiento del agua y su calidad deben ir enfocadas al uso final que se le quiere dar al agua, ya sea agua para consumo humano, agricultura, recreación, ganadería o industria (Escalante *et al.*, 2003; CONAGUA, 2008).

Los tres grupos principales de organismos patógenos que se transmiten a través del agua son bacterias, protozoarios y virus (Reynolds, 2001). De estos grupos las bacterias son las más estudiadas, en especial las coliformes. Desde hace más de 100 años estas bacterias se utilizan como indicadores de contaminación fecal del agua debido a que su nicho ecológico natural es el tracto gastrointestinal de seres humanos y animales, y son desechadas en grandes cantidades por medio de las heces fecales. Su detección se realiza por métodos simples y de bajo costo, además de ser sencillas de monitorear. Además porque su presencia en agua denota contaminación fecal y *E. coli* es el segundo grupo más abundante en el

intestino de humanos y animales. Por estas características *Escherichia coli* es considerado como principal representante del grupo, además de haber sido el primer indicador de contaminación fecal utilizado (Leclerc *et al.*, 2000).

Las bacterias del grupo de coliformes fecales (CF) y enterococos fecales (EF) son comúnmente utilizadas como indicadores de la calidad del agua. Las bacterias coliformes son organismos anaerobios facultativos. Entre sus características generales se encuentran, que son gram-negativas, no forman esporas, tienen forma de vara, no fermentan lactosa, y producen gases y ácidos entre 24 a 48 horas a 35°C. Estas bacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, que incluye a miembros de especies como *Escherichia coli*, así como a varios miembros del género *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. Estas bacterias son menos persistentes en los sistemas acuáticos que los virus y los protozoarios, sin embargo, con respecto a la susceptibilidad en materia de desinfección, los coliformes son más susceptibles a los sistemas de desinfección por cloración (Toranzos *et al.*, 2007).

Escherichia coli ha demostrado ser un indicador efectivo de contaminación fecal. Su uso como indicador se extendió durante un tiempo en Europa y recientemente ha sido incorporado en las regulaciones de agua para consumo humano en Estado Unidos como indicador de contaminación fecal del agua. Sin embargo, una de sus desventajas es que este organismo ha sido encontrado en forma natural en sitios prístinos de selva húmeda, tanto en agua como en suelos, y se ha observado que su supervivencia es corta en sitios templados (Toranzos *et al.*, 2007).

Los enterococos pertenecen al grupo de bacterias gram-positivas y, han recibido aceptación como indicadores útiles de calidad microbiológica del agua salobre y marina porque muestran una alta y estrecha relación con riesgos para la salud asociado con aguas recreativas y enfermedades gastrointestinales. Una ventaja que los enterococos presentan sobre los coliformes es que no son tan ubicuos en

el ambiente y están siempre presentes en las heces de animales de sangre caliente, además de que su mortalidad es menor respecto a las bacterias coliformes en el agua, especialmente en agua salobre y marina. Sus patrones de persistencia son similares a las bacterias patógenas potenciales que se transmiten a través del agua, como *Legionella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, entre otras. Algunos grupos que se encuentran dentro de los enterococos son: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. gallinarum* y *E. cecorum*. Sus características principales son: crecen entre los 10°C y 45°C, resisten temperaturas de hasta 60°C por treinta minutos, crecen a un pH de 9.6 y a una concentración de 6.5% de cloruro de sodio. Estos microorganismos poseen una asociación cercana con las heces humanas en comparación con otros tipos de bacterias indicadoras (Toranzos *et al.*, 2007).

Las bacterias del tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente no suelen sobrevivir en el agua por mucho tiempo. Esto se debe a que se encuentran sometidas a estrés fisiológico y pierden gradualmente la capacidad de producir colonias. Su tasa de mortalidad depende de la temperatura del agua, los efectos de la luz solar, la interacción con poblaciones de otras bacterias presentes y de la composición química del agua. La presencia de coliformes y enterococos en el agua indica la contaminación bacteriana reciente y constituye un indicador de degradación de los cuerpos de agua (Pulido *et al.*, 2005).

La resistencia de los microorganismos enteropatógenicos en el ambiente es variable y depende principalmente del tipo de organismo y la especie, así como de las variables externas como la temperatura, la radiación solar, el pH, por mencionar algunas. Cada microorganismo presenta diferentes resistencias a los tratamientos del agua (Torres, 1999).

Los virus, a diferencia de las bacterias presentan dosis infecciosas bajas. Sólo se requieren de 1 a 75 partículas virales para producir una enfermedad, lo que los hace más nocivos que las bacterias, que requieren dosis de entre 10^2 y 10^9

unidades formadoras de colonia (UFC) para producir una enfermedad (Geldreich, 1990).

Los virus tienden a adherirse a superficies, ya que les ayudan a protegerse de condiciones adversas y prolongan su permanencia en el agua. Son difíciles de detectar en las muestras ambientales (Reynolds, 2001), principalmente por su tamaño y porque se encuentran en menor cantidad dentro de los sistemas de agua, por lo cual es necesario hacer una concentración de las muestras para su adecuada detección (Reynolds, 2004).

Se ha propuesto a los bacteriófagos, virus que sólo utilizan bacterias como hospederos para su replicación, como indicadores de contaminación viral en el agua. Lo anterior es debido a su tamaño, estructura, morfología y comportamiento en los ambientes acuáticos, y también por la semejanzas que presentan con los virus entéricos (Leclerc *et al.*, 2000). Se consideran un indicador apropiado de contaminación fecal por su presencia en aguas residuales y aguas contaminadas (Carter, 2005).

Los bacteriófagos representan el grupo viral más numeroso en la naturaleza y la ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) los clasifica en un orden de 13 familias y 31 géneros.

Los colifagos se encuentran dentro de la familia *Leviviridae*. Son virus de ARN de cadena sencilla, cápside icosaédrica, miden alrededor de entre 21-30 nm, sus viriones son parecidos a los de los enterovirus en cuanto estructura y presentan la característica de infectar bacterias vía pili (Ackermann, 2006).

Un organismo indicador es una especie o grupo de especies que reflejan de manera sencilla el estado biótico y abiótico de un ambiente; representan el impacto ambiental dentro de un hábitat, o pueden ser indicativos de la diversidad de un grupo de especies, en general de la diversidad dentro de un hábitat

(Hodkinson y Jackson, 2005). Los organismos indicadores de material fecal, como los bacteriófagos, son organismos utilizados para inferir la posible presencia de contaminantes de origen fecal en el ambiente (Pillai, 2006).

De acuerdo con Ashbolt *et al.* (2001), existen diferentes clases de organismos indicadores, pueden ser indicadores de procesos y/o indicadores de contaminación fecal y organismos modelo o índices. Los organismos indicadores de procesos son un grupo de organismos que demuestran la eficiencia de un proceso, como por ejemplo el de una planta de tratamiento de aguas residuales; indicadores de contaminación fecal y los organismos índice o modelo, que son un grupo de especies u organismos indicadores de la presencia o comportamiento de patógenos, como *E. coli* índice de *Salmonella* y colifago ARN-F como modelo de virus entéricos humanos (Arcos *et al.*, 2005).

Las principales ventajas que presentan los bacteriófagos para ser utilizados como indicadores son: a) su alta especificidad; b) no se multiplican en el ambiente; c) tienen una alta tasa de permanencia, a diferencia de los enterovirus; d) son resistentes a diversos tipos de tratamiento de agua; y e) sus métodos de detección son económicos. Han sido utilizados para evaluar la eficiencia de los tratamientos de desinfección, pues se ha observado su resistencia incluso a la desinfección con cloro antes, durante y después del tratamiento del agua, en agua residual tratada y agua subterránea (Gerba, 2009b).

La presencia de organismos indicadores seguirá siendo utilizada como criterio para la calidad del agua. Sólo será válida, si se presta atención al desarrollo y uso de métodos óptimos para la recuperación de dichos organismos, así como mejoras a las normas de calidad del agua (Toranzos *et al.*, 2007).

Los tres grupos de bacteriófagos propuestos como indicadores son los colifagos somáticos, colifagos ARN-F específico y los bacteriófagos de *Bacteroides fragilis* (Toranzos *et al.*, 2007; Jofre, 2002; Kai *et al.*, 1985). Los colifagos utilizan *E. coli* y

otras especies de coliformes como hospederos y, por lo tanto, pueden ser liberados en las heces humanas y de otros animales de sangre caliente.

El primer grupo formado por colifagos somáticos son virus específicos de *Escherichia coli*. Son comúnmente utilizados como indicadores de contaminación fecal en aguas residuales; además de la correlación que tienen con la presencia de virus entéricos, en aguas marinas, ecosistemas de agua dulce y efluentes. Los colifagos somáticos inician la infección uniéndose a receptores ubicados permanentemente en la pared celular de los hospederos; los cuales suelen replicarse en el aparato digestivo de los animales de sangre caliente. Los colifagos somáticos son diversos. Pertenecen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae* con diferentes tipos morfológicos (Gerba, 2009a).

El segundo grupo está conformado por los colifagos ARN-F, que han sido propuestos como indicadores del comportamiento ambiental de los virus entéricos, tanto en agua de uso y consumo humano como en agua residual tratada, así como indicadores de contaminación fecal (Gerba, 2009a).

MS2, es un ejemplo de colifago utilizado para la evaluación de la eficacia de los desinfectantes en Plantas de Tratamiento de agua residual, pues está íntimamente ligado con la materia fecal. MS2 contiene ARN como material genético en una cadena sencilla. Presenta una morfología icosaédrica y tamaño pequeño; tiene 3569 ribonucleótidos y carece de cola. Su ciclo infeccioso es lisogénico (Gerba, 2009a; Carter, 2005).

Los colifagos específicos de ARN-F inician la infección uniéndose a las fimbrias de fertilidad (fimbrias F o sexuales) de las *E. coli* hospederas que producen exclusivamente las bacterias portadoras del plásmido de fertilidad (F). Este plásmido es transferible a una amplia gama de bacterias gram-negativas. Dado que las fimbrias F se producen únicamente en la fase de crecimiento logarítmico a temperaturas superiores a 30°C, pero nunca por debajo de los 25°C, es poco

probable que los colifagos específicos de ARN-F sean capaces de replicarse en ambientes diferentes al del aparato digestivo de los animales de sangre caliente, además de que se ha observado que su probabilidad de replicación en el ambiente es baja (Gerba, 2009b). Los colifagos específicos de ARN-F son un grupo reducido que pertenece a la familia *Leviviridae*. Otra característica interesante de estos indicadores es que los colifagos específicos de ARN-F se encuentran con menor frecuencia que los colifagos somáticos en heces animales. Por su abundancia dentro de las aguas residuales los colifagos ARN-F específicos se utilizan no solamente como indicadores de contaminación fecal, sino también como indicadores de contaminación viral en las aguas residuales (Gerba, 2009d). Una diferencia importante entre ambos grupos es la vía de infección.

El tercer grupo de bacteriófagos propuesto como indicador, es el de los bacteriófagos que infectan a la bacteria *Bacterioides fragilis*, bacteria anaerobia, cuyo nicho es únicamente el tracto intestinal humano. La infección es específicamente mayor, en comparación con los otros dos grupos de bacteriófagos que no son tan específicos como este último, puesto que también infectan bacterias que se encuentran presentes en los tractos intestinales de otros animales (Jofre *et al.*, 1986). Los bacteriófagos que infectan esta bacteria pertenecen a la familia *Siphoviridae*. Su sitio de infección es la pared celular de la bacteria, poseen una cola, son virus de ADN de doble cadena y su cápside es mayor a 60 nm (Gerba, 2009a).

En la Tabla 1 se muestran las características generales y las diferencias entre los bacteriófagos propuestos para la evaluación de calidad del agua.

Tabla 1. Características generales de los tres grupos de bacteriófagos propuestos como indicadores para la evaluación de calidad del agua, modificado de Jofre, 2002.

Características	Colifagos somáticos	Colifagos ARN-F específicos	Bacteriófagos de <i>B. fragilis</i>
Resistencia a la desinfección con cloro	+	++	+++
Resistencia a la desinfección con ozono	SD	+++	SD
Resistencia a la desinfección con UV	+	+++	++
Presencia y concentración en heces humanas	++	+	+
Presencia y concentración en heces animales	+++	+	+
Presencia y concentración en aguas residuales domésticas	+++	+++	+++
Probabilidad de replicación en el ambiente	++	+	-
Resistencia a la inactivación en el ambiente	++	+	+++

+++ mayor; ++ intermedio; +menor; - mucho menor; SN sin datos.

Los tres grupos de bacteriófagos pueden ser considerados, de acuerdo con Ashbolt *et al.* (2001), como organismos índice de contaminación de aguas residuales, organismos indicadores de procesos e indicadores de contaminación fecal. En general, son más abundantes en las aguas residuales que la mayoría de los patógenos entéricos, porque también son encontrados en los efluentes de

aguas residuales. No existen grupos de organismos indicadores que se ajusten al modelo de un organismo índice ideal, pero, los bacteriófagos, ayudan a evaluar la calidad del agua complementando a los indicadores bacterianos tradicionales (Jofre, 2002).

En México, en la Norma Oficial Mexicana sobre agua para uso y consumo humano (NOM-127-SSA1-1994, modificada en el año 2000), no se contempla a los virus ni a los protozoarios, como parte los parámetros biológicos que afectan la calidad del agua y la salud de la población. Solamente se hace mención a los coliformes totales, *E. coli* o coliformes fecales u organismos termotolerantes, para los cuales únicamente señala que los límites permisibles deben ser “ausente o no detectables” (Diario Oficial de la Federación, 2000). No obstante, epidemiológicamente se reportan cada año más de 4 millones de casos de infecciones gastrointestinales debidas a virus y otros organismos (DGEPI, 2009).

2. Antecedentes

La presencia de virus entéricos humanos en fuentes de agua ha sido reconocida por varias décadas, pero existe poca información sobre los aspectos epidemiológicos, principalmente en nuestro país (Torres, 1999).

Desafortunadamente, en México el Sistema de Salud no reporta ni presenta datos epidemiológicos que puedan indicar el número de casos reales que se presentan en el país de gastroenteritis causadas por virus entéricos, asociados con la contaminación fecal del agua (Espinosa-García *et al.*, 2009). Sin embargo, durante el 2009 se reportaron en el Boletín Epidemiológico Nacional 386,607 casos, que están en la clasificación de “infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas” (CENAVECE, 2009), sólo para el Distrito Federal.

En términos de salud pública, a nivel mundial, se consideran relevantes las enfermedades causadas por microorganismos en el agua. Los países en desarrollo y países desarrollados presentan aún casos. Una gran diversidad de bacterias entéricas y virus entéricos se han asociado a gastroenteritis causadas por microorganismos presentes en el agua (WHO, 2001). El agua residual contiene una gran variedad de organismos excretados. El tipo y las concentraciones varían dependiendo de los niveles de referencia de las enfermedades de la población (Espinosa-García *et al.*, 2009).

El agua residual cruda y la residual tratada es una fuente importante de nutrientes para el riego en países desarrollados (Jiménez *et al.*; 2001). Sin embargo, existen riesgos asociados a esta práctica. Uno de ellos es la infiltración de agua residual y residual tratada en los sistemas subterráneos de abastecimiento de agua, introduciendo no sólo estos tipos de agua, sino también patógenos y materia orgánica. Esta penetración al acuífero se debe al exceso de agua aplicada durante el riego, así como por su almacenamiento y transporte (Jiménez, 2009). Los microorganismos se difunden por medio de las capas superficiales del suelo; esto

ocurre principalmente en suelos permeables, así como en sistemas de agua superficial, como son ríos, lagos y presas.

Por otro lado, existen riesgos potenciales para la salud de los grupos vulnerables como los niños, ancianos, y animales domésticos y mascotas que están en contacto con el agua (Jiménez, 2006).

Los virus entéricos y otros patógenos como bacterias de origen gastrointestinal en el ambiente, son indicadores de contaminación fecal y representan un riesgo potencial para la población que está expuesta a ellos. En este caso, el reúso de agua residual tratada utilizada para el riego de las áreas verdes implica un riesgo potencial, dado que su tratamiento no considera la eliminación de estos agentes patógenos.

México es uno de los países que más reutiliza el agua residual y tratada para riego, tanto para uso agrícola como de áreas verdes. Se ha calculado que alrededor de 180,000 hectáreas se riegan anualmente con este tipo de agua (Jiménez, 2006). Esta práctica va en aumento, por la creciente escasez del líquido.

3. Hipótesis y Objetivo

3.1 Hipótesis

Los colifagos son buenos indicadores de contaminación fecal en el agua, ya que están presentes en la mayoría de las muestras con conteos positivos en las que las bacterias indicadoras están presentes.

3.2 Objetivo

Determinación experimental de colifagos como indicadores de contaminación fecal en muestras de agua de Ciudad Universitaria de la Ciudad de México.

4. Área de estudio

Ciudad Universitaria se encuentra al sur de la Ciudad de México, en la Delegación Coyoacán. Abarca 730 hectáreas, de las cuales 155 corresponden a jardines; 105ha, se riegan con agua potable y 50 con agua tratada. Se encuentra a una altitud de 2,340 msnm con un clima templado caracterizado por estaciones bien diferenciadas; se presentan lluvias en verano y la estación seca se presenta en el invierno y primavera. Las coordenadas de Ciudad Universitaria son: 19° 19' 58.71'' N y 99° 11' 11.17'' W (Estación Meteorológica del CCH Sur, UNAM, 2009).

Tiene una población de 131,061 usuarios, incluyendo académicos, alumnos y trabajadores del campus de Ciudad Universitaria (DGPL-UNAM, 2008). Cuenta con una red de abastecimiento de agua a partir de tres pozos de extracción de agua subterránea, Pozo de la Facultad de Química, Multifamiliar y Vivero Alto. El agua se almacena temporalmente en tres tanques con una capacidad de 12, 0000m³, la red de distribución del agua tiene una longitud de 54 kilómetros de tubería la cual lleva agua a todos los edificios del Campus.

Existen tres plantas de tratamiento de aguas residuales que brindan servicio al Campus, así como a algunas colonias aledañas, estas son: PTAR-Cerro del Agua, PTAR de la Facultad de Ciencias Políticas y PTAR-del Instituto de Ingeniería (PUMAGUA, 2009). La red de agua residual tratada que se reusa para riego tiene una longitud de cuatro kilómetros y en su manejo en ocasiones se almacena en 12 cisternas localizadas en distintos puntos del Campus universitario. (PUMAGUA, 2009).

Los sitios de muestreo considerados para este trabajo se observan en la Figura 1. Sitios de muestreo de agua subterránea y áreas verdes del Campus regadas con agua residual tratada.

Figura 1 .Sitios de muestreo en el Campus de Ciudad Universitaria



5. Métodos

El lavado y esterilización de materiales utilizados se llevó a cabo con base en los lineamientos de la *American Public Health Assosiation* 2005 (APHA), así como los métodos de toma y conservación de muestras. Los botes y bidones utilizados para la colecta de muestras fueron de polipropileno.

5.1. Métodos de campo

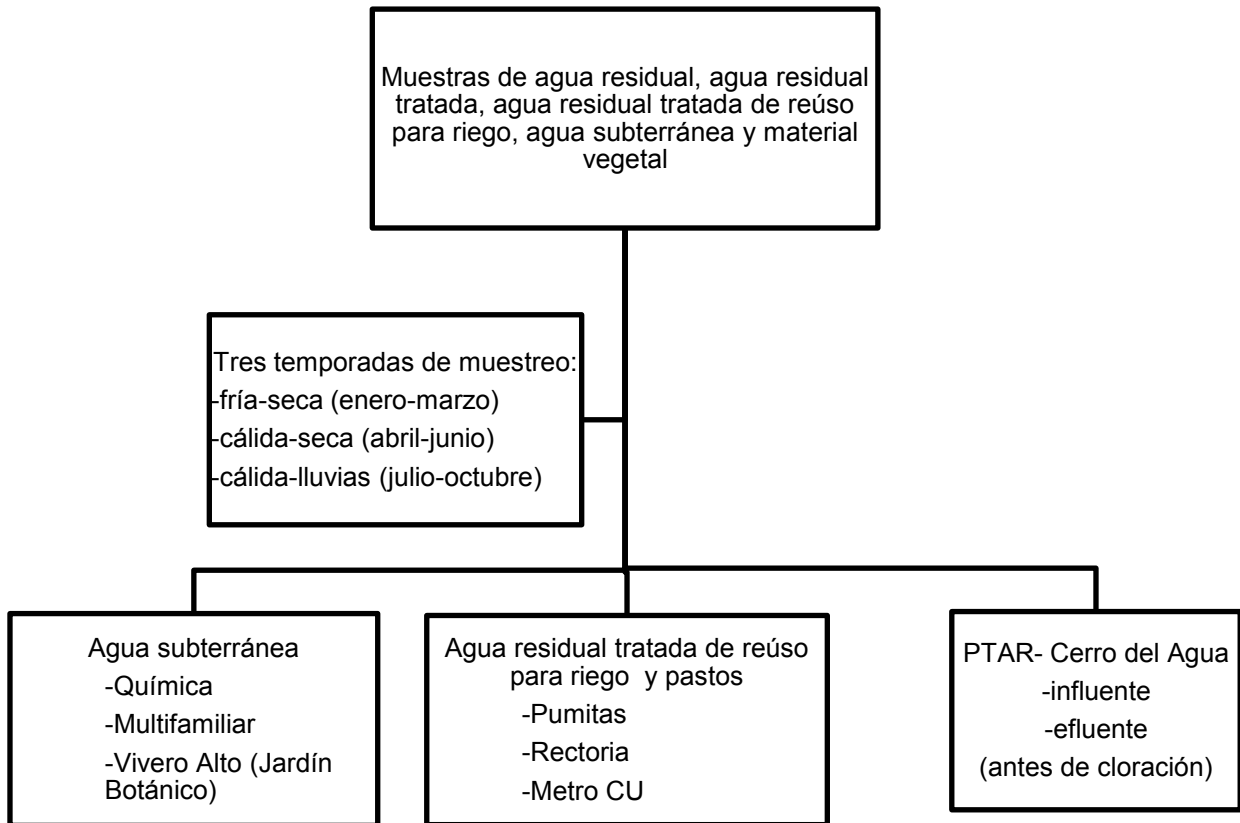
Se tomaron muestras de agua en los tres pozos de extracción que abastecen el Campus. El pozo Vivero Alto (Jardín Botánico), el pozo de la Facultad de Química y el pozo Multifamiliar, así como en el efluente y en el influente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR/ Cerro del Agua) del Campus. El criterio para elegir los sitios de muestreo de las áreas verdes regadas con agua residual tratada fue la afluencia de usuarios de estas áreas. Tales sitios fueron la explanada de Rectoría, las áreas verdes de la entrada al Metro CU (Bigotes) y las canchas deportivas de Pumitas.

Se tomaron muestras de agua y material vegetal durante tres temporadas de muestreo: temporada fría–seca, cálida-seca y cálida-lluvias, con el fin de detectar la presencia de colifagos.

Cabe resaltar que los datos obtenidos son antes del proceso de desinfección que para el caso de agua subterránea es la cloración.

Los criterios para definir las tres temporadas de muestreo fueron los cambios anuales de temperatura y precipitación, de acuerdo con los datos registrados durante cuatro años del 2004 al 2008. Estos datos fueron obtenidos de la Red Meteorológica del Gobierno del Distrito Federal y de la Red de Depósito Atmosférico (REDMET, 2004-2008; REDDA, 2004-2008). En la Figura 2 se muestra un resumen del diseño experimental

Figura 2 diseño del muestreo



En total se analizaron 135 muestras correspondientes a los cuatro tipos de agua procesadas para este trabajo. Las muestras fueron tomadas por triplicado en botes de polipropileno, 1L para agua residual y agua residual tratada, 10L para agua residual tratada de reuso para riego y 100L para agua subterránea. En la Tabla 2 se muestran el número de muestras correspondientes a cada sitio de muestreo.

Tabla 2. Número de muestras por sitio.

Sitio	Número total de muestras por tipo de agua	Número total de muestras por temporada (en las tres temporadas)
Agua residual (influyente PTAR-Cerro del Agua)	27	9
Agua residual tratada (efluente PTAR-Cerro del Agua)	27	9
Agua residual tratada de reúso para riego (Aspersor Bigotes)	27	3
Agua residual tratada de reúso para riego (Aspersor Islas)	27	3
Agua residual tratada de reúso para riego (Aspersor Pumitas)	27	3
Agua subterránea (Pozo Multifamiliar)	27	3
Agua subterránea (Pozo Química)	27	3
Agua subterránea (Pozo Vivero Alto)	27	3
Pasto Bigotes	27	3
Pasto Islas	27	3
Pasto Pumitas	27	3

5.2. Determinación de parámetros físico-químicos

Se determinaron en forma complementaria los parámetros físico-químicos de calidad del agua como pH, temperatura, sólidos disueltos totales (SDT) y

conductividad, para medirlos se utilizó un multiparámetros de campo de la marca HACH modelo Senion 156 (Loveland, Co).

5.3. Concentración de muestras de agua

Las muestras de agua se concentraron mediante el método de ultrafiltración (Polaczyk *et al.*, 2008) utilizando 100L de agua subterránea, y en el caso del agua residual tratada de reuso para riego se tomaron 10L, mismos que también fueron concentrados. Este método consiste en concentrar grandes volúmenes de agua, mediante cartuchos para hemodiálisis “Hemoflow” F80A (Fresenius Medical Care, North America Waltham, Ma) que tiene un corte de entre 15 y 20 KDa, los cuales previamente se preparan haciendo circular durante 30 minutos 1L de una solución al 0.1% de NaPP (polifosfato de sodio), que funciona como bloqueador del cartucho. A las muestras se les agregó NaPP para llegar a una concentración final de 0.1%; en este caso el NaPP favorece la desagregación en la muestra. Se circuló la muestra a través del cartucho de hemodiálisis por medio de una bomba peristáltica (MasterFlex L/S. Cole-Parmer Instrument Company. EUA). El volumen final del concentrado fue de 100mL, que se conservaron en refrigeración a -20°C hasta su análisis.

En el caso del agua de la PTAR-Cerro del Agua, no se concentraron las muestras, únicamente se conservaron 120mL. Se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis. Debido a la alta concentración de materia orgánica que presentaban las muestras.

5.4. Muestras de pastos

Para los pastos de las áreas verdes del Campus se colectaron 25gr utilizando tijeras estériles y guantes de nitrilo. En el laboratorio el pasto se eluyó con una solución estéril de PBS y NaCl 1 M, durante 30 minutos en agitación, la solución

obtenida se filtró utilizando filtros “Stericup” (Millipore) de 0.22 μ m. Las muestras fueron procesadas el mismo día en que fueron tomadas.

5.5. Cultivo de la bacteria hospedera

La bacteria hospedera utilizada fue *E. coli* K12–Hfr 3000 (ATCC 23631). Se prepararon 50mL de medio líquido TGYB (Bioxon) y una solución de Ca-glucosa en una proporción por cada 50mL de medio de agrega 0.5mL de calcio-glucosa para el crecimiento de la bacteria hospedera. Se colocó en el medio líquido TGYB 0.5mL de bacteria hospedera y se incubó alrededor de 12 horas a una temperatura de 37°C.

5.6. Ensayo en placa

La cuantificación de colifagos se realizó utilizando el método de doble capa de agar, tomando como base el protocolo certificado International Standard “Water quality- Detection and enumeration of bacteriophages” ISO 10705-1:1995. Brevemente, se mezclaron 0.5mL de la muestra y 0.5mL de bacteria hospedera (*E. coli* K12), en 5mL de agar semisólido de medio TGYB (Bioxon) y una solución de Ca-glucosa (calcio-glucosa) de acuerdo a las instrucciones de la ISO 10705-1. La mezcla de agar semisólido se vació en cajas Petri (100 X 15 cm) con medio TGYB sólido y solución Ca-glucosa previamente preparadas. Al medio semisólido de TGYB se le agrega solución de Calcio-glucosa en proporción de 1mL por cada 100mL. Una vez solidificado el medio, las cajas fueron incubadas por 18 horas a 37°C. Después del período de incubación, se realizó la cuantificación de las placas y los resultados se reportaron en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

Adicionalmente se determinó el límite de detección del método de doble capa de agar; se hicieron diluciones seriadas utilizando fago MS2 con un título conocido de

10^8 UFP/mL y la misma bacteria hospedera utilizada en este trabajo *E. coli* K12–Hfr 3000 (ATCC 23631). Se encontró que el límite de detección para este método está entre 10 y 1 UFP.

5.7. Determinación de coliformes y enterococos fecales

Se utilizó el método de filtración a través de membrana, que consiste en hacer pasar la muestra por una membrana de $0.45\mu\text{m}$ (Millipore), la cual se transfiere a cajas de Petri con medio específico, para los coliformes fecales se utilizó agar m-FC (BD Difco) y para los enterococos fecales se utilizó el medio KF Streptococcus (BD Difco), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para las muestras de agua subterránea se filtraron 100mL de agua, para pastos y agua residual tratada de reúso para riego se filtraron 10mL. En el caso de las muestras de agua residual se hicieron diluciones seriales (base 10), necesarias para poder realizar los conteos de CF y EF. Para las diluciones se utilizó una solución buffer de fosfato, se disolvieron 1.25mL de KH_2PO_4 y 5.0mL de MgCl_2 en un litro de agua destilada y posteriormente se esterilizó (Millipore, 1986). Los conteos de CF y EF se reportaron como UFC/100mL.

5.8. Análisis de datos

Se decidió transformar los datos a unidades logarítmicas, por la gran variabilidad que presentan (número de muestras, las distintas matrices de agua y matriz vegetal), así como por las unidades en las que están reportados los conteos, UFC/100mL y UFP, para un mejor manejo.

Se realizó un análisis del coeficiente de correlación, utilizando *Microsoft Office Excel 2007*, para evaluar la asociación entre dos variables que en este caso son los colifagos respecto a las bacterias indicadoras.

Se utilizó el programa estadístico *Statgraphics Centurion XVI* versión 16.0.09 para realizar un análisis de regresión logística, para evaluar la relación entre una variable dependiente, respecto a otras variables independientes en conjunto. Es decir los colifagos respecto a las bacterias indicadoras CF y EF utilizando la presencia y ausencia en función también de otros factores como la temporalidad.

6. Resultados

Los resultados se muestran primero por tipo de agua analizado, después por temporada de muestreo y posteriormente se presenta el análisis del material vegetal a fin de que sean observadas las diferencias entre los tipos de agua, el factor de la temporalidad y el efecto concentrador que se observa en el material vegetal analizado.

6.1 Análisis de resultados por tipo de agua

Se analizaron muestras de agua de cuatro tipos, agua residual, agua residual tratada, agua residual tratada de reúso para riego y agua subterránea, todas colectadas dentro del Campus de Ciudad Universitaria.

En la Tabla 3 se muestra un resumen de los resultados obtenidos por tipo de agua.

Tabla 3. Muestras positivas y cuantificación de indicadores por tipo de agua.

Microorganismos	Tipo de agua			
	Agua residual (n=27/27)	Agua residual tratada (n= 3/18)	Agua residual tratada para reúso (n=27/27)	Agua subterránea (n=8/27) ^α (n=2/27) ^β
Colifagos (UFP/mL)	$2 \times 10^2 - 8.6 \times 10^4$	$0.1 \times 10^1 - 3.66 \times 10^4$	$0.2 \times 10^1 - 8.9 \times 10^4$	$0.1 \times 10^1 - 1.99 \times 10^{2α}$
CF (UFC/100mL)	$2.6 \times 10^6 - 1.92 \times 10^8$	$9.2 \times 10^1 - 2.24 \times 10^2$	$3 \times 10^3 - 1.08 \times 10^5$	0.1×10^1 ^β
EF (UFC/100mL)	$3.8 \times 10^6 - 1.31 \times 10^8$	$9.2 \times 10^1 - 2.24 \times 10^2$	$4 \times 10^3 - 3.9 \times 10^5$	0.1×10^1 ^β

UFP: Unidad formadora de placa

UFC: Unidad formadora de colonia/100mL

6.1.1 Agua residual

Los conteos de colifagos que se presentaron en el agua residual fueron entre 2×10^2 y 8.6×10^4 UFP/mL. En cuanto al conteo de CF, en el mismo tipo de agua, se encontró entre 2.6×10^6 y 1.92×10^8 UFC/100mL; en caso de los EF se obtuvieron conteos entre 3.8×10^6 y 1.31×10^8 UFC/100mL.

Se realizó una regresión logística para identificar la relación entre la presencia y ausencia de los indicadores colifagos, CF y EF. El análisis mostró que no existe una diferencia significativa entre la presencia y ausencia de los Colifagos, CF y EF estudiados en este tipo de agua.

6.1.2 Agua residual tratada

Los conteos de los indicadores en agua residual tratada revelan que el proceso de tratamiento de la PTAR-Cerro del Agua remueve significativamente las bacterias indicadoras, sin embargo los colifagos fueron detectados, en concentraciones que van de 1 a 4 unidades logarítmicas. Este resultado es relevante considerando que los colifagos pueden ser indicadores de la presencia de virus entéricos y además proporciona la evidencia de que toleran mejor los tratamientos como la cloración que las bacterias indicadoras (Gerba, 2009d).

6.1.3 Agua residual tratada para riego

En el caso del agua residual tratada reutilizada para riego de las áreas verdes, los conteos de colifagos fueron entre 0.2×10^1 a 8.9×10^4 UFP/mL. Las bacterias indicadoras fueron detectadas en este tipo de agua. Se cuantificaron para CF y EF entre 3 y 5 unidades logarítmicas. Esto sugiere que existe un proceso que promueve el re-crecimiento o una re-contaminación en los sistemas de distribución

y cisternas de almacenamiento de agua tratada para reúso, dado que el agua que proviene de la PTAR-Cerro del Agua muestra conteos menores.

Para detectar la existencia de una relación entre la presencia y ausencia de las bacterias indicadoras y los colifagos se realizó un análisis de regresión logística, que mostró que no se encuentran diferencias significativas entre los tres indicadores para este tipo de agua.

6.1.4 Agua subterránea

En las muestras tomadas de agua subterránea, antes de la cloración, se presentaron en su mayoría ausencia de conteos. Para colifagos se detectaron entre 1 y 2 unidades logarítmicas. Los conteos de CF y EF para este tipo de agua los conteos fueron de 1 UFC/100mL. En la Tabla 4 se muestra un resumen de los conteos de agua subterránea.

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos durante las tres temporadas de muestreo en agua subterránea.

Microorganismos	Temporadas		
	Fría-seca (n=9/9)	Cálida-seca (n=1/9) ^β	Cálida- lluvias (n=2/9) ^α (n=3/9) ^ε
Colifagos			
Agua subterránea	ND	1.99 X 10 ² UFP/mL ^β	0.4 X 10 ¹ UFP/mL ^α 0.1 X 10 ¹ UFP/mL ^α 0.4 X 10 ¹ UFP/mL ^ε 0.6 X 10 ¹ UFP/mL ^ε 0.2 X 10 ¹ UFP/mL ^ε
CF			
Agua subterránea	ND	ND	ND
EF			
Agua subterránea	ND	ND	ND

ND: No detectable ≤ 1 UFP/mL o ≤ 1 UFC/100 mL.

^α Pozo Química

^β Pozo Multifamiliar.

^ε Pozo Vivero Alto

En las temporadas cálida-lluvias y cálida-seca no hubo conteos que revelaran la presencia de bacterias indicadoras CF y EF en las muestras de agua subterránea.

6.2 Análisis por temporada de muestreo

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante las tres temporadas de muestreo: fría-seca, cálida-seca y cálida-lluvias. Se realizó un análisis de coeficiente de correlación simple, con el fin de conocer el grado de asociación que presentan los tres indicadores estudiados, así como las variaciones que se presentan según la temporada.

6.2.1 Temporada fría-seca

Durante esta temporada los colifagos se detectaron en los cuatro tipos de agua estudiados. El agua residual presentó conteos entre 3.8×10^3 y 8.6×10^4 UFP/mL. El agua residual tratada y la residual tratada de reúso para riego, los conteos en placas para el agua residual tratada fueron de entre 1 y 1.8×10^3 UFP/mL, en el agua residual tratada de reúso para riego se cuantificaron entre 0.2×10^1 y 2.4×10^4 UFP/mL. Para el caso del agua subterránea en esta temporada todas las muestras resultaron negativas.

Los CF en agua residual tratada de reúso para riego se cuantificaron entre 3×10^3 y 1.08×10^5 UFC/100mL. Los EF se detectaron entre 4×10^3 y 3.90×10^5 UFC/100mL. Cabe señalar que para esta temporada en el sitio denominado Aspersor Pumitas no se encontraron muestras positivas de bacterias indicadoras, lo cual puede estar relacionado con el manejo del riego que realiza el personal encargado de jardines y mantenimiento de las áreas verdes del Campus. Por comunicación personal se sabe que queda a criterio del personal encargado usar agua residual tratada o agua subterránea de la red de distribución para el riego de las áreas verdes.

En esta temporada no se detectaron bacterias indicadoras ni en el agua residual tratada ni en agua subterránea.

Para conocer el grado de asociación entre los tres agentes indicadores se realizó un análisis de correlación simple para esta temporada, utilizando Microsoft Office Excel 2007 (Tabla 5).

El coeficiente de correlación entre los colifagos y CF fue de 0.86, en la caso de colifagos y EF fue de 0.83. El coeficiente de correlación entre ambas bacterias indicadoras fue de 0.97. Estos resultados muestran que las asociaciones entre los tres indicadores en esta temporada están relacionados de manera positiva muy

fuerte, lo cual significa que los tres indicadores son de utilidad para la evaluación de contaminación fecal. En la Tabla 5 se presenta un resumen de dichos resultados.

Tabla 5. Coeficiente de correlación ente organismos indicadores en la temporada fría-seca y tipo de asociación de acuerdo con Hernández -Sampieri *et al*, 2010.

Microorganismos	Coeficiente de correlación	Tipo de asociación
Colifagos-CF	0.86	Positiva muy fuerte
Colifagos-EF	0.83	Positiva muy fuerte
CF-EF	0.97	Positiva muy fuerte

En la Figura 3 se observan los conteos de los microorganismos indicadores estudiados en agua residual analizados durante esta temporada de muestreo.

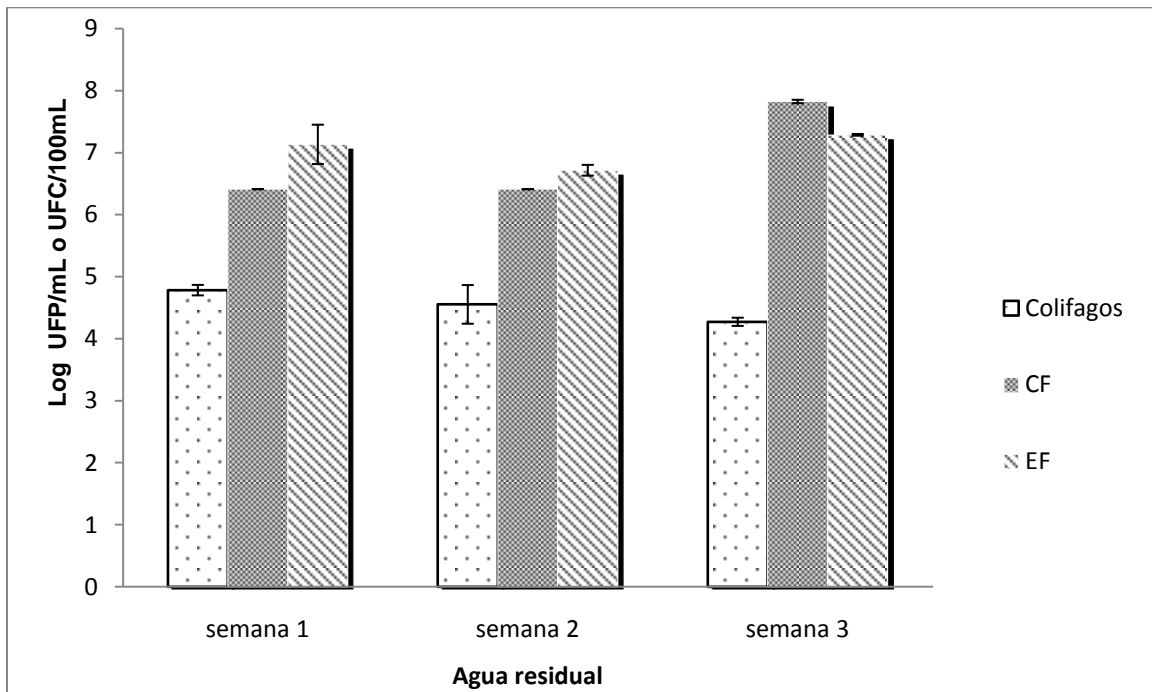
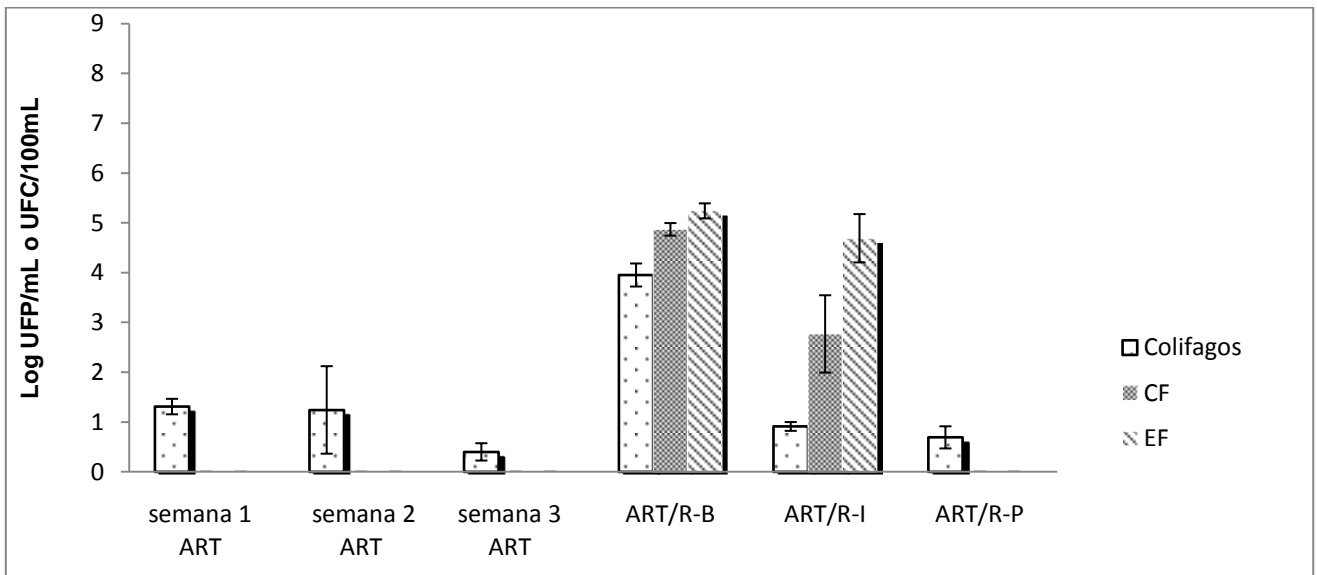


Figura 3. Indicadores en la temporada fría-seca en agua residual.

En la Figura 4 resalta la presencia de colifagos en las muestras de agua residual tratada, en la cual CF y EF no fueron detectados. Se observa una recontaminación de CF y EF en el agua residual tratada de reúso para riego.



ART: agua residual tratada; ART/R-B: agua residual tratada de reúso para riego-aspersor Bigotes; ART/R-I: agua residual tratada de reúso para riego-aspersor Islas; ART/R-P: agua residual tratada de reúso para riego-aspersor Pumitas.

Figura 4. Presencia de indicadores estudiados durante la temporada fría-seca en agua residual tratada y agua residual tratada de reúso para riego.

La persistencia de colifagos en esta temporada podría estar asociada con las bajas temperaturas, las cuales se ha reportado que favorecen la estabilidad de las proteínas de cápside del virus, conservando su estructura y protegiendo el material genético (Sinton *et al.*, 1999). También se observan conteos positivos de bacterias en el agua residual tratada de reúso para riego en dos sitios, el sitio Bigotes y el sitio Islas.

6.2.2 Temporada cálida-seca

En agua residual, agua residual tratada y agua residual tratada de reúso para riego los colifagos fueron detectados entre 1 y 4 unidades logarítmicas.

Para agua residual se obtuvieron conteos entre 2×10^2 y 2.4×10^4 UFP/mL; en agua residual tratada se presentaron entre 0.9×10^1 y 3.63×10^4 UFP/mL y el agua residual tratada de reúso para riego mostró conteos entre 0.3×10^1 y 8.9×10^4 UFP/mL.

Se detectaron colifagos en dos muestras de agua subterránea correspondientes al sitio de Pozo Multifamiliar; dos de nueve muestras fueron positivas entre 0.7×10^1 y 1.99×10^2 UFP/mL.

En el caso de las bacterias indicadoras en el agua residual tratada, los conteos fueron ≤ 1 UFC/100 mL, sin embargo, tres de nueve muestras fueron positivas. En CF, los conteos de las muestras oscilaron entre 1.54×10^2 y 2.24×10^2 UFC/100 mL. Para el indicador EF los conteos fluctuaron entre 9.2×10^1 y 1.18×10^2 UFC/100 mL. En las muestras de agua residual tratada para riego, sólo en el sitio denominado Islas se detectaron 1×10^3 UFC/100 mL CF y 3×10^4 UFC/100 mL EF.

El coeficiente de correlación en la temporada cálida-seca fue para el caso de colifagos y CF de 0.30, lo cual representa una correlación positiva débil, al igual que el caso de colifagos con EF, en la cual la correlación fue de 0.33; entre las bacterias indicadoras, el coeficiente de correlación fue de 0.96, mostrando claramente que existe una correlación positiva muy fuerte, como se muestra en la Tabla 6. La disminución de colifagos, durante esta temporada podría estar asociada con la radiación solar y la temperatura que se sabe afecta significativamente la estabilidad e infectividad de los virus (Love *et al.*, 2010).

Tabla 6. Coeficiente de correlación en la temporada cálida-seca y tipo de asociación, de acuerdo con Hernández-Sampieri *et al*, 2010.

Microorganismos	Coeficiente de correlación	Tipo de asociación
Colifagos-CF	0.30	Positiva débil
Colifagos-EF	0.33	Positiva débil
CF-EF	0.96	Positiva muy fuerte

En la Figura 5 se muestran los conteos de colifagos respecto a las bacterias indicadoras estudiadas. Al igual que en la temporada fría-seca se observa la presencia de colifagos en agua residual, aunque los conteos disminuyeron para esta temporada (cálida-seca).

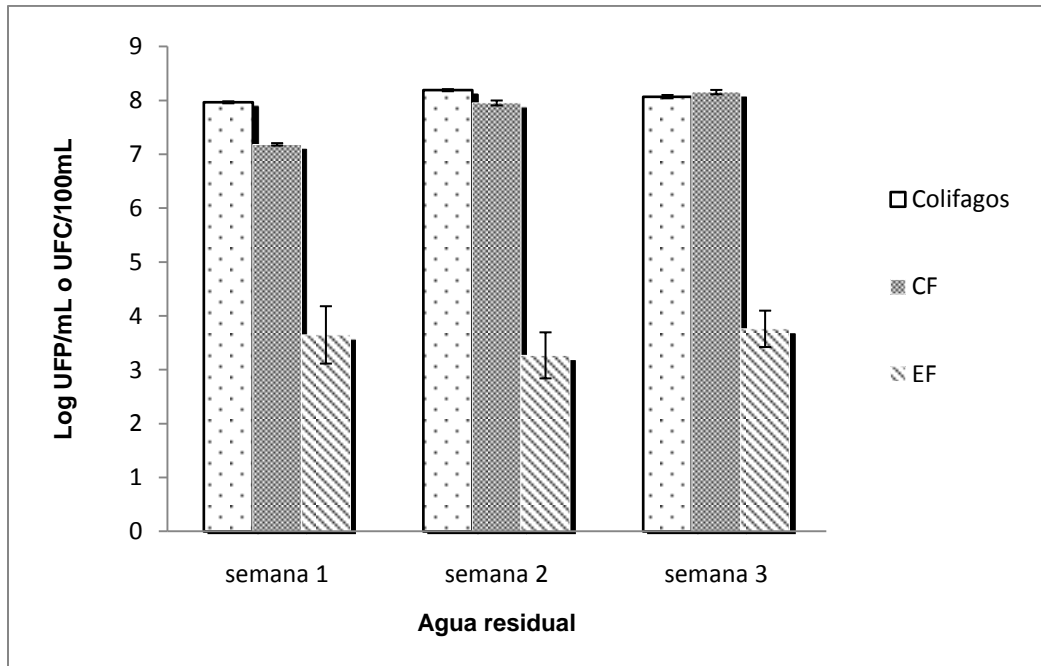
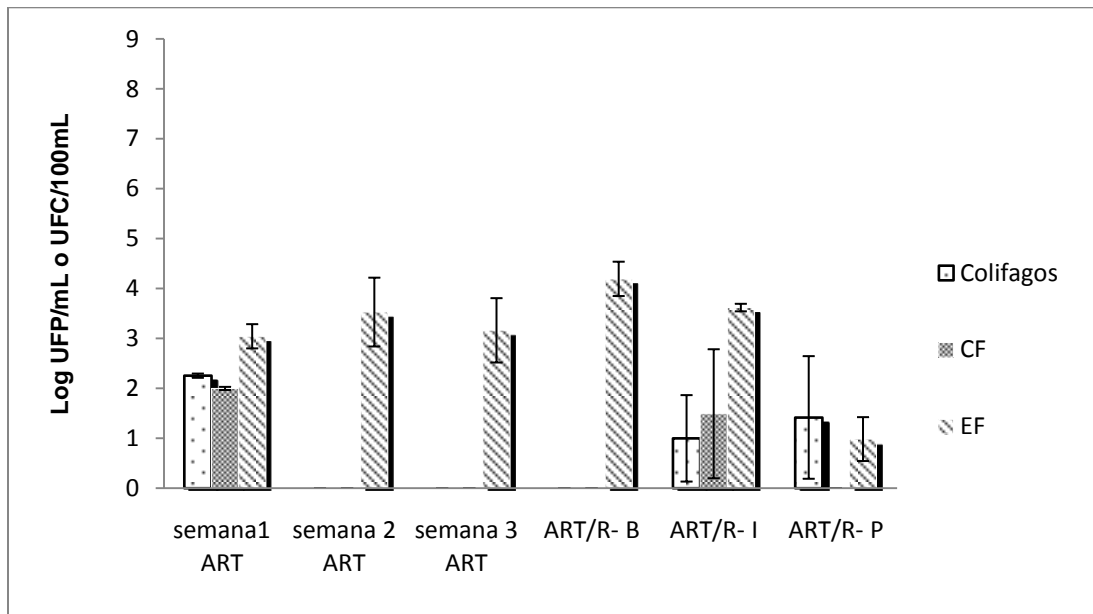


Figura 5. Microorganismos indicadores estudiados respecto a la temporada cálida-seca en agua residual.

En la Figura 6 se observa una disminución en los conteos de colifagos y un aumento en la presencia de CF y EF en agua residual tratada y agua residual tratada de reúso para riego durante la temporada cálida-seca, en comparación con la temporada fría-seca. Resalta también el sitio denominado Bigotes, el cual presentó el mayor número de conteos de colifagos. La presencia de EF fue mayor en esta temporada.



ART: agua residual tratada; ART/R-B: agua residual tratada de reúso para riego-aspersor Bigotes; ART/R-I: agua residual tratada de reúso para riego-aspersor Islas; ART/R-P: agua residual tratada de reúso para riego-aspersor Pumitas.

Figura 6. Agua residual tratada y agua residual tratada de reúso para riego.

6.2.3 Temporada cálida-lluvias

Durante esta temporada el agua residual que llega a la PTAR-Cerro del Agua no recibe ningún tratamiento, se asume que el volumen de agua de lluvia que llega a la PTAR tiene un efecto de dilución sobre los contaminantes. Por otro lado no hay capacidad para tratar el volumen de agua que entra a la PTAR durante esta temporada, así que sólo se tomaron muestras del agua que entra a la PTAR-Cerro del Agua y no a la salida. En esta temporada no se usa el agua para regar, debido a que las lluvias sustituyen los requerimientos de agua de las áreas verdes, por lo que no se analizó el agua de reúso para riego.

Los colifagos que se presentaron en el agua residual de la PTAR-Cerro del Agua, fluctuaron ente 2.70×10^2 y 3.32×10^4 UFP/mL.

En agua subterránea, se obtuvieron dos muestras positivas de colifagos en el sitio Pozo Química, se obtuvieron dos muestras con valores de 0.1×10^1 y 0.4×10^1 UFP/mL; en el sitio Pozo Vivero Alto se obtuvieron muestras positivas de colifagos, cuyos valores oscilaron ente 0.6×10^1 y 2×10^1 UFP/mL.

En la temporada cálida-lluvias, se encontró la mayor asociación entre los tres indicadores estudiados. Del análisis de correlación simple se obtuvo que los colifagos y los CF presentan un coeficiente de correlación del 0.91. Entre los colifagos y EF se encontró un coeficiente de correlación de 0.92 y entre las bacterias indicadoras (CF y EF) fue del 0.99. Existe una correlación positiva muy fuerte ente los tres agentes indicadores para esta temporada de cálida-lluvias. En la Tabla 7 se resumen los coeficientes de correlación para esta temporada.

Tabla 7. Coeficiente de correlación entre organismos indicadores en la temporada cálida-lluvias y tipo de asociación, de acuerdo con Hernández-Sampieri *et al*, 2010.

Microorganismos	Coeficiente de correlación	Tipo de asociación
Colifagos-CF	0.91	Positiva muy fuerte
Colifagos-EF	0.92	Positiva muy fuerte
CF-EF	0.99	Positiva muy fuerte

Como ya se mencionó anteriormente, durante esta temporada no se reúsa el agua proveniente de la PTAR-Cerro del Agua para riego, por lo tanto no existen datos para este tipo de agua. En la Figura 7 se muestra la tendencia de los conteos de los tres indicadores.

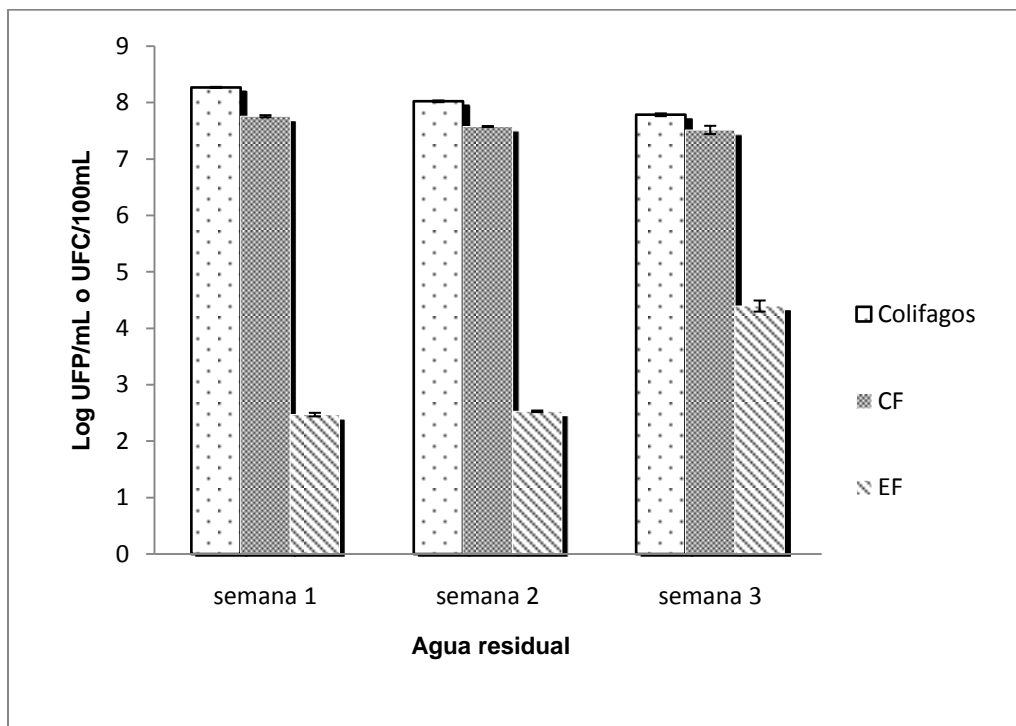


Figura 7. Tendencia de los tres indicadores durante la temporada lluvias-cálida en agua residual.

En la Tabla 8 se muestra un análisis de correlación simple, considerando todas las muestras de las tres temporadas.

Tabla 8. Análisis de correlación para todas las muestras de las tres temporadas y tipo de asociación, de acuerdo con Hernández-Sampieri *et al*, 2010.

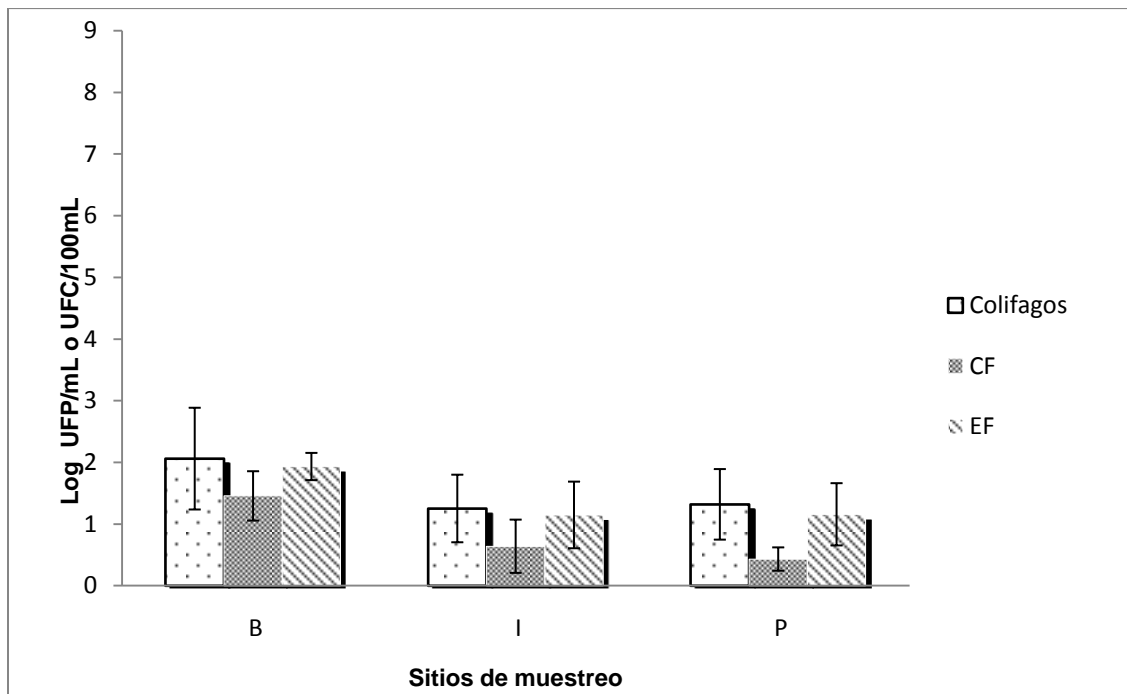
Microorganismos	Coefficiente de correlación	Tipo de asociación
Colifagos-CF	0.64	Positiva considerable
Colifagos-EF	0.65	Positiva considerable
CF-EF	0.97	Positiva muy fuerte

6.3 Matriz vegetal

El análisis de pasto de las áreas verdes del Campus mostró durante el periodo estudiado la presencia de colifagos entre 0.1×10^1 y 5.9×10^3 UFP/mL. En el caso de las bacterias indicadoras las CF se encontraron entre 2×10^1 y 2.1×10^4 UFC/100 mL; los EF entre 0.6×10^1 y 9.2×10^4 UFC/100mL.

Específicamente para la temporada fría-seca los conteos de colifagos fueron entre 1 y 5.9×10^3 UFP/mL. Los CF se presentaron entre 0.2×10^1 y 2.19×10^2 UFC/100mL y los EF oscilaron entre 2.0×10^1 y 2.03×10^2 UFC/100mL.

En la Figura 8 se observan los conteos de pastos obtenidos durante la temporada fría-seca, resalta el sitio Bigotes con mayor número de conteos de colifagos.

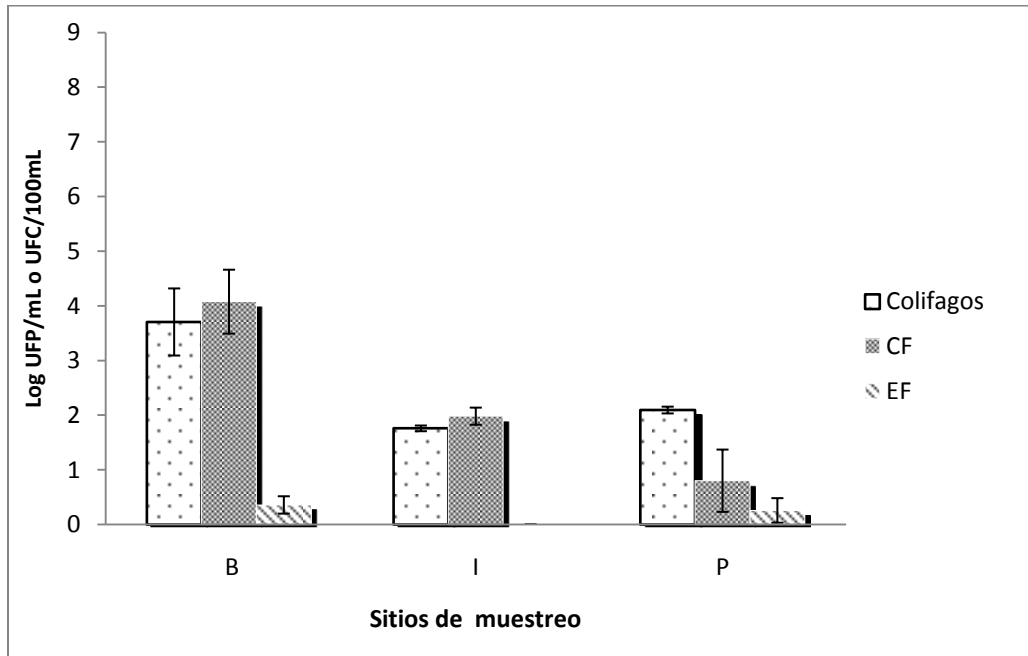


B: pasto Bigotes; I: pasto Islas; P: pasto Pumitas.

Figura 8. Conteos de microorganismos indicadores en pastos durante la temporada fría-seca.

Durante la temporada cálida-seca se observa una disminución en el número de colifagos, entre 0.1×10^1 y 0.6×10^1 UFP/mL. Las bacterias indicadoras sin embargo estuvieron presentes para CF entre 4.4×10^1 y 3.32×10^4 UFC/100mL; en el caso de EF los conteos fueron entre 0.2×10^1 y 9.22×10^4 UFC/100mL.

La Figura 9 presenta los conteos de los microorganismos indicadores durante la temporada cálida-seca en pastos de las áreas verdes del Campus. Se observa una disminución en los conteos de colifagos y un aumento de conteos de bacterias indicadoras alternativas, en la sección de discusión se abordará este resultado. Al igual que en la temporada fría-seca, durante la temporada cálida-seca el sitio Bigotes presenta los mayores conteos de CF y EF.



B: pasto Bigotes; I: pasto Islas; P: pasto Pumitas.

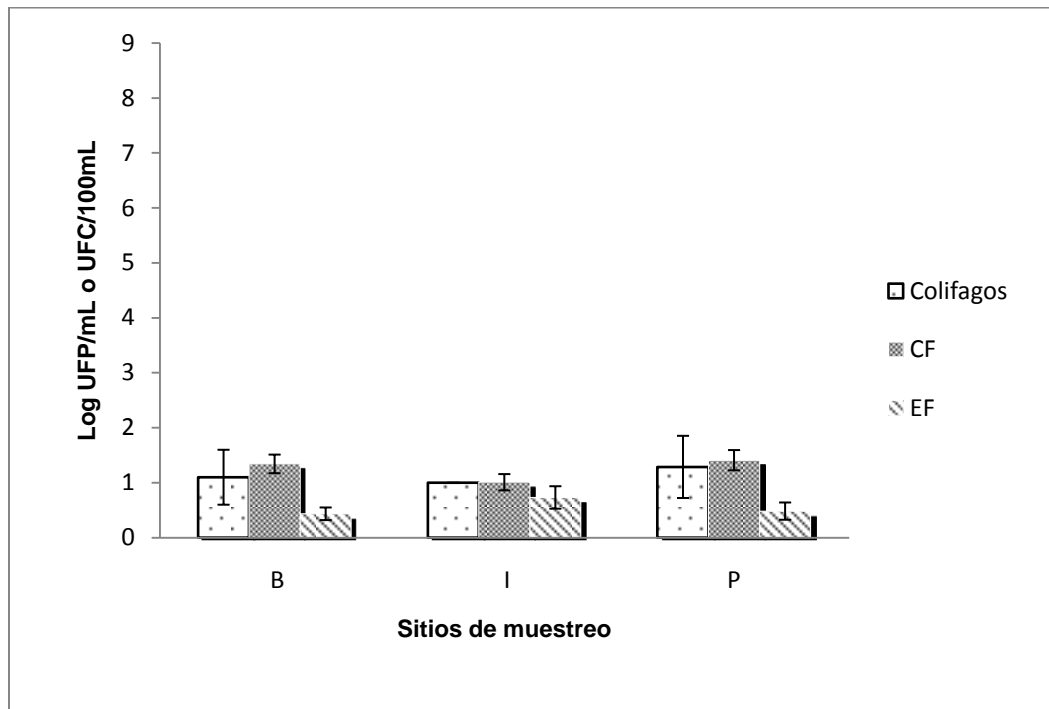
Figura 9. Conteos de los indicadores estudiados en pasotos durante la temporada cálida-seca.

En la temporada cálida-lluvias se obtuvieron conteos de entre 0.2×10^1 y 1.3×10^1 UFP/mL para el caso de colifagos; los CF mostraron conteos que oscilaron entre 1.0×10^1 y 1.34×10^2 UFC/100 mL y para EF los conteos fueron entre 0.6×10^1 y 6.4×10^1 UFC/mL.

Cabe resaltar que el pasto del sitio denominado Bigotes mostró una mayor densidad tanto de colifagos como de bacterias, lo cual sugiere que el agua con la que se riega esta área presenta posiblemente un fenómeno de re-crecimiento bacteriano.

En la Figura 10 se muestran los resultados de los conteos obtenidos en pasto durante la temporada cálida-lluvias. Los resultados se pueden asociar a un efecto

de dilución debido a las lluvias, se detectaron colifagos, CF y EF en los pastos analizados.



B: pasto Bigotes; I: pasto Islas; P: pasto Pumitas.

Figura 10. Conteos de microorganismos indicadores en pastos durante la temporada cálida-lluvias.

Los conteos de bacterias indicadoras es mayor en los meses cálidos y los colifagos tuvieron mayores conteos durante las temporadas frías y lluviosas. Esto se discutirá más adelante ya que dentro del Campus se utilizan cisternas como sitios de almacenamiento de agua residual tratada que posteriormente se utiliza para riego.

En la Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos en la matriz vegetal respecto a los indicadores utilizados.

Tabla 9. Resultados por sitio de muestreo de la matriz vegetal.

Sitios de muestreo	Microorganismos		
	CF (UFC/100 mL)	EF (UFC/100mL)	Colifagos (UFP/mL)
Pastos Bigotes	$0.6 \times 10^1 - 3.2 \times 10^4$	$0.14 \times 10^2 - 3.3 \times 10^4$	$0.1 \times 10^1 - 5.9 \times 10^3$
Pasto Islas	$0.2 \times 10^1 - 0.70 \times 10^2$	$0.6 \times 10^1 - 1.56 \times 10^2$	$0.1 \times 10^1 - 1.07 \times 10^2$
Pasto Pumitas	$0.4 \times 10^1 - 1.66 \times 10^2$	$0.2 \times 10^1 - 1.28 \times 10^2$	$0.1 \times 10^1 - 1.01 \times 10^2$

7. Discusión

Ciudad Universitaria es un sitio complejo para su estudio tanto por el número de usuarios, como por la heterogeneidad que presenta su población que incluye estudiantes, académicos, trabajadores y visitantes. La problemática que presenta el manejo del agua dentro del Campus es similar a lo que se vive en áreas del sur de la Ciudad de México.

El estudio de los tres indicadores, tanto bacterianos como virales resulta ser un medio apropiado para conocer el estado de la calidad del agua en el Campus. Se encontraron diferencias entre los tipos de agua analizados, así como en las tres temporadas estudiadas, en el muestreo que duró un año.

Los colifagos demostraron ser un indicador confiable de la calidad del agua y más sensible, en comparación con las bacterias indicadoras estudiadas. Ejemplo de esto son las muestras de agua subterránea en las que no fueron detectadas bacterias indicadoras pero si colifagos.

Se encontraron los tres microorganismos estudiados en casi todos los tipos de agua analizados, así como en el material vegetal, pero los casos más interesantes fueron los de agua residual tratada, agua residual tratada de reúso para riego y el material vegetal analizado en este trabajo, ya que en el agua residual tratada, las muestras no presentaron bacterias indicadoras, pero sí hubo presencia de colifagos. En el agua residual tratada de reúso para riego se encontraron muestras positivas tanto de bacterias indicadoras como colifagos lo cual sugiere un recrecimiento, que se estaría dando dentro de los sistemas de almacenamiento debido a los periodos de tiempo prolongados en los que el agua residual tratada es almacenada antes de su reúso. Esto tendría que estudiarse más a fondo. Sin embargo, Alonso *et al.*, (2004), encontraron que el recrecimiento en agua residual tratada puede estar asociado a la concentración de nutrientes y a que a pesar de

su tratamiento persisten en el agua. El almacenamiento del agua y el tiempo de residencia dentro del sistema de tratamiento y desinfección también pueden favorecer el re-crecimiento. Por otro lado Gerba (2009c), menciona que la formación de biopelículas de microorganismos dentro de los sistemas de almacenamiento, como pipas de agua o cisternas, se produce con el paso del tiempo, ya que se va perdiendo la acción del desinfectante en el agua, en este caso el cloro, promoviendo el recrecimiento de bacterias como las coliformes.

En un estudio realizado en bebederos del Campus I Facultad de Medicina de “Triangulo Mineiro” en Brasil por Santana de Oliveira y Sarreta-Terra. (2004), se detectaron conteos positivos de coliformes totales y fecales en muestras de agua que permanecieron almacenadas durante periodos prolongados de tiempo. En cambio, en las muestras de agua tomadas en sitios donde el agua fluía constantemente y había recambio, la calidad del agua era considerablemente mejor.

El hecho de que algunas muestras de agua subterránea mostraron la presencia de colifagos activos es un resultado que debe resaltarse por dos aspectos: el primero a que su presencia evidencia contaminación fecal en la fuente de abastecimiento de agua; el segundo aspecto es la presencia potencial de otro tipo de virus, que daría pauta para que se realicen análisis para la detección de virus entéricos en la fuente de abastecimiento, lo cual se confirmó con la detección de genomas de virus entéricos en las mismas muestras de agua (Silva, en prep)

Las áreas verdes regadas con agua residual tratada de reúso del Campus son sitios con alta densidad de usuarios. Durante los siete días de la semana se llevan a cabo diversas actividades tanto culturales como recreativas que incluyen: ingesta de alimentos, descanso, lectura, convivencia, juegos de pelota, paseos en bicicleta y paseo de mascotas, esta última actividad es más frecuente durante los fines de semana. El contacto de los usuarios con las áreas verdes es constante y prolongado. Según encuestas realizadas por el proyecto PUMAGUA el contacto

por usuarios habituales es de al menos una hora diaria y una de las actividades que se lleva a cabo es el consumo de alimentos. Por lo tanto existe exposición a las bacterias y virus presentes en el agua de reúso y en el pasto (PUMAGUA, 2009).

La presencia de colifagos y las bacterias estudiadas en las muestras de material vegetal analizadas en este trabajo presentaron variaciones durante las temporadas de muestreo. Durante la temporada fría-seca los conteos de colifagos fueron mayores que los de las bacterias indicadoras, incluso se presentaron sitios de muestreo en donde exclusivamente se obtuvieron muestras positivas de colifagos como se observa en los resultados. En la temporada cálida-seca, existió una disminución en el número de colifagos respecto a las bacterias y finalmente en la temporada cálida-lluvias se presentó una disminución en el número de conteos de los tres indicadores, siendo los colifagos el indicador que presentó menor número de conteos en comparación con las bacterias indicadoras. Sin embargo, los tres indicadores estuvieron presentes en los tres sitios de muestreo de pastos.

Esta variabilidad en la presencia de los indicadores en las temporadas estudiadas, se puede explicar por varios factores que afectan la estabilidad de los indicadores fecales y virales, que son la temperatura, el pH, la predación entre los organismos, pero un factor poco estudiado y poco entendido, que cada vez tiene mayor impacto es la radiación solar, la cual se ha reportado en diversos trabajos como un bactericida importante, y se ha considerado uno de los principales mecanismo de inactivación de virus (Sinton *et al.*, 1999; Love *et al.*, 2010).

En la temporada fría-seca, la radiación solar y la temperatura son menores respecto a las temporadas cálida-seca y lluvias-cálida, los virus tiene más tolerancia a bajas temperaturas, con esto se puede llegar a conservar su cápside y material genético. Las bacterias son más sensibles a la temperatura baja porque, limita su crecimiento y reproducción. Los virus prevalecen por más tiempo en

temperaturas bajas en comparación con las bacterias indicadoras (Espinosa-García *et al.*, 2008).

La radiación solar puede ser una explicación para la notoria disminución de los colifagos durante la temporada cálida-seca (de marzo a mayo). La temperatura que se presenta durante estos meses en las áreas verdes, no es suficiente para la formación del pili de las bacterias hospederas de los colifagos. Al no formarse el pili, se evita la replicación del colifago. La radiación UV-B daña el material genético de los virus, principalmente aquellos cuyo material genético es de ARN o ADN de cadena sencilla y virus desnudos. El efecto de la radiación UV-B limita la replicación de los virus entéricos (Espinosa *et al.*, 2009). La resistencia de los microorganismos a la luz UV-B sigue el mismo patrón que la resistencia a los desinfectantes químicos. La radiación ultravioleta afecta directamente el ADN o ARN de los microorganismos. A una longitud de onda de aproximadamente de 260 nm provoca el bloqueo de la replicación y la transcripción del ácido nucleico, promueve la dimerización de la timina, y en los virus, es el genoma el que recibe el daño, consecuentemente se provocan daños estructurales en la cubierta proteica del virus y el efecto directo es la disminución de la capacidad de infectividad del virus en su hospedero (Espinosa *et al.*, 2008; Bitton, 2005). Las bacterias indicadoras resisten la radiación solar, porque presentan mecanismos de reparación eficaces que les permiten reparar los daños en su material genético por efecto de la radiación UV-B y poder así replicarse en ambientes diversos (Meng y Gerba, 1996).

Sinton *et al.* (1999), realizaron un trabajo con indicadores CF, EF y Bacteriófagos ARN-F en agua de mar contaminada con agua residual, en la que encontraron que durante el invierno (temperaturas entre 8°-10°C) el coeficiente de inactivación para los CF y EF fue mayor que para los colifagos. En promedio para los meses cálidos (con temperaturas de entre 14° y 20°C) el coeficiente de inactivación fue menor para los coliformes y enterococos fecales que para los colifagos. En este trabajo se encontró un patrón similar, a pesar de que nuestro país se localiza en latitudes

intertropicales, en donde las temperaturas alcanzadas durante los meses de verano son mayores (temperaturas que oscilan entre los 21°C y los 28°C) y los inviernos no son tan extremos (con temperaturas que oscilan entre los 18°C a 20°C) en comparación con países del hemisferio norte donde se han realizado los trabajos sobre este tema, estos datos de temperatura para el sur del Distrito Federal, México (REDMET, 2009).

Otro aspecto que es importante considerar es la factibilidad técnica y económica del uso de colifagos como indicadores, ya que el método utilizado es sencillo y de bajo costo. Una prueba para la detección de colifagos por el método de doble capa de agar tiene un costo aproximado de \$200.00 MN, en comparación con una prueba molecular para la detección de virus que cuesta aproximadamente de \$1,000.00 MN. Para desarrollar el método de doble capa de agar se requiere instalaciones de un laboratorio de microbiología y el análisis lo puede realizar personal con entrenamiento en microbiología básico. Esto nos permite concluir que los colifagos pueden ser un indicador adecuado a las posibilidades económicas de países como México.

La normatividad vigente, la NOM-127-SSA1 de agua para uso y consumo humano establece los límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Incluye organismos coliformes totales, *E. coli*, CF u organismos termotolerantes; pero no contempla otros microorganismos como protozoarios y virus, ni especifica las dosis infecciosas de los posibles organismos patógenos presentes en el agua. Sería importante revisar y modificar esta norma incluyendo indicadores de contaminación microbiológica del agua complementarios a los que se consideran, ya que las enfermedades transmitidas por el agua representan un riesgo importante para la salud de los usuarios que consumen y que están en contacto con el agua. Prueba de lo anterior son los reportes del Boletín Epidemiológico Nacional donde se informan más de 4 mil casos de enfermedades gastrointestinales mal definidas y/o debidas a virus.

En el caso del agua de reúso, la Norma Oficial Mexicana NOM-003 establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios públicos. Esta norma únicamente se consideran los CF y huevos de helminto como indicadores microbiológicos; 240 NMP/mL (número más probable por mililitro) CF para contacto directo y 1000 NMP/mL para contacto indirecto u ocasional. En el caso de huevos de helminto es de ≤ 1 h/L (huevo por litro) para contacto directo y para contacto indirecto u ocasional de ≤ 5 h/L. En este caso los resultados de los conteos de CF en agua de reúso indican que se rebasa la norma, se tienen datos de más de tres unidades logarítmicas en agua de reúso para riego, así como en el material vegetal que aparentemente presenta un efecto acumulativo de organismos indicadores. En el Campus se presenta principalmente el contacto indirecto, lo cual implica una exposición para los usuarios de las áreas verdes regadas con agua residual tratada del Campus.

La cloración ha sido utilizada desde el siglo XX y es efectiva siempre y cuando el manejo de las dosis de cloro sean adecuadas (Love *et al.*, 2010). En Ciudad Universitaria el único método de desinfección utilizado es la cloración, la cual se ha visto no es suficiente para la eliminación de patógenos como los virus. Se han sugerido otros métodos complementarios, como la radiación UV, la cual ha alcanzado una gran popularidad porque no produce efectos carcinogénicos o tóxicos, no quedan residuos de desinfectante y no presentan problemas de exceso de olor o sabor, como ocurre en el caso del cloro. Sin embargo, algunas de sus desventajas son los altos costos y la dificultad para determinar la dosis adecuada de radiación UV para eliminar patógenos (Abbaszadegan *et al.*, 1997)

El ozono (O₃) es también utilizado como método de desinfección. Es de mayor costo que la cloración, pero tiene la ventaja que no produce subproductos como lo son los trihalomentanos que son potencialmente cancerígenos. El ozono es un mejor oxidante que el cloro, ya que no deja ningún residuo en el agua. El tratamiento con ozono es por lo general seguido por cloración, esto es necesario para prevenir el recrecimiento de bacterias. La acción del ozono establece

complejos orgánicos en el agua con el paso de tiempo, que sirven como sustratos para el crecimiento de bacterias en el sistema de distribución de agua.

El ozono parece tener el mismo efecto que el cloro, la disrupción de la permeabilidad de la membrana en las bacterias, deteriorado la función enzimática y la integridad de las proteínas por la oxidación de los grupos sulfhidrilo, además de una desnaturalización de los ácidos nucleicos. En el caso de virus, el ozono destruye los ácidos nucleicos y produce lisis celular (Alonso *et al.*, 2004; Bitton, 2005).

8. Conclusiones

- El uso de colifagos como indicadores de contaminación fecal del agua es confiable puesto que proporciona mayor información respecto a las bacterias indicadoras tradicionales acerca de la contaminación fecal en el agua; cumplen con los criterios de un buen indicador de contaminación, ya que son más resistentes a condiciones ambientales adversas y a tratamientos de desinfección del agua, en comparación con las bacterias indicadoras convencionales, como se encontró en este trabajo.
- La estacionalidad y la temperatura son factores importantes para el manejo de los distintos tipos de agua, así como para los usos finales a los que se destinará. Son variantes importantes en lo que se refiere al análisis de calidad del agua, ya que afectan directamente la presencia de los indicadores microbiológicos estudiados, como se puede observar con los resultados obtenidos en esta tesis.
- Este trabajo es importante para comprender las formas de residencia de los patógenos en el agua, ya sea en los sistemas de distribución o almacenamiento, en los pastos regados con agua residual tratada, en el agua residual y en el agua subterránea. Brinda información sobre indicadores de la calidad del agua para zonas tropicales, ya que la mayoría de los trabajos de investigación sobre este tema están reportados para países con condiciones muy distintas a las nuestras y para otros tipos de agua.
- El monitoreo de la calidad del agua es una herramienta importante en la prevención de riesgos para la salud, tanto para las personas como para el ambiente. Es conveniente incluir indicadores alternativos como son los colifagos con el fin de ampliar la información que existe sobre patógenos

presentes en el agua, a fin de reducir los riesgos asociados a esta matriz ambiental, para mejorar los estándares de calidad del agua en nuestro país.

9. Referencias

- Abbaszadegan, M; Hasan, M.N; Gerba, C.P; Roessler, P.F; Wilson, B.R; Kuennen, R; y Van Dellen, E. (1997). The disinfection efficacy of a point-of-use water treatment system against bacterial, viral and protozoan waterborne pathogens. *Water Res.* 31: 574-582.
- Ackermann, H.W. (2006). *The Bacteriophages*, second edition. En Richard Calendar (Ed). Capítulo 2. Classification of Bacteriophages (pp. 8-16). Nueva York.
- Alonso, E; Santos, A y Riesco, P. (2004). Micro-organism Re-growth in Wastewater Disinfected by UV radiation and Ozone: a micro-biological study. *Environmental Technology*. Vol. 25: 433-441.
- Anónimo, (1995). ISO 10705-1: Water quality—Detection and enumeration of bacteriophages-part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- APHA, (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21^{ava} edición. Centennial Edition. Estados Unidos. pp. 10-166.
- Arcos, M. P., Ávila, S.L., Estupiñán S.M., Gómez, A.C. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA - Publicación Científica*. 3 (4) Julio - Diciembre. 1-116
- Ashbolt, N.J; Grabow, O.K; y Snozzi, M. (2001). Indicators of microbial water quality- Pp. 259-315. En L. Fewtrell y J. Bartram (eds.) *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. IWA Publishing. Londres.
- Bitton, G. (2005). *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss, New York. Block, S.S. (1991). *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Fourth Ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Carter M. J. (2005). Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1354–1380.
- Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). *Boletín Epidemiología Semana* 52 año 2009. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2009/sem52/index.htm>

- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2008). En Estadísticas del agua en México 2008. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (ed). Capítulo 3. Usos del agua (pp 53-63). México.
- Diario Oficial de la Federación. Modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. México, D.F., Publicado el 20 de octubre de 2000.
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997. Los límites máximos permisibles de contaminación para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. México, D.F., Publicado el 21 de septiembre de 1998.
- Dirección General de Planeación-UNAM. Portal Estadístico Universitario (PEU). (2009). <http://www.estadistica.unam.mx/mail.php>
- Escalante, V., Cardoso, L., Ramírez, E., Mantilla, G., Montecillos, J., Servín, C., Villavicencio, F. (2003). El reúso del agua residual tratada en México. Seminario Internacional sobre métodos naturales para el tratamiento de aguas residuales. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Espinosa-García, A.C.y Mazari-Hiriart, M. (2008). Solar Radiation and Enteric Virus Presence in Irrigation Water. 13th ICID (International Society for Infectious Diseases) - Kuala Lumpur, Malaysia- June 19-22. Sesión: Public Health and Prevention.
- Espinosa-García, A.C; Arias, C.F; Sánchez-Colón, S; y Mazari-Hiriart, M. (2009). Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. Environmental Health, 8 (49): 1-34.
- Estación Meteorológica CCH-Sur. PEMBU-CCA-UNAM (2009). http://pembu.atmosfcu.unam.mx/~cchs/datos/actual_plantel.php
- Estadísticas del Agua en México. Comisión Nacional del Agua (CNA). Edición (2008). pp 228. México.
- Geldreich, E.E. (1990). Microbial quality control in distribution systems. En: Pontius, F.W. (ed), Water Quality and Treatment, 4a edición. AWWA (American Water Works Association), McGraw-Hill, Inc., Nueva York.

- Gerba C.P. (2009a). The Bacteriophages, second edition. En Richard Calendar (Ed). Capítulo 45. Bacteriophages as Pollution Indicators (pp. 695-700). Nueva York.
- Gerba, C. P (2009b). Environmental Microbiology 2da edición. En: Maier R., Pepper I. y Gerba C.P. Capítulo 23. Indicator Microorganisms (pp. 485-496). Ed Elsevier Academic Press. China.
- Gerba, C.P. (2009c). Environmental Microbiology, 2da edición. En Maier, R.M; Pepper, I.L y Gerba, C.P (eds.) Capítulo 25. Drinking water treatment (pp. 531-538). Elsevier-Academic Press. China.
- Gerba, C.P. (2009d). Environmental Microbiology. Segunda edición. En: Maier R., Pepper I. y Gerba C.P. Capítulo 26 .Disinfection (pp.540-551). Ed Elsevier Academic Press. China.
- Hernández-Sampieri, R; Fernández-Collado, C y Baptista-Lucio, P. (2010). En metodología de la Investigación, quinta edición. Capítulo 10. Análisis de los datos cuantitativos (pp. 311-314). Ed MacGrawHill/Interamericana. México.
- Hodkinson, I.D y Jackson, J.K. (2005). Terrestrial Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring, with Particular Referent to Mountain Ecosystems. Environmental Management, 35: 649-666.
- Jiménez B. (2006). Irrigation in Developing Countries Using Wastewater. International Review for Environmental Strategies. Vol. 6, No (2): 229-250.
- Jiménez B. y Garduño, H. (2001). Social, Political and Scientific, Dilemmas for Massive Wastewater. Reuse in the world. In Navigating Waters. Ethical Issues in the water industry. Davis and McGin Editors. AWWA.
- Jiménez Blanca. (2009). Risk and integrated management of the urban water cycle in megacities of the developing world: Mexico City. Water and Urban Development Paradigms. Feyen, Shannon y Neville (eds), (pp. 387-396). Londres.
- Jofre, J. (2002). Bacteriophage indicators. En Bitton G. (ed.) Encyclopedia of Environmental Microbiology (pp. 354-363). Nueva York.
- Jofre, J., Bosch, R. Lucerna, R. Girones, y Tartera, C. (1986). Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. Water Sci. Technol, 18: 167-173.
- Kai, S., Wantanabe, S., Furuse, K., Furuse, A., Osawa, A. (1985). *Bacteroides* bacteriophages isolated from human feces. Microbiol. Immunol, 29: 895-899.

- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V., Delattre, J.M. (2000). Bacteriophages as indicators of enteric virus and public health risk in groundwater. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 5-21.
- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V., Delattre, J.M. (2000). Bacteriophages as indicators of enteric virus and public health risk in groundwater. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 5-21.
- Love, D.C; Silverman, A y Nelson, K.L. (2010). Human Virus and Bacteriophage Inactivation in Clear Water by Simulated Sunlight Compared to Bacteriophage Inactivation at a Southern California Beach. *Environ. Sci. Technol*, 44(18): 6965-6970.
- Meng, Q.S., y Gerba C.P. (1996). Comparative inactivation of enteric adenovirus, polio virus and coliphages by ultraviolet irradiation. *Water Res.* 30: 2665-2668.
- Ouyang, Y, Nkedi-Kissa, P, Wu, Q.T, Shinde, D, Huang, C.H. (2006). Assessment of seasonal variations in surface water quality. *Water Research*, 40: 3800-3810.
- Pillai S.D. (2006). Bacteriophages as Fecal Indicator Organisms. In: Goyal, S.M (ed). *Viruses in foods*. Springer-Verlang (pp. 205-218). Nueva York.
- Polaczyk, A.L, Narayanan J.; Cromeans T.L, Hahn D., Roberts J.M, Amburgey J.E, Hill V.R. (2008). Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 73: 92–99.
- Pulido M.P, Ávila de Navia S.L, Estupiñán S.M, Aura Cristina Gómez- Prieto A.C. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA*. Vol.3 No. (4):1-116.
- PUMAGUA, UNAM. (2009). <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html> <http://www.torreingenieria.unam.mx/PUMAGUA.html>
- Reynolds, K. A. (2001). Introducción a las Enfermedades Microbianas Propagadas a Través del Agua. *Agua Latinoamérica*. Julio/agosto.
- Reynolds, K.A. (2004). De la llave: Daño colateral: La secuela crónica de los patógenos propagados por el agua. *Agua Latinoamérica*. Nov/dic.
- Santana de Oliveira, A.C y Sarreta-Terra, A.P. (2004). Microbiological evaluation of water from drinking-fountains at Cmpus-I of Facultad de Medicina do Triangulo Mineiro by the presence of total and fecal coliforms. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37 (3): 285-286.

- Sardin, T.R., Dowd, S.E., Herman, D.C., Maier, R.M. (2009). Environmental Microbiology. 2da edición. Capítulo 6. Aquatic Environments (pp. 103-119). Ed. Elsevier. China.
- Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. (2009). <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/boletin.htm>
- Silva Magaña Atl Miguel. Uso de indicadores virales para la evaluación de la calidad de agua en Ciudad Universitaria, México. Facultad de Ciencias, UNAM en preparación.
- Sinton, L.W; Finlay, R.K y Lynch, P.A. (1999). Sunlight Inactivation of Fecal Bacteriophages and Bacteria in Sewage-Polluted Seawater. Applied and Environmental Microbiology, 65(8): 3605-3613.
- Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México. REDMET Bases de datos temperaturas año 2009. México.
http://www.sma.df.gob.mx/simat2/informaciontecnica/index.php?opcion=5&opciondifusion_bd=90
- Sistema de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México. REDMET – Red Meteorológica y REDDA. (2004-2008). México.
<http://www.sma.df.gob.mx/simat2/informaciontecnica/index.php?opcion=1&opcionimat=7>
- Toranzos, G.A; McFeters, G.A; Borrego, J.J; y Savill, M. (2007). Capítulo 20. Detection of Microorganisms in Environmental Freshwaters and Drinking Waters, (pp 249-260). En Hurst, C.J; Crawford, R.L; Garland, J.L; Lipson, D.A; Mills, A.L; y Stetzenbach, L.D (eds). Manual of Environmental Microbiology 3era Edición. ASM Press .Estados Unidos, Washington, D.C.
- Torres Beristain Beatriz (1999). Tesis de maestría: Uso de indicadores biológicos de calidad de agua subterránea en una zona de la ciudad de México. México, D.F. Instituto de Ecología, UNAM. Pp. 63.
- Water Microbiology. Laboratory and Field Procedures. Millipore Corporation (1986). Bedford-Massachusetts, EUA. pp. 1-32.
- World Health Organization (2003). Emerging Issues in Water and Infectious Disease WHO press. Francia.
- World Health Organization. Guidelines for Drinking-Water quality. (2001). http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwg3rev/en/index.html