



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**USO DE INDICADORES VIRALES PARA LA
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE AGUA POTABLE Y DE REUSO EN
CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MIGUEL ATL SILVA MAGAÑA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ANA CECILIA ESPINOSA GARCÍA



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Silva

Magaña

Miguel Atl

04455 2091 0201

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

404094119

2. Datos del tutor

Dra.

Ana Cecilia

Espinosa

García

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Marisa

Mazari

Hiriart

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Irene

Pisanty

Baruch

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Rosa Elena

Sarmiento

Silva

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Lourdes Teresa

Lloret

Y Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

Uso de indicadores virales para la
evaluación de la calidad de agua subterránea
y de reúso en Ciudad Universitaria, México.

80 p.

2013

*Este trabajo se lo dedico a mis padres quienes siempre estuvieron a mi lado
y me apoyaron incondicionalmente en las buenas y en las malas.*

Agradecimientos

Al proyecto PUMAGUA y al Instituto de Ingeniería UNAM que me proporcionó una beca y los recursos necesarios para la realización de todo el trabajo.

Al Dr. Fernando González Villarreal coordinador del proyecto PUMAGUA y al Dr. Rafael Val Segura del Instituto de Ingeniería, UNAM por permitirme trabajar en este proyecto.

A mí directora de tesis y mi maestra de vida la Dra. Ana Cecilia Espinosa García por todo su apoyo, paciencia y gran enseñanza durante toda la realización el proyecto sin la cual no podría haber terminado.

A la Dra. Marisa Mazari por apoyarme desde un principio, por todos sus comentarios y por depositar en mí la confianza del trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Carlos Díaz por todo su apoyo en el desarrollo del muestreo y en el análisis de resultados.

A la Dra. Rocío Cruz quien muy amablemente me prestó equipo para centrifugación y pesaje de su laboratorio

A la Dra. Laura Tovar por sus útiles consejos en las técnicas moleculares.

A las doctoras Rosa Elena, Lourdes Lloret y la M. en C. Irene Pisanty por formar parte de mi jurado.

A mi compañera de equipo, muestreo y demás cosas que surgieron en el camino Alejandra Fonseca con la cual el trabajo se hizo menos pesado.

A Toño Tapia por su apoyo en lo que fuera y cuando fuera necesario “gracias hermano”.

A Rosa por su apoyo durante la realización de los experimentos y las largas jornadas.

A Gustavo por todos sus comentarios acertados.

A Ceci Rangel por acompañarnos a los muestreos y más por ser mi maestra de manejo.

Indudablemente a Vania quien es una parte fundamental de mi vida, gracias por tus consejos y levantarme el ánimo en los momentos amargos, guapa.

A los compañeros del laboratorio, los que están y los que se fueron, por todos sus comentarios y pláticas inolvidables Emilio, Jaz, Yoli, Irma, Nallely, Jaqueline, Juan, Diana, Erik.

A todos los amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias que me apoyaron muy en especial a Luis, Claudia, María, Gonzalo, Marce, Chio, Romano, Ángel, Rocío, David, Alfredo y Tania por sus consejos.

A todos los demás amigos y compañeros que no menciono pero que estuvieron a mi lado y me brindaron su amistad durante la carrera.

Contenido

	Pág.
Índice de tablas	iii
Índice de figuras	iv
Resumen	v
1. Introducción	
1.1 Calidad de agua en México.....	1
1.2 Enfermedades causadas por virus entéricos.....	2
1.3 Indicadores de calidad del agua.....	6
1.4 Enterovirus.....	8
1.5 Adenovirus.....	9
1.6 Métodos de detección.....	12
1.7 Métodos de concentración.....	14
2. Antecedentes	16
3. Justificación	19
4. Objetivos	
4.1 Objetivo general.....	21
4.2 Objetivos particulares.....	21
5. Hipótesis	22
6. Área de estudio	22
7. Método	
7.1 Diseño de muestreo.....	25
7.2 Muestreo de agua y pasto.....	26
7.3 Concentración de muestras de agua.....	27
7.4 Lavado y concentración de muestras de pasto.....	27
7.5 Métodos de análisis	
7.5.1 Análisis fisicoquímicos.....	28
7.5.2 Análisis bacteriológicos.....	28
7.5.3 Análisis virales	
7.5.3.1 Curva patrón.....	29
7.5.3.2 Extracción de RNA y DNA.....	30
7.5.3.3 Cuantificación de enterovirus	30

7.5.3.4 Cuantificación de adenovirus F	31
7.6 Análisis de datos.....	33
7.7 Esquema general de trabajo.....	34
8. Resultados	
8.1 Temperatura y pH.....	35
8.2 Resultados de bacteria y virus por tipo de agua	
8.2.1 Agua residual.....	36
8.2.2 Agua residual tratada.....	37
8.2.3 Agua residual tratada de reúso en riego	37
8.2.4 Agua subterránea.....	38
8.2.5 Análisis de correlación.....	39
8.3 Resultados por temporada de muestreo	
8.3.1 Temporada fría-seca.....	40
8.3.2 Temporada cálida-seca.....	42
8.3.3 Temporada cálida-lluvias.....	44
8.3.4 Matriz vegetal.....	46
8.4 Análisis de varianza.....	48
9. Discusión.....	50
10. Conclusiones.....	57
Literatura consultada	58

Índice de tablas

Tabla 1. Diversas clases de virus transmitidos por el agua, que afectan principalmente al humano y las enfermedades que pueden causar modificado de (Gerba <i>et al.</i> , 2007).	3
Tabla 2. Cantidad de radiación UV necesaria para la inactivación de diferentes microorganismos en agua.....	11
Tabla 3. Volumen (L) o peso (gr) de muestras de agua y pasto colectadas en cada punto de muestreo.....	26
Tabla 4. Cantidad de muestra procesada por medio de filtración a través de membrana	29
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este estudio y sus características relevantes.....	32
Tabla 6. Resumen de los valores promedio de temperatura para las muestras durante las diferentes temporadas.....	35
Tabla 7. Resumen de los valores promedio de pH para las muestras durante las diferentes temporadas.....	36
Tabla 8. Resumen de la cuantificación de los diferentes indicadores por tipo de agua.....	38
Tabla 9. Resumen del análisis de correlación para los diferentes indicadores por tipo de agua.....	39
Tabla 10. Análisis de varianza para comparar datos microbiológicos entre temporada fría-seca, cálida-seca y cálida-lluvias del ciclo 2009 para los diferente muestreos en Ciudad Universitaria.....	49

Índice de figuras

Figura 1. Zonas de muestreo de los diferentes tipos de agua y matriz vegetal en Ciudad Universitaria.....	24
Figura 2: Esquema que representa el procedimiento para determinar la presencia de CF, EF, EV y AdV en diferentes tipos de agua del <i>campus</i> de Ciudad Universitaria.	34
Figura 3. Conteos de los diferentes indicadores para agua residual y residual tratada durante la temporada fría-seca.	41
Figura 4. Conteos de los diferentes indicadores en residual tratada de reúso en riego durante la temporada fría-seca.	42
Figura 5. Conteos de los diferentes indicadores en agua residual y residual tratada durante la temporada cálida-seca.	43
Figura 6. Conteos de los diferentes indicadores en residual tratada de reúso en riego durante la temporada cálida-seca.	44
Figura 7. Conteos de los diferentes indicadores en agua residual y residual tratada durante la temporada cálida-lluvias.	45
Figura 8. Conteos de los diferentes indicadores en pastos durante la temporada fría-seca.....	46
Figura 9. Conteos de los diferentes indicadores en pastos durante la temporada cálida-seca.	47
Figura 10. Conteos de los diferentes indicadores en pastos durante la temporada cálida-lluvias.....	48

RESUMEN

Las bacterias indicadoras usadas tradicionalmente para detectar contaminación fecal en agua no son representativas de la presencia de virus entéricos. Muchos de los virus entéricos son causantes de una gran cantidad de enfermedades gastrointestinales, sobre todo en países en desarrollo y es importante considerarlos como agentes de importancia epidemiológica. Las partículas virales son más resistentes que las bacterias a los métodos comunes de desinfección. Por este motivo es importante contar con un indicador específico de contaminación viral que se adapte a las necesidades Mexicanas en cuanto a costos, capacidades de monitoreo y comportamiento bajo las diferentes condiciones climáticas.

El *campus* de CU, en el Distrito Federal, se presenta como un lugar adecuado para estudios piloto de calidad del agua ya que cuenta con su propio sistema de extracción para abasto de agua de consumo, además de un sistema de tratamiento de agua residual que en su conjunto presenta problemas de manejo similares a los de una ciudad pequeña.

En este trabajo se realizó un muestreo durante tres temporadas para el ciclo 2009 tomando agua de diferentes tipos: residual, residual tratada, de reúso, agua subterránea, así como también pasto regado con agua de reúso del *Campus* CU. Las muestras de agua se concentraron por el método de ultrafiltración en todos los tipos de agua excepto en el agua residual, con el fin de detectar partículas virales. Las muestras de pasto se sometieron a una elución para separar las partículas virales de la superficie vegetal.

Se midieron los parámetros fisicoquímicos pH y temperatura para cada muestra, se determinaron bacterias coliformes fecales (CF) y enterococos fecales (EF) por el

método de filtración de membrana, se detectaron enterovirus (EV) y adenovirus F (AdV) por medio de la cuantificación de genomas utilizando la técnica de PCR en tiempo real.

El método de tratamiento biológico de la Planta de Tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria (PTARCU) es efectivo para la remoción de bacterias pero no es efectivo para la eliminación de adenovirus F; lo que puede indicar que tampoco otros grupos virales sean removidos con efectividad. Se detectó la presencia de bacterias indicadoras y virus entéricos en el agua de reúso lo que puede sugerir un recrecimiento bacteriano en los sitios de almacenamiento y una acumulación de partículas virales.

En el análisis del agua de reúso para riego, el número de bacterias supera los límites permisibles por la normatividad mexicana vigente en calidad del agua y se detectaron genomas virales de adenovirus F, lo que representa un riesgo potencial para la población que acude a las áreas verdes del *Campus*. Virus y bacterias fueron detectados en agua subterránea lo que da evidencia de contaminación del agua subterránea posiblemente por infiltración. No se observó una correlación entre las bacterias indicadoras, EV y AdV en varios de los tipos de agua muestreados por lo que es recomendable contar con un indicador de contaminación fecal viral adecuado, que evidencie su presencia en cuerpos de agua de forma más específica para las partículas virales.

De los dos virus propuestos como indicadores de contaminación viral en agua, adenovirus se considera el mejor candidato ya que es más resistente a métodos de tratamiento y condiciones ambientales debido a su cápside y por tener DNA como material genético. Su presencia puede indicar la presencia de otros grupos virales de riesgo. A pesar de que en este estudio se trató de encontrar un método rápido y barato para detección de virus, sigue siendo costoso para una detección rutinaria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Calidad de agua en México

El tema del abastecimiento del agua es un problema a nivel global y que se vislumbra como uno de los más grandes retos en los próximos años, sobre todo en países en los que la falta de agua es muy evidente. Esta escasez de agua puede estar relacionada con su posición geográfica y con el inadecuado manejo del recurso, lo cual se complica cuando se suman las condiciones políticas y sociales presentes en un momento dado (Carabias *et al.*, 2005).

La calidad del agua se puede definir solo de acuerdo con el uso final que se le dará. Esto es un factor determinante para la salud ambiental y para la salud pública, ya que el agua está asociada a la transmisión de enfermedades que afectan la salud humana, ya sea por ingestión directa, mediante la contaminación de alimentos o por el contacto con agua contaminada. La calidad del agua es un aspecto directamente relacionado con la calidad de vida de la población como lo señala la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) en 2006 y la UNESCO en 2003.

Algunos autores señalan que en México los problemas de calidad del agua son severos y existe un rezago en su atención sobre todo si se compara con el abastecimiento de agua y la provisión de servicios a la población, que no va a la par con la atención en la calidad final del agua (Carabias, *et al.*, 2005).

La información en materia de la calidad de agua debe ser parte importante en el proceso de la toma de decisiones de desarrollo urbano, del abastecimiento a la población y del tratamiento del agua para su reúso. La epidemiología toma esta información para la resolución de problemas y considera que el agua es un medio muy importante para la transmisión de enfermedades. Sin embargo la información en materia

del agua es confusa, no se publica en forma actualizada, es poco accesible y es poco usada por el aparato gubernamental para la toma de decisiones (Aboites *et al.*, 2008). El sector que más se ve afectado en este sentido es la población infantil que presenta el 68% de las enfermedades relacionadas con el agua, la higiene y un saneamiento adecuado (WHO, 2006).

Dentro de los asentamientos humanos se generan focos infecciosos particularmente en lugares con alta densidad poblacional. Para el caso de este estudio se considera a la Ciudad de México que cuenta con un número aproximado de 9 millones de habitantes y junto con la Zona Metropolitana tiene más de 20 millones de habitantes (INEGI, 2010). Esto hace necesario el estudio de la presencia de agentes potencialmente patógenos dentro de los sistemas de abastecimiento de agua y del agua de reúso.

1.2 Enfermedades causadas por virus entéricos

Uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial son las enfermedades gastrointestinales de origen hídrico y para países en desarrollo son un problema primario (Mazari *et al.*, 2005). Éstas son causadas por una gran diversidad de agentes como las bacterias, los parásitos y los virus, por lo que el potencial infeccioso de muchos de estos agentes permanece aún desconocido (Desselberger y Gray, 2005).

Dentro de los agentes infecciosos están los virus. Se sabe que son una causa importante de enfermedades gastrointestinales, particularmente en infantes y en niños pequeños (menores de 5 años) de bajos recursos (Maier *et al.*, 2009). Se ha reportado que cerca de 500 mil niños mueren anualmente por infecciones con rotavirus sobre todo en países en desarrollo (Parashar, 2006), así como también por brotes de gastroenteritis provocados por astrovirus en casas de cuna (Marshall *et al.*, 2007). Los

virus entéricos no solo son agentes causales de enfermedades gastrointestinales sino que también están relacionadas con otro tipo de afecciones como meningitis, hepatitis y miocarditis entre otros.

Algunos ejemplos de enfermedades causadas por virus entéricos se muestran en la Tabla 1, que muestra la relevancia creciente de su estudio para la salud pública.

Tabla 1. Diversas clases de virus transmitidos por el agua que afectan principalmente al humano y las enfermedades que pueden causar (modificado de Gerba *et al.*, 2007)

FAMILIA	GENERO	NOMBRE COMÚN	ENFERMEDAD CAUSADA
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	Poliovirus Coxsackievirus, A, B	Parálisis, meningitis y fiebre. meningitis, enfermedades respiratorias, miocarditis, anomalías del corazón, comezón, pleurodinia.
		Echovirus	Meningitis, fiebre, enfermedades respiratorias, comezón, gastroenteritis.
<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepatovirus</i>	Hepatitis A	Hepatitis
<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus humano	Gastroenteritis (aguda en niños)
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus humano	Gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis.
<i>Caliciviridae</i>	<i>Calicivirus</i>	Calicivirus humano Virus Norwalk SRSV Hepatitis E	Gastroenteritis. Gastroenteritis y fiebre. Gastroenteritis. Hepatitis.
<i>Astroviridae</i>	<i>Astrovirus</i>	Astrovirus humano	Gastroenteritis.
<i>Parvoviridae</i>	<i>Parvovirus</i>	Parvovirus humano	Gastroenteritis.
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i>	Coronavirus humano	Gastroenteritis, enfermedades respiratorias.
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	Norovirus humano	Gastroenteritis.

Las partículas de virus gastrointestinales pueden ser transmitidas de persona a persona por medio de la ruta fecal-oral, siendo los medios de transmisión de mayor importancia el agua contaminada y los alimentos (Divizia *et al.*, 2004). Una persona infectada puede excretar 10^{11} partículas virales por cada gramo de heces (Maier *et al.*, 2009) y pueden permanecer en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo ya que son en su mayoría mucho más resistentes a los métodos de desinfección tradicionales (Espinosa-García *et al.*, 2008).

En enfermedades causadas por virus entéricos se estima que la dosis infectiva van desde 1 a 10 partículas virales (Toranzos *et al.*, 2007), mientras que la dosis infectiva de otros organismos patógenos como bacterias coliformes pueden ser de 10^4 a 10^6 (Maier *et al.*, 2009), lo que hace que sean un importante punto a considerar cuando se detecta su presencia en el agua para consumo, o bien en al agua de reúso con contacto directo o indirecto con humanos.

Debido a su tamaño y su carga electrostática, los virus pueden agregarse y/o adsorberse en diferentes superficies, lo que les brinda protección contra condiciones desfavorables que puedan provocar su destrucción o inactivación. Gracias a esta protección, los virus puede prolongar su estancia en cuerpos de agua y en superficies como los vegetales (Reynolds, 2001; Vega, 2006).

En México no se cuenta con una norma que considere a los virus entéricos dentro de los indicadores de calidad del agua para uso y consumo humano. Lo anterior puede deberse a la falta de datos reales, al poco conocimiento de las enfermedades causadas por estos agentes y a la falta de capacidad técnica y de personal especializado para llevar a cabo esta labor.

En algunos países se considera a algunos virus entéricos como agentes de importancia en la salud pública en materia del agua. En Estados Unidos de América, por ejemplo, la Agencia para la Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés), que está encargada de la calidad del agua, considera a los virus entéricos como un parámetro común en el manejo de agua potable. En ese país desde el 2009 se realiza una revisión para incluir a los virus entéricos como indicadores virales de hepatitis A y E, enterovirus, calicivirus, enterovirus y rotavirus (EPA, 2009).

En Canadá se considera en sus lineamientos de calidad para el agua de beber a norovirus, hepatitis A, enterovirus, y adenovirus. La dependencia responsable de la salud pública señala además que los procesos de tratamiento deben ser capaces de reducir por lo menos cuatro unidades logarítmicas de los virus presentes en agua que se destinará al consumo humano (Health Canada, 2004).

En los últimos años se han realizado avances importantes en la detección, cuantificación y estudio de la resistencia de los virus en el ambiente, tanto si son patógenos humanos como de otros animales, pese a ello aún no se conoce su comportamiento, papel e importancia dentro de los sistemas ambientales (Espinosa-García *et al.*, 2004). Tampoco se tiene clara la relación entre diversos factores ambientales con su transmisión y persistencia, lo que puede generar graves problemas de salud cuando el hombre expande sus territorios a diversos ambientes naturales (Scott *et al.*, 2002). Es por ello que el aporte de datos obtenidos en diferentes sistemas ambientales es importante para un mejor conocimiento de las interacciones y procesos relacionados con su presencia y permanencia.

En el caso particular de los virus que son de interés para la salud pública se necesitan datos que puedan ser analizados para generar modelos predictivos y poder controlar enfermedades y posibles epidemias (Noble *et al.*, 2001).

1.3 Indicadores de calidad del agua

El mantenimiento de la calidad microbiológica del agua para beber, de la usada en actividades recreativas así como el agua de reúso es necesario, debido a que la contaminación de esos sistemas puede traer como consecuencia importantes riesgos para la salud humana, con los efectos económicas y sociales concomitantes (Scott *et al.* 2002). Para ello es necesario contar con diferentes marcadores que nos puedan indicar el estado de la calidad del agua. Esto nos permitirá tomar las medidas necesarias en caso de ser necesario para cumplir con los parámetros establecidos.

Aunque las bacterias coliformes fecales y totales se han usado tradicionalmente como indicadores de la calidad del agua, por más de un siglo (Desmarais *et al.*, 2002), en los últimos años se han propuesto nuevos indicadores, debido a que ha sido reportado que estas bacterias presentan algunas características que las limitan para indicar la presencia de otros patógenos no bacterianos (Skraber *et al.*, 2004). Además, se ha establecido que están presentes en el intestino de otros mamíferos, y que pueden replicarse en el agua y suelo de ambientes tropicales y templados (Rivera *et al.*; 1988,, Toranzos, 1991), por lo que es necesario conocer más sobre su presencia en lugares con condiciones diferentes a las templadas como las prevalecientes en los países del norte donde se han realizado la mayor parte de los estudios. De de esta manera conocer los factores que afectan su dinámica en países como el nuestro (Scott *et al.*, 2002).

Dentro de la búsqueda de nuevos indicadores que nos permitan conocer el estado de contaminación del agua, los virus entéricos tienen ventajas frente a otros microorganismos indicadores como lo son su resistencia en sistemas acuáticos, su relación directa con el humano, (debido a que se conocen serotipos que afectan específicamente al hombre) y su replicación nula en el agua, debido a que requieren de una célula hospedero (Noble *et al.*, 2001). Se sabe también que no existe una relación directa entre la presencia de indicadores bacterianos y la presencia de virus entéricos en el agua lo que deja en duda el nivel de riesgo a la salud si no son detectados adecuadamente (Gerba *et al.*, 1979).

El principal problema para la detección de virus en agua es que su número puede ser muy bajo en los diferentes sistemas naturales o artificiales en los que se encuentran. Esto hace necesaria una concentración previa a la identificación y cuantificación. Debido a esto en algunos casos es requerido un gran volumen de muestra que una vez concentrada, debe someterse a técnicas de detección de partículas virales más específicas (Scott *et al.*, 2002) como son las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativo (q-PCR), inmunoensayos e inmunofluorescencia.

Cada uno de los indicadores presenta un comportamiento diferente en el ambiente ya que su resistencia está ligada a las características físicas de cada uno, como la constitución de la cápside viral o el tipo de material genético, así como a las condiciones medio ambientales en las que se encuentre, como el pH del agua, la temperatura y la radiación solar. Estas mismas características hacen que los métodos de tratamiento de agua para la disminución de estos organismos sea diferente para cada caso y, consecuentemente, tenga que ser evaluada caso por caso (Torres, 1999).

La EPA considera a varios tipos de virus como candidatos recomendados para ser usados en la detección de contaminación viral en agua y alimentos, entre los que figuran los adenovirus y enterovirus (EPA, 2007). También se señala que el mejor indicador varía en función de la situación geográfica, social y económica del lugar donde se aplica, por lo que es necesario realizar estudios *in situ* para tomar la mejor decisión (EPA, 2007; Payment y Locas, 2011).

1.4 Enterovirus

Los enterovirus (EV) son un grupo viral que se encuentra dentro de la familia picornaviridae, que también incluye a los rinovirus y virus de la hepatitis A. Se conocen cerca de 64 serotipos de enterovirus distintos que pueden infectar a los humanos; dentro de este grupo se incluyen a poliovirus, coxsackie virus de los grupos A y B (CVA y CVB), enterovirus y echovirus (Muir *et al.*, 1999). Tienen un tamaño aproximado de 20 a 30 nm y su genoma es de RNA positivo monocatenario, por lo tanto se incluyen en el Grupo IV de la Clasificación de Baltimore. Su genoma está conformado de una sola hebra, contiene una región no codificante (UTR) en su genoma en el extremo 5' que es muy conservada entre los enterovirus (Fields, 2006).

Los enterovirus presentan una cápside que está formada por cuatro proteínas: VP1, VP2, VP3 y VP4 que ensamblados tienen una forma icosaédrica. Cada unidad de la cápside del virus es llamada protómero y se integra por una copia de VP1, VP2 y VP3 que forma un escudo exterior, mientras que en VP4 está hacia el interior (Desselberger *et al.*, 2005). A pesar de la similitud entre todos los picornavirus, la conformación bioquímica de los enterovirus les permite resistir pH de 2 a 3, lo que les permite tolerar los jugos gástricos de los mamíferos (Maier *et al.*, 2009).

Los enterovirus se transmiten comúnmente por ingesta de agua o alimento contaminado. Su velocidad de replicación es alta y llega a estar presentes en grandes cantidades aproximadamente 10^{10} partículas virales por gramo de heces, lo que puede causar diarreas que pueden ir de leves a moderadas. Solo en casos de una fuerte infección el virus puede expandirse provocando una viremia y una segunda replicación en el sistema mononuclear fagocítico, por lo que la infección puede diseminarse a bazo y nódulos linfático, teniendo como consecuencia la infección de órganos como corazón, sistema nervioso central y piel (Muir, 2005; Maier *et al.*, 2009). Las enfermedades producidas por algunos enterovirus como el de la poliomielitis están relacionadas directamente con la edad, ya que generalmente se presenta en los infantes, sin embargo, los adultos que contraen la enfermedad presentan síntomas más severos. Por otro lado, el virus coxsackie B es usualmente más severo en niños recién nacidos que en adultos, que causa miocarditis, encefalitis, y en un caso severo la muerte del infante. Se considera el segundo virus más prevalente después del de la poliomielitis y es también el segundo más aislado de agua de consumo y agua residual (Maier *et al.*, 2009).

Las enfermedades como la poliomielitis, causada por poliovirus prevalecen en países en desarrollo como la mayoría de las naciones africanas y asiáticas (WHO, 2006), y que no son comunes los casos en países desarrollados. Sin embargo, el problema de una posible infección por poliovirus derivada del virus vacunal debido a su calidad de atenuado, sigue latente y es potencialmente peligroso.

1.5 Adenovirus

Los adenovirus pertenecen a la familia Adenoviridae, la cual comprende cinco géneros que infectan una amplia gama de vertebrados. Son virus con simetría icosaédrica, su genoma está constituido por DNA de doble cadena con un tamaño de 35000 pb que codifica para más de 30 proteínas estructurales y no estructurales. Tiene un tamaño aproximado de 90 a 100 nm con fibras como espinas, llamadas pentonas, en la cápside y es uno de los virus más conocidos y estudiados alrededor del mundo debido a sus aplicaciones biotecnológicas (Jiang, 2006).

Al menos 50 tipos de adenovirus humanos han sido identificados y debido a que se han encontrado en otras especies se sabe que son interespecíficos. Son capaces de replicarse dentro del tracto respiratorio, en la mucosa de los ojos, en el tracto intestinal, en la vejiga y en el hígado. Todas las enfermedades asociadas a adenovirus son causadas por solo un tercio de los representantes de este grupo, dentro del cual los más importantes son los tipos 1-7, 14, 21, que causan enfermedades respiratorias agudas y los tipos 40, 41 causantes de gastroenteritis (Maier *et al.*, 2009).

Los adenovirus penetran al cuerpo por vía oral, del sistema nasofaríngeo y la conjuntiva, por lo que la infección puede iniciar por una ruta respiratoria o bien por medio de una ruta fecal-oral. La mayor cantidad de casos se presenta en niños (Maier *et al.*, 2009).

Los tipos 40 y 41 de adenovirus afectan únicamente al humano y han sido reconocidos como el segundo agente etiológico más importante causante de gastroenteritis viral en niños, solo después de rotavirus; se transmite por la ruta fecal-oral por lo que los casos han sido asociados a fuentes de alimentos y agua contaminada (Divizia *et al.*, 2004).

Se ha reportado que estos virus son resistentes a métodos de desinfección clásicos como la cloración (Thurston-Enriquez, 2003), e incluso presentan resistencia a la desinfección con Rayos UV (Meng y Gerba, 1996). En la tabla 2 se muestran diferentes cantidades de radiación UV necesarias para la inactivación de diferentes microorganismos en agua (Gerba *et al.*, 2002; Meng y Gerba, 1996) donde se observa que AdV necesita una alta cantidad de radiación (167 mJ/cm²) para reducir en 4 unidades logarítmicas las partículas virales. Este valor es más alto que el encontrado para la inactivación de otros virus y bacterias.

Tabla 2. Cantidad de radiación UV necesaria para la inactivación de diferentes microorganismos en agua (Hijnen *et al.*, 2006; Gerba *et al.*, 2002; EPA, 2006; Meng y Gerba, 1996).

Microorganismos	Cantidad de radiación UV (mJ/cm ²)		
	1 log red.*	2 log red.*	4 log red.*
Bacterias			
<i>E. coli</i> ^a	5	9	18
<i>E. coli</i> O157 ^c	5	9	19
<i>Salmonella typhi</i> ^a	6	12	51
<i>Clostridium perfringens</i> ^a	45	95	- ^b
<i>Bacillus subtilis</i> ^a	29	46	80
<i>Streptococcus faecalis</i> ^a	9	16	30
<i>Camylobacter jejuni</i> ^c	3	7	14
<i>Legionella pneumophillia</i> ^c	8	15	30
<i>Shigell dysenteriae</i> ^c	3	5	11
<i>Vibrio cholerae</i> ^c	2	4	9
Virus			

Adenovirus tipo 2, 15, 40, 41	42	83	167
Calicivirus canino	10	21	41
Calicivirus felino	9	19	38
Calicivirus bovino	5	11	21
Coxsackie virus B5	8	17	34
Hepatitis A	6	11	22
Poliovirus tipo 1	7	15	30
Rotavirus SA-11	10	20	39
B40-8 fago	12	18	28
MS2 fago	16	34	71
Qb fago	10.9	22.5	47.6
fx174 fago	2.2	5.3	11
T7 fago	3.6	7.5	16.6
T1 fago	~5	~10	~20
Protozoarios			
<i>Cryptosporidium</i> EPA ^b	3	6	- ^d
<i>Giardia</i> EPA ^b	2	5	- ^d
<i>Acanthamoeba</i> ^b	40	71	167

* Reducción en unidades logarítmicas.

^a Especie Salvaje.

^b Necesitan más investigación

^c Estudiada en especies salvajes.

^d No evaluado

1.6 Métodos de detección

Para la detección de diferentes grupos virales de interés médico y ambiental en distintas matrices, se aplican diferentes técnicas que son aceptadas y avaladas por instituciones gubernamentales. Tal es el caso de la técnica de cultivo celular y ensayo en placa, que es la única avalada actualmente por la EPA y por la organización Internacional para la Estandarización (ISO), que son organizaciones de regulación en materia ambiental a nivel internacional, ya que muchas naciones circunscriben sus normas a las establecidas por ellos. Esta técnica tiene la ventaja de permitir la cuantificación de las partículas virales infecciosas de forma directa, sin embargo, no es rápida y requiere de personal así como equipo altamente especializados para su realización, por lo que resulta en un costo alto que lo hace poco factible en términos de monitoreo rutinario para diferentes tipos de agua de consumo.

Por otro lado, existen métodos que permiten una detección del agente viral de forma específica a partir de su material genético, esto puede llevarse a cabo por medio PCR aunque esta técnica solo permite detectar su presencia, es altamente específica y rápida. Otra técnica utilizada es el q-PCR con el cual se puede detectar el número de genomas virales presentes en una determinada muestra. Esta técnica, al igual que la anterior, es altamente específica y rápida aunque presenta la desventaja de no poder reconocer entre las partículas que son infecciosas de las que no lo son, debido a ello se han realizado estudios en los que se busca encontrar una relación entre el número de genomas detectados y la cantidad probable de partículas infecciosas. En 2010 se realizó un estudio con enterovirus y reportan que 48 de cada 100 genomas pueden considerarse como partículas infecciosas presentes (Donia *et al.*, 2010).

La diferencia entre el número de genomas detectados y la cantidad de partículas infecciosas reales es debida a que gran parte de los ensayos de q-PCR pueden resultar positivos incluso después de una inactivación con ClO_2 o por condiciones de pH de 3 a 12. Estos resultados son debidos a que el RNA puede permanecer intacto bajo estas condiciones puesto que no se degrada la cápside viral y el RNA permanece protegido dentro de ella, lo que puede arrojar resultados positivos en los ensayos de detección y cuantificación (Simonet y Gantzer, 2006).

1.7 Métodos de concentración

En los últimos años se ha puesto atención en la presencia de diferentes microorganismos causantes de enfermedades en el agua, entre los que se encuentran las bacterias, parásitos y virus, lo que ha llevado a la búsqueda de métodos que permitan la detección múltiple de forma fácil para una determinación rápida y de bajo costo. Debido a la baja concentración de microorganismos, es necesario tener muestras de agua de volumen entre los 5L a los 100L con el fin de evitar falsos negativos que pueden significar un riesgo para la salud pública o ambiental del sistema estudiado (Gerba *et al.*, 1978; Polaczyk *et al.*, 2008).

El manejo de muestras de este volumen requiere que éstas sean concentradas. Se han probado diversos métodos de concentración entre los que se encuentra el uso de cartuchos electropositivos que aprovechan las cargas que poseen los microorganismos para su adsorción en el cartucho, desorción y su posterior recuperación. Este tipo de cartucho es recomendado por diversas instituciones gubernamentales de países como Estados Unidos y Canadá (EPA y Health Canada

respectivamente) para la detección de partículas virales. Sin embargo este sistema es caro y no es asequible para muestreos rutinarios (Karim *et al.*, 2009).

Uno de los métodos alternativos de concentración más promisorios para análisis microbiológicos es la ultrafiltración. Este método fue originalmente utilizado para las diálisis renales y los cartuchos que se utilizan son fabricados con un tamaño específico de poro que tienen un umbral de peso molecular al filtrado (de 15000 a 20000 D), característica que ha sido aprovechada para capturar microorganismos de tamaño específico. El mecanismo consiste en hacer pasar un flujo de agua a través del cartucho, donde las moléculas de agua y los iones son filtradas por un lado, mientras que las partículas más grandes que el poro (en este caso los microorganismo de interés) son retenidas y desechadas por otra salida, con lo que se logra la concentración de la muestra (Polaczyk *et al.*, 2008).

Este método ya se ha reportado adecuado para la concentración de diversos microorganismos entre los que se encuentran diversos virus entéricos de interés. Además es más sencillo, eficaz y barato que el cartucho electropositivo (Hill *et al.*, 2005; Hernández-Morga *et al.*, 2009).

Se han propuesto y desarrollado diferentes métodos, tanto para la recuperación como para la concentración de partículas virales de alimentos (mayoritariamente verduras), que posteriormente pueden ser detectados por las diversas técnicas ya descritas. Debido a que las partículas virales tienden a aglomerarse en las superficies debido a su tamaño y carga positiva, estos métodos se basan en la desorción de estas partículas por diferentes métodos de elución (Vega, 2005). Para lograrlo se han usado soluciones con diferentes sales o solutos que al disolverse generan iones con carga, que se asocian a las partículas virales y entonces pueden ser arrastradas en la solución

(Dubois, 2006); posteriormente esta solución es sometida a diversos métodos de concentración para la recuperación de las partículas virales. Se ha evaluado el uso de diferentes sales como el amortiguador de fosfatos (PBS) (Dubois, 2006), NaCl, (Vega, 2005) o bien con el uso de solutos como Trisaminol ácido (TRIS HCl), extracto bovino 1% (Dubois, 2002). Uno de los retos en este sentido es la estandarización de los métodos, para conocer mejor los porcentajes de recuperación ya que estos pueden variar dependiendo del tipo de microorganismo detectado, pero sobre todo del tipo de agua de que se trate.

2. ANTECEDENTES

Alrededor del mundo se reconoce cada vez más la problemática de las enfermedades relacionadas con el consumo de agua y alimentos contaminados. Este problema se presenta sobre todo en países en desarrollo donde la sanidad del agua es pobre y poco estudiada (EPA, 2009).

En los últimos años se han realizado estudios sobre la detección de virus causantes de enfermedades gastrointestinales en diferentes tipos de agua de consumo y alimentos contaminados (Tabla 1), lo que ha provocado un aumento en la atención sobre los posibles problemas de salud que éstos pudieran causar (Koopmans *et al.*, 2004). Debido a esto, se han realizado diferentes estudios, principalmente en países desarrollados, para buscar indicadores que puedan ayudar a determinar la presencia de contaminación viral, tanto en agua de consumo como en alimentos (Jiang, 2006). Diferentes autores han propuesto a enterovirus, adenovirus (Ashbolt *et al.*, 2001; EPA 2007; Hot *et al.*, 2003; Jiang, 2006) bacteriófagos somáticos y F-RNA específicos

(Borrego *et al.*, 1990; Hot *et al.*, 2003) como indicadores, debido a que presentan una alta resistencia a procesos de tratamiento y condiciones ambientales.

La importancia de las enfermedades causadas por virus en México ha cobrado relevancia en los últimos años. Ahora se cuenta con una vacuna para rotavirus incluida dentro de la cartilla nacional de vacunación (Programa Nacional de Salud 2007-2012) y se monitorean semanalmente las posibles infecciones debidos a poliovirus y hepatitis A. Sin embargo se ignora la detección de otro virus gastrointestinal de importancia como agente causal de enfermedades.

El boletín epidemiológico hasta la semana 52 de 2012 señala que numéricamente las enfermedades gastrointestinales ocupan el segundo lugar en incidencia después de las enfermedades respiratorias. Los datos reportados pertenecen a Cólera, Salmonelosis, Shigelosis, Tifoidea y poliomiélitis, pero la mayor parte de los casos se incluyen dentro de la categoría denominada “Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas” suman un total de 5,221,228. Esta cifra no aporta datos concluyentes sobre los casos debidos a virus enteropatógenos de los cuales no se aportan más datos.

Existen métodos alternativos de concentración y detección de partículas virales en agua debido a que en algunos casos las partículas son muy escasas. Uno de estos métodos es la técnica de ultrafiltración propuesta por Hill y colaboradores en el 2005, que pretende ser una opción técnica barata frente a los costosos métodos utilizando cartuchos electropositivos que los hacen inasequibles para países como el nuestro (Espinosa, 2008). Esta técnica de concentración ha sido utilizada en nuestro país para la detección del virus de hepatitis A y norovirus en agua (Hernández-Morga *et al.*, 2009).

Contar con un indicador de contaminación viral en agua es importante debido que se desconoce la relación y el comportamiento que presentan las diferentes partículas virales en diferentes tipos de agua presentes en México. La factibilidad de utilizar indicadores virales depende del contexto social, político, económico y ambiental. Por esto, es necesario considerar las características locales para proponer e implementar su uso en programas de monitoreo de calidad del agua. Los trabajos publicados sobre este tema en México son escasos. En un estudio se comparan a algunos virus entéricos, colifagos y diversos grupos bacterianos para conocer su correlación y evaluar su utilidad como indicadores de calidad del agua en regiones tropicales y subtropicales (Espinoza *et al.*, 2009).

En cuanto al agua residual, las descargas se clasifican en municipales e industriales, y de acuerdo con lo publicado en Estadística del Agua en México (2012) solo se trata el 35% de las aguas residuales municipales. En cuanto a las aguas residuales industriales, el porcentaje de tratamiento es solo del 25%.

Un problema asociado a la falta de tratamiento de agua es el uso desmedido de agua residual para riego agrícola. Se reporta que en México aproximadamente 180,000 hectáreas son regadas con este tipo de agua (Jiménez *et al.*, 2006). Sin embargo el uso descuidado de este recurso puede provocar que diferentes clases de contaminantes, como enteropatógenos, se infiltren a los acuíferos, que son la principal fuente de agua para abastecimiento (Jiménez, 2009).

Agua residual es descargada directamente en cuerpos de agua, lo que es un grave problema y puede tener consecuencias indeseadas. Constituye un riesgo potencial a la salud además de que puede altera los ecosistemas debido a la contaminación de cuerpos de agua naturales (Escalante *et al.*, 2003; CONAGUA, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Los virus entéricos, como enterovirus y adenovirus, son una importante fuente de enfermedades gastrointestinales sobre todo en países en desarrollo y afectan sobre todo a la población de bajos ingresos y especialmente los niños (Bosch *et al.*, 2008). Los enterovirus son una de las causa de meningitis y miocarditis aséptica y cerca del 20% de los casos registrados de estas enfermedades se asocian con una infección viral persistente (Muir *et al.* 1997). Mientras que los adenovirus del subgrupo F están asociados con el 5-20% de gastroenteritis agudas entre niños por lo que representa probablemente el segundo grupo más importante después de rotavirus (Cruz *et al.*, 1990). Estos virus son transmitidos por una vía fecal-oral y excretados en grandes cantidades por los humanos infectados, además de ser capaces de sobrevivir en ambientes acuáticos, por lo que el agua es una excelente vía de transmisión y transporte (Maier *et al.*, 2009).

Alrededor del mundo existe la necesidad de contar con un indicador de contaminación viral fecal, por lo que diferentes grupos de investigación se han dedicado a identificar algunas opciones y a evaluar su utilidad en sistemas de monitoreo de calidad del agua (Maier *et al.*, 2009). Estos avances se realizan en países desarrollados, mientras que en países en desarrollo existen limitantes económicas y técnicas para su implementación a nivel estatal y nacional. Otro aspecto a considerar es que la mayoría de los estudios realizados a nivel mundial sobre la presencia de estos grupos virales se han realizado principalmente en países con climas templados (Deetz *et al.*, 1984; Hot *et al.*, 2003; Denis-Mize *et al.*, 2004; Koopmans *et al.*, 2004), lo que señala la necesidad de que en países de latitudes tropicales y subtropicales deban

realizarse trabajos a fin de identificar particularidades que pueden ser de relevancia en términos de salud pública.

En México existen pocos estudios de la presencia de estos patógenos virales en los cuerpos de agua y en los sistemas de abastecimiento, tanto en el agua para consumo humano como en el agua de reúso para diversas aplicaciones (Espinosa-García *et al.*, 2004; Espinosa-García *et al.*, 2009). Tampoco existe una norma que establezca límites sobre la contaminación viral en distintos tipos de agua para consumo humano y reúso.

Tomando en consideración lo anterior se resaltan dos problemáticas a resolver para el caso de México. La primera es la ausencia de datos de detección en México, ya que es necesario realizar estudios que nos permitan conocer la dinámica de virus entéricos en el ambiente y las relaciones entre los diferentes grupos virales con otros patógenos de importancia considerando las condiciones climáticas locales (Peel *et al.*, 2007). El segundo problema es que no se cuenta con un indicador eficaz de contaminación viral en agua, por ello es necesario realizar estudios para evaluar diferentes indicadores virales, señalando cuáles pueden ser los más adecuados para México. Este trabajo aborda estas dos problemáticas. Detectando la presencia de poliovirus y adenovirus F y evaluándolos como posibles indicadores de contaminación fecal viral.

El trabajo se realizó dentro del *Campus* de CU de la UNAM, que cuenta con distintos tipos de agua. Los resultados pueden aportar información sobre la presencia de virus en agua de sitios con condiciones similares. Esta información será una base para la toma de decisiones sobre el manejo y control de la calidad del agua en forma

local. Además aporta la experiencia de un proyecto piloto que puede aplicarse a zonas con problemáticas similares dentro de la República Mexicana.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Cuantificar enterovirus (EV), adenovirus F (AdV F), y determinar cuál de los dos podría ser más eficiente como indicador de contaminación viral. Cuantificar coliformes fecales (CF) y enterococos fecales (EF) para conocer si guardan alguna correlación con la presencia de partículas virales. Realizar los estudios en agua para uso y consumo humano, agua residual y agua residual tratada de reúso para riego de áreas recreativas, así como en el pasto de áreas verdes regada con agua tratada del *Campus* de CU, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.

4.2 Objetivos particulares

1. Cuantificar durante un ciclo anual el número de copias de genoma de EV y AdV F en muestras de agua de diferentes clases.
2. Cuantificar durante un ciclo anual a CF y EF en muestras de agua utilizando métodos estandarizados.
3. Examinar los datos de temperatura y pH en cada muestra durante las diferentes temporadas para determinar si estas condiciones pueden afectar la presencia y detección de los grupos virales y bacterianos analizados.

5. HIPÓTESIS

Debido a que las características de EV y AdV permiten su persistencia en agua, serán indicadores adecuados de contaminación viral fecal, independientemente de la presencia de CF y EF.

6. ÁREA DE ESTUDIO

El estudio fue llevado a cabo en el *Campus* de Ciudad Universitaria (CU) que se encuentra ubicado al suroeste del Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) (Figura 1) a una altitud de 2,277 msnm entre los 19°19'57" latitud norte y 99°10'55" longitud oeste, con una superficie total de 730 hectáreas (Boletín UNAM-1991-DGCS-582). El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano (García, 1973), tiene una temperatura media anual de 15.5 °C y una precipitación media anual de 870 mm. La temporada de lluvias se presenta principalmente durante el verano-otoño y algunas lluvias aisladas en invierno, mientras que el resto del año permanece seco (Valiente-Banuet y De Luna García, 1990).

El *Campus* de CU se encuentra cercano a la Sierra de las Cruces y la Sierra del Ajusco, que pertenece al sistema montañoso del Chichinahutzin (SMA-GDF, 2000), una importante zona de recarga de la ZMCM. El agua que abastece al *Campus* es extraída de 3 pozos ubicados el primero en la zona del Vivero Alto, el segundo cercano a un multifamiliar, y el tercero cercano a la Facultad de Química (Figura 1).

CU es una zona en la que se desarrollan una amplia gama de actividades culturales, deportivas, académicas y administrativas, albergando diariamente una población de 132,000 personas, incluyendo alumnos, académicos, personal administrativo y trabajadores, que confluyen en sus instalaciones principalmente

durante el día (Portal de Estadística Universitaria, 2012). Se cuenta con la presencia de varios grupos deportivos que realizan actividades de este tipo, como es el club de futbol PUMITAS, que cuentan con una serie de canchas deportivas (Figura 1) donde realizan actividades cotidianamente y de forma intensiva los fines de semana.

Ciudad Universitaria tiene tres plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) , una de ellas ubicada en el Circuito Mario de la Cueva, entre el Instituto de Investigaciones Antropológicas y la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales, que da servicio a la Tienda UNAM, la Filmoteca UNAM, TV UNAM y los Institutos de Investigaciones Económicas y el de Investigaciones Filológicas (PUMAGUA, 2009). Fue diseñada para tratar 7.5 L/s. Debido a la falta de infraestructura para conducir agua residual hasta esta planta, actualmente trata entre 1-1.9 L/s. La segunda es la Planta del Instituto de Ingeniería, que se ubica entre el edificio 12 y el edificio 18 del Instituto de Ingeniería. Fue diseñada para tratar 0.05 l/s, provenientes de los edificios 12 y 18 del Instituto de Ingeniería. (PUMAGUA, 2009).

La planta de tratamiento con mayor capacidad es la PTAR de Cerro del Agua (PTARCA) que se encuentra al noroeste de CU, en la esquina que forman la avenida Cerro del Agua y el Circuito Escolar, frente a la Facultad de Medicina (figura 1). Abastece de agua tratada a 12 cisternas, distribuidas en el *campus* donde el agua es usada principalmente para riego de áreas verdes. Fue diseñada para tratar 40 L/s (PUMAGUA, 2009). Las aguas residuales que recibe provienen de diversas zonas del *campus* universitario, y llegan a través de dos colectores, denominados "Zona Antigua" y "Zona de Institutos", que comprenden la mayor parte del *Campus* universitario (PUMAGUA, 2009).

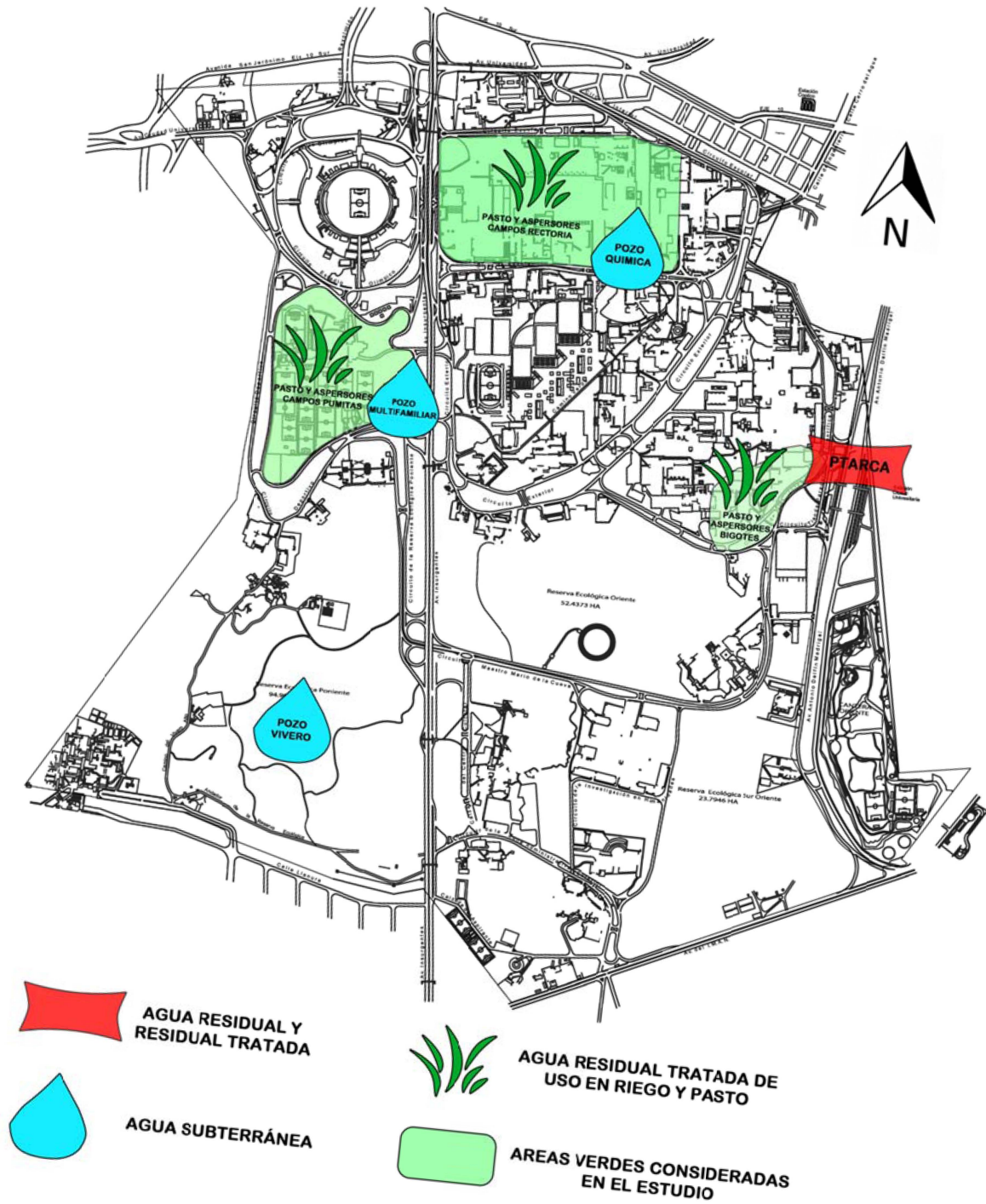


Figura 1. Área de estudio donde se señala las diferentes tipos de agua y matriz vegetal muestreadas en los diferentes sitios de Ciudad Universitaria, México D.F.

7. MÉTODO

7.1 Diseño de muestreo

Para evaluar la presencia de EV y AdV en los diferentes tipos de agua se definieron tres temporadas: fría-seca (TF) que comprendió enero a febrero, cálida-seca (TS) que abarcó de marzo a junio, y cálida-lluvias (TLL) de julio a octubre, del 2009 (Figura 2).

Los criterios usados para definir las temporadas de muestreo fueron la precipitación y la temperatura de los últimos cuatro años en la zona sur de la Ciudad de México. Estos datos fueron obtenidos de la red meteorológica (REDMET, 2004-2008) y de la red de depósito atmosférico (REDDA, 2004-2008) del Distrito Federal.

Se tomaron un total de 135 muestras. El agua residual y residual tratada se tomaron de la entrada y salida de la PTARCA respectivamente ya que en ella se trata la mayor parte del agua residual generada en el *Campus* (Figura 1). Las muestras de agua residual tratada usada para riego y las muestras de pasto de las áreas verdes regadas con agua residual tratada, fueron tomadas de los aspersores y áreas verdes adyacentes a la Torre de Rectoría, en el acceso al *Campus* desde la estación del metro Universidad conocido como Bigotes (Tú y yo, escultura de Mathias Goeritz) y en los campos del Club de Fútbol PUMITAS (Figura 1). El criterio de selección para estas áreas fue la cantidad de personas que hacen uso del área verde diariamente.

El agua subterránea fue colectada antes de cloración en los tres pozos que abastecen a Ciudad Universitaria: Vivero Alto, Multifamiliar y Química (Figura 1).

7.2 Muestreo de agua y pasto

Se realizaron tres muestreos para cada temporada, y se procesaron por triplicado para cada tipo de agua o matriz vegetal recolectada. El volumen de muestra para cada tipo de agua se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Volumen (L) o peso (gr) de muestras de agua y pasto colectadas en cada sitio de muestreo.

TIPO DE MUESTRA	LUGAR DE COLECTA	CANTIDAD DE MUESTRA
Agua subterránea	Pozos: multifamiliar, Química y Vivero Alto.	1000 ó 100 L
Agua residual	PTARCA agua de entrada	1L (no se concentró solo se usaron 200 mL para el estudio)
Agua residual tratada	PTARCA agua de salida	10L
Agua residual tratada de reúso	Aspersores y pasto cercano de áreas verdes de rectoría, metro CU y canchas de pumitas.	10L
Pasto		25g

Las muestras de agua fueron colectadas siguiendo las recomendaciones sanitarias de la Asociación Americana de Salud Pública (APHA por sus siglas en ingles) y las NOM-179-SSA1-1998 para agua potable y de la NMX-AA-003-SCFI-2006 para aguas residuales.

Los bidones usados para la toma de las muestras fueron de polipropileno previamente lavados y esterilizados de acuerdo con métodos estándar (APHA, 2005).

Para la toma de las muestras de pasto se colectaron 25gr en bolsas de polipropileno estériles; para evitar una posible contaminación se utilizaron tijeras estériles y guantes de polipropileno.

7.3 Concentración de muestras de agua

El agua residual (influyente) proveniente de la PTARCA no fue concentrada. Y solo fueron conservados 200 mL a -20°C de los cuales 100 fueron usados para filtración.

Para la concentración de las muestras de agua subterránea, agua residual tratada y agua residual tratada para reúso en riego se utilizó un sistema de ultrafiltración (SUF) que se implementó tomando como base el trabajo de Hill y colaboradores (2005). En este sistema se usó un filtro de polisulfona F80A (Fresenius Medical Care), que filtran moléculas con un peso molecular entre 15–20 kDa, lo que permite la remoción de iones y moléculas de agua, concentrando los organismos de interés presentes en grandes volúmenes de agua.

Este proceso comienza bloqueando el ultrafiltro haciendo recircular 1 L de una solución de polifosfato de sodio (NaPP) a 0.1% durante 30 min. También se agregó NaPP a una concentración de 0.1% a las muestras de agua como desagregante de las partículas. Finalmente se realizó la recirculación de la muestra a un flujo constante de 1700 mL/min y una presión de 15 a 20 psi, que se logró por medio una bomba peristáltica (Masterflex Cole Palmer) para obtener un volumen de concentrado final aproximado de 100 mL (Hill *et al.*, 2005). Las muestras concentradas fueron preservadas a -20°C para su posterior análisis molecular.

7.4 Lavado y concentración de muestras de pasto

Se colectaron 10gr de las muestras de pasto de áreas verdes, que fueron lavadas posteriormente con 100 mL de una solución de PBS (SIGMA-ALDRICH), durante 20 min a una velocidad constante de 100 revoluciones por minuto (rpm) para

separar las bacterias. Este lavado fue procesado inmediatamente por el método de filtración a través de membrana para detección de las unidades formadoras de colonia (UFC) de CF y EF. La técnica en detalle se describe en el Apartado 7.5.2.

Para la detección de partículas virales se usaron 15 gr de pasto que fueron lavados con 200 mL de una solución de PBS (SIGMA-ALDRICH) con NaCl 1M durante 20 min a una velocidad constante de 100 rpm, como lo recomienda Vega (2006). Posteriormente se filtró la solución en embudos Stericup GV Durapore de 0.22 μ m (Millipore) con el fin de retirar impurezas y restos vegetales. Se conservaron 100 mL a -70°C y el resto fue centrifugado usando tubos AMICON Ultra-15 (Millipore) con un filtro de 100 kDa en una centrifuga ROTINA 35 R (Hettich) a 4°C con una velocidad de 3500 rpm por 15 minutos, en múltiples repeticiones, y el pellet se resuspendió en 500 μ L de PBS. Finalmente el concentrado obtenido fue guardado a -20°C hasta ser procesado por medio de qPCR para la detección de EV y AdV (detalle de técnica Apartado 7.5.3).

7.5 Métodos de análisis

7.5.1 Análisis fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos de pH y temperatura (°C) fueron obtenidos *in situ* para cada muestra por medio de un equipo multiparámetros portátil SenSION156 (HACH).

7.5.2 Análisis bacteriológicos

La detección y conteo de CF y EF fue realizada en el laboratorio después de la toma de las muestras por el método de filtración a través de membrana. En este método se pasa la muestra por filtros de nitrocelulosa S-PAK (Millipore) de 0.45 μ m y posteriormente estos son colocados en medios selectivos para favorecer el crecimiento

de las bacterias de interés. En el caso de las CF se utilizó agar m-FC (BD Difco) y para los EF se utilizó el medio KF Streptococcus (BD Difco) ambos preparados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En el conteo final se reportan UFC por cada 100 mL (APHA, 2005; NMX-AA-102-SCFI-2006). Las cantidades filtradas para cada tipo de agua se muestran en la Tabla 4. En el caso de las aguas residuales se realizaron diluciones seriadas con un factor de 10 usando PBS 1X (SIGMA-ALDRICH) ya que el número de enterobacterias presentes era muy alto para un conteo adecuado.

Tabla 4. Cantidad de muestra procesada por medio de filtración de membrana

TIPO DE MUESTRA	CANTIDAD DE MUESTRA FILTRADA
Agua subterránea	1000 mL
Agua residual	100 mL de diferentes diluciones 1:10
Agua residual tratada	100 mL
Agua riego	100 mL
Pasto	100 mL

7.5.3 Análisis virales

7.5.3.1 Curva patrón

Para EV fue utilizada como control positivo la vacuna de poliomielitis oral (VOP) trivalente de laboratorios BIRMEX, con una cantidad mínima reportada por el fabricante de 1.17×10^7 genomas/mL (NOM-036-SSA2-2002).

Para la construcción de la curva patrón se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de cinco para obtener una curva control de cinco puntos. El rango dinámico que se obtuvo fue de 1×10^1 hasta 6.4×10^3 genomas, por lo que es posible la cuantificación desde un orden de magnitud logarítmica.

Para la cuantificación de AdV 40 y 41, se utilizó como control positivo con DNA de AdV humano 40 de ATCC (VR-931D) con un título calculado de 1.44×10^8 genomas/mL que fue estimado a partir de los ng/ μ L de DNA reportados en las especificaciones del American Type Culture Collection (ATCC).

7.5.3.2 Extracción de RNA y de DNA

La extracción de RNA para la cuantificación de EV en las muestras se realizó usando un mini kit de RNA viral QIAamp (QIAGEN) para eliminar las impurezas e inhibidores de polimerasas eficientemente. El RNA extraído se llevo a un volumen final de 60 μ L que fue guardado a -70°C para su análisis posterior por medio de qPCR (apartado 7.5.3.3).

La extracción de DNA para la cuantificación de AdV F en las muestras se realizó usando un mini kit de DNA QIAamp (QIAGEN), con el que se obtuvo material genético libre de impurezas. El volumen final de 250 μ L fue guardado a -70°C para su análisis posterior por medio de qPCR (apartado 7.5.3.4).

7.5.3.3 Cuantificación de enterovirus

Para cuantificar el número de genomas de EV en las muestras se utilizó la técnica qPCR en un solo paso, tomando como base el protocolo reportado por Monpoeho y colaboradores (2000). La reacción se realizó en un volumen total de 30 μ L.

Para la mezcla de reacción se utilizaron 15µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG 2X (Applied Biosystems), 0.75µL de Multiscribe Reverse Transcriptase/RNase Inhibitor Mix 40X (Applied Biosystems), 1µL de oligonucleotido EV2 400 nM, 1 µL de oligonucleotido EV1 500 nM, 1 µL de sonda marcada Pb EV 120 nM, 1.25 µL de agua estéril y 10 µL de RNA extraído.

La reacción de retrotranscripción (RNA a cDNA) se llevó a cabo a 50°C por 45 minutos, seguida de la reacción de amplificación de cDNA a 95°C por 10 y 40 ciclos de 94°C por 15 segundos y 60°C por un minuto. Los oligonucleótidos y la sonda hibridan en la región 5' no codificante (UTR), que es muy conservada entre los virus del grupo de EV (poliovirus, coxsackie virus A – B y echovirus), obteniendo un tamaño de amplicón de 110 pb. Las secuencias de los oligonucleótidos y la sonda son mostradas en la Tabla 4.

7.5.3.4 Cuantificación de adenovirus F

Para conocer número de genomas de AdV F (serotipos 40 y 41) en las muestras se utilizó la técnica de qPCR. La reacción se realizó en un volumen de 20 µL que contenía 10 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix with UNG 2X (Applied Biosystems), 1 µL de Primer HAdV-F4041-hex157, 1 µL de Primer HAdV-F40-hex245 500nM, 1 µL de Primer HAdV-F41-hex246 500 nM, 1 µL de sonda marcada HAdV-F4041-hex214-r 120 nM, 1 µL de agua estéril y 5 µL de DNA extraído.

La reacción se realizó a 50°C por 2 minutos, seguidos de 15 minutos a 95°C para la inactivación de la enzima uracil-N- Glucosilasa que evita la reamplificación de fragmentos de DNA y promueve la desnaturalización de DNA y la activación de la polimerasa. Posteriormente se realizaron 45 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por

30 segundos y 72°C por 10 segundos. Este protocolo es una modificación del reportado por Xagorarakis y colaboradores (2007), que incluyen un paso final de 30°C durante 10 segundos.

Los oligonucleótidos y la sonda utilizados se encuentran en la zona del hexon de AdV F (serotipos 40 y 41). El oligonucleótido *forward* y la sonda marcada utilizado para AdV F fue el mismo para ambos serotipos virales, mientras que para el oligonucleótido *reverse* se utilizó un diseño específico para cada tipo viral (Xagorarakis *et al.*, 2007). Las secuencias de los oligonucleótidos y la sonda son presentadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este estudio y sus características relevantes.

OLIGONUCLEOTIDO	TAMAÑO pb	SECUENCIA	TAMAÑO AMPLICIÓN	REFERENCIA
Enterovirus				Modificado de Monpoeho et al., 2000
EV1	19	5'-GATTGTCACCATAAGCAGC-3'	128 pb	
EV2	19	5' CAC GTA GAA CGA TGG CAT CA 3'		
Pb EV (sonda) ¹	26	CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT- BHQ1-3'		
Adeovirus F				Xagorarakis et al., 2007
HAdV-F4041- hex157 (forward AdV 40 y 41)	21	5'- ACCCACGATGTAACCACAGAC -3'	88 pb	
HAdV-F40-hex245 (reverse AdV40)	23	5'- ACTTTGTAAGAGTAGGCGGTTTC- '3		
HAdV-F41-hex246 (reverse AdV41)		5'-CACTTTGTAAGAATAAGCGGTGTC- '3		
HAdV-F4041- hex214 (sonda)	22	5' -FAM- CGACKGGCACGAACKGCAGCGT- BHQ1-3'		

¹. La sonda fue modificada colocando el apagador BHQ1 en lugar del original.

7.6 Análisis de datos

Para el análisis de resultados se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XV. Se realizó una transformación logarítmica (base 10) de los datos obtenidos con el fin de homogeneizarlos, debido a la variabilidad interna que éstos presentaban y poder realizar un análisis más representativo.

Para conocer si existía una diferencia para cada organismo detectado durante las temporadas de muestreo se realizó un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$). En los casos que presentaron una diferencia se realizó un análisis de grupos homogéneos con el método de diferencias mínimas significativas LCD de Fisher ($p < 0.05$), con el fin de discriminar entre temporadas.

Para conocer si existía una relación lineal entre CF, EF, EV y AdV en los diferentes tipos de muestras colectadas se realizó un análisis de correlación de Pearson ($p < 0.05$).

7.7 Esquema general de trabajo

Como resumen del procedimiento para la cuantificación de CF, EF, EV y AdV F se muestra en la figura 2 un diagrama de flujo de los diferentes pasos y procedimientos seguidos durante el estudio.

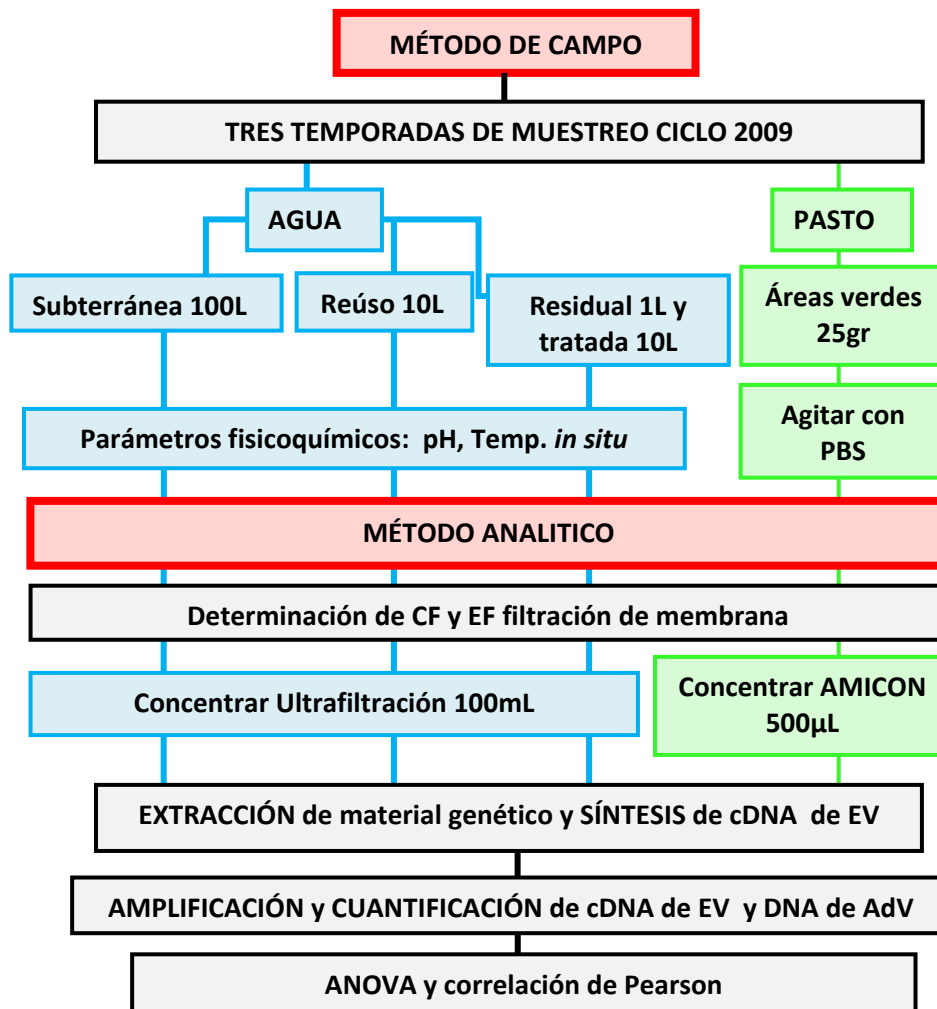


Figura 2. Esquema del procedimiento para determinar la presencia de CF, EF, EV y AdV en diferentes tipos de agua del *Campus* de Ciudad Universitaria.

8. RESULTADOS

8.1 Temperatura y pH

El valor de temperatura presentó un intervalo promedio de 18.5°C a 24.5°C. En todos los tipos de agua, la menor temperatura se registró durante la temporada fría y se observó un aumento de la misma hacia la TS y TLL como se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Resumen de los valores promedio de temperatura para las muestras durante las diferentes temporadas de muestreo.

Temporada	Tipo de agua			
	Agua residual	Agua residual tratada	Agua residual tratada de uso en riego	Agua subterránea
TF	19.5 ± 0.3	20 ± 0.7	20.2 ± 1	17.2 ± .8
TS	20.2 ± 0.6	23.3 ± 0.5	24.5 ± 0.5	18.5 ± 0.5
TLL	20.8 ± 0.2	n.d.	n.d.	19.6 ± 0.7

TF: Temporada fría-seca, TS: Temporada cálida-seca, TLL: Temporada cálida-lluvias
n.d. No determinado que en temporada de lluvias no se necesita agua para riego.

El valor de pH se mantuvo estable para las diferentes muestras durante las diferentes temporadas (Tabla 7). El agua residual es la que mostro el mayor pH con un promedio de 8.3, mientras que todos los demás tipos de agua se mantuvieron en un intervalo de 7 a 7.5.

Tabla 7. Resumen de los valores promedio de pH para las muestras durante las diferentes temporadas.

Temporada	Tipo de agua			
	Agua residual	Agua residual tratada	Agua residual tratada de uso en riego	Agua subterránea
TF	8.2 ± 0.2	7.2 ± 0.1	7.5 ± 0.2	7.3 ± 0.1
TS	8.5 ± 0.3	7.3 ± 0.3	7.5 ± 0.1	7.2 ± 0.1
TLL	8.2 ± 0.2	n.d.	n.d.	7 ± 0.2

TF: Temporada fría-seca, TS: Temporada cálida-seca, TLL: Temporada cálida-lluvias
n.d. No determinado que en temporada de lluvias no se necesita agua para riego.

8.2 Resultados de bacteria y virus por tipo de agua

8.2.1 Agua residual

Se detectaron entre 1.1×10^7 y 1.3×10^8 UFC/100 mL de CF, mientras que el número de EF fluctuó entre las 1.1×10^7 y 4.2×10^7 UFC/100 mL. En el caso de AdV se encontraron entre 1.5×10^4 y 2.6×10^5 genomas/100 mL (Tabla 7). Estos tres indicadores estuvieron presentes en todas las muestras tomadas.

Los genomas de EV se cuantificaron entre 1.6×10^6 y 1.5×10^6 genomas/100 mL (Tabla 7), pero únicamente se presentaron casos positivos durante la TS y TLL.

8.2.2 Agua residual tratada

Los datos obtenidos para CF y EF nos indican que el proceso de tratamiento de agua residual de la PTARCA fue efectivo para la remoción de estas bacterias indicadoras, ya que no se obtuvieron resultados positivos en ninguna de las muestras (Tabla 7).

En el caso de EV tampoco se detectaron muestras positivas, lo que nos puede indicar que el tratamiento es efectivo para remover la mayor parte de las partículas virales o que es necesario procesar volúmenes mayores de muestra a fin de evaluar la capacidad de remoción de la PTARCA.

Los conteos de genomas de AdV F fueron entre 8.7×10^4 y 2.5×10^5 genomas/100 mL (Tabla 7), y fueron detectado en todas las muestras analizadas.

8.2.3 Agua residual tratada de reúso en riego

Los conteos de CF en el agua de reúso en riego arrojaron un total de entre 5.0×10^3 y 4.3×10^4 UFC/100 mL y el de EF entre 1.0×10^4 y 1.1×10^5 UFC/100 mL (Tabla 7).

La cuantificación de EV solo arrojó resultados positivos en 2 de las 17 muestras analizadas, mientras que AdV F fue detectado en todas las muestras en cantidades entre 4.1×10^4 y 6.2×10^4 genomas/100 mL (Tabla 7). Esto nos indica que algunas partículas virales pueden permanecer después del tratamiento de agua residual y esto les permite acumularse en los sistemas de almacenamiento y/o distribución del agua residual tratada.

8.2.4 Agua subterránea

Los conteos de CF y EF en el agua subterránea antes de la cloración solo mostraron conteos de 1 UFC/100 mL en dos de las muestra tomadas. Para el caso de EV se obtuvieron conteos de entre 6 a 56 genomas/100 mL en tres de las muestras tomadas y para AdV F dos muestras fueron positivas, con un conteo de 340 genomas/100 mL (Tabla 8). Estos resultados son importantes ya que pueden ser indicativos de la contaminación de las fuentes de abastecimiento.

Tabla 8. Resumen de la cuantificación de los diferentes indicadores por tipo de agua.

Microorganismo	Agua residual (n=27/27) ^a (n=18/27) ^b	Agua residual tratada (n=15/15)	Agua residual tratada de uso en riego (n=17/17) ^a (n=2/17) ^b	Agua subterránea (n=3/27) ^a (n=2/27) ^b
EV (Gen/100mL)	^b 1.6 x10 ⁶ - 1.5 x10 ⁶	ND	^b 4.7 x10 ¹	^a 0.6 x10 ¹ - 5.6 x10 ¹
AdV F (Gen/100mL)	^a 1.5 x10 ⁴ - 2.6 x10 ⁵	8.7 x10 ⁴ - 2.5 x10 ⁵	^a 4.1 x10 ⁴ - 6.2x10 ⁴	^b 3.4 x10 ²
CF (UFC/100mL)	^a 1.1 x10 ⁷ - 1.3 x10 ⁸	ND	^a 5.0 x10 ³ - 4.3 x10 ⁴	^b 0.1 x10 ¹
EF (UFC/100mL)	^a 1.1 x10 ⁷ - 4.2 x10 ⁷	ND	^a 1.0 x10 ⁴ - 1.1 x10 ⁵	^b 0.1 x10 ¹

Entre Paréntesis se muestra el número de muestras positivas para cada indicador

UFC: Unidades formadoras de colonia

Gen: Genomas

ND: No detectado

8.2.5 Análisis de correlación

Los datos de correlación de Pearson de las diferentes muestras se presentan en la Tabla 9, con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$). Estas correlaciones nos indican si existe una relación lineal entre los datos obtenidos. De esta forma podemos discriminar si la presencia de uno u otro indicador puede ser indicativa de la presencia de alguno de los demás.

Tabla 9. Resumen del análisis de correlación de los diferentes indicadores por tipo de agua.

Tipos de agua residual			
	Coefficiente de correlación	P	Correlación
CF-EF	0.9314	0	Positiva fuerte
CF-AdV	0.9072	0	Positiva fuerte
EF-AdV	0.8492	0	Positiva fuerte
CF-EV	0.8524	0	Positiva fuerte
EF-EV	0.8105	0	Positiva fuerte
AdV-EV	0.7725	0	Positiva moderada
Agua residual tratada de uso en riego			
	Coefficiente de correlación	P	Correlación
CF-EF	0.8022	0.001	Positiva fuerte
Agua subterránea			
	Coefficiente de correlación	P	Correlación
EF-EV	0.768	0	Positiva moderada
AdV-EV	0.5799	0.0019	Positiva débil

Adv: Adenovirus grupo F, EV: Enterovirus
CF: Coliformes fecales, EF: enterococos fecales

8.3 Resultados por temporada de muestreo

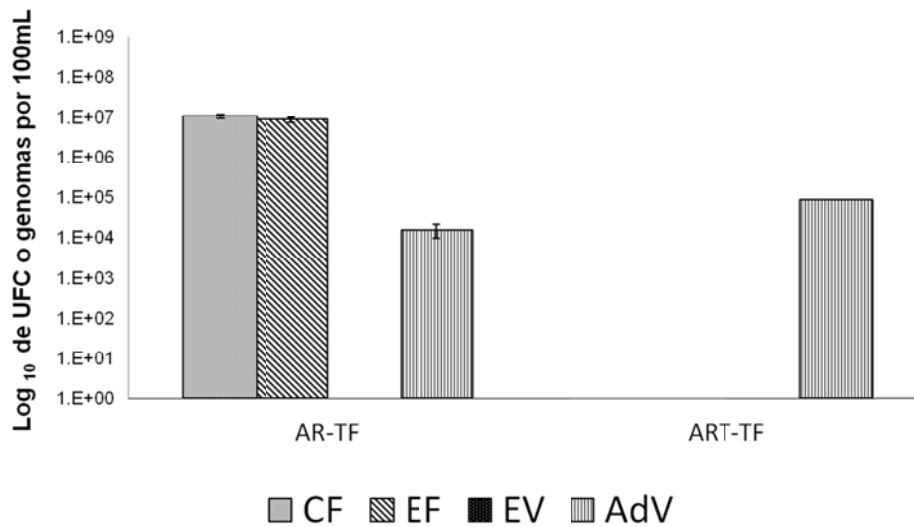
8.3.1 Temporada fría-seca

En esta temporada solo los AdV fueron detectados en todos los tipos de agua muestreados. En el agua residual se encontraron con un promedio de 1.55×10^4 genomas/100 mL, mientras que en el agua residual tratada el promedio fue de 8.73×10^4 genomas/100 mL (Figura 3). Por su parte, el agua residual tratada de reúso en riego mostró en un intervalo entre 5.4×10^3 a 1.83×10^5 genomas/100 mL dependiendo del aspersor muestreado (Figura 4).

Para el agua subterránea se obtuvo un resultado positivo para el sitio del pozo multifamiliar con un conteo de 343 genomas/100mL.

Es posible que la persistencia de AdV se deba a que presenta una gran resistencia a los métodos biológicos de tratamiento como la cloración (Enríquez *et al.*,1995).

Los EV solo fueron detectados en el agua subterránea en dos muestras, una en el pozo Multifamiliar y otra en el pozo Química, con conteos de 160 y 240 genomas /100 mL respectivamente.



AR-TF: Agua residual temporada fría-seca

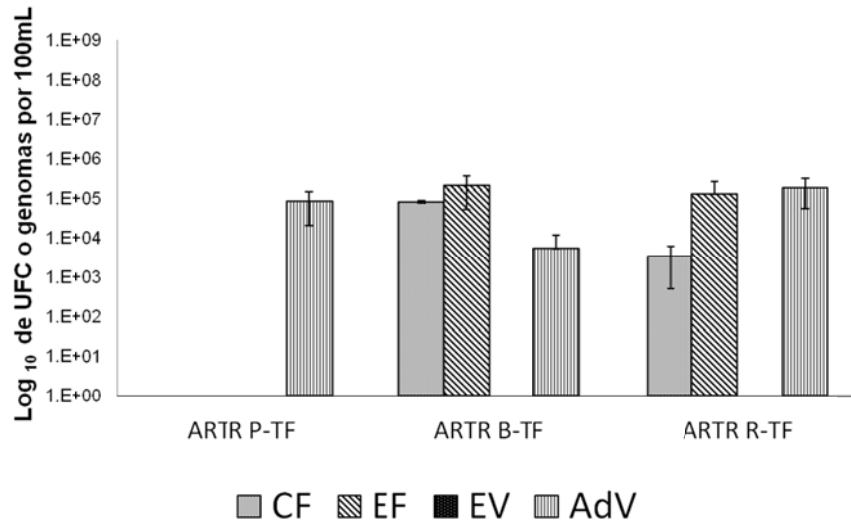
Figura 3. Conteos de los diferentes indicadores para agua residual y residual tratada durante la temporada fría-seca.

Los CF y EF fueron detectadas en el agua residual con conteos de 1.1×10^7 y 1.2×10^7 UFC/100 mL respectivamente. No se detectaron muestras positivas en el agua residual tratada para ninguna de las dos bacterias lo que mostró que el tratamiento las estaba eliminando adecuadamente.

Los conteos de CF en agua residual tratada de reúso para riego arrojaron entre 3×10^3 y 1.08×10^5 UFC/100 mL como resultado. Los EF se detectaron entre 4×10^3 y 3.90×10^5 UFC/100 mL.

En el caso del aspersor Pumitas no se encontraron bacterias indicadoras en ninguna muestra de esta temporada (Figura 4), es posible que este resultado se

relacione con el manejo del agua en esta zona, ya que el tipo de agua con el que se llenan las cisternas es en ocasiones agua para uso y consumo humano y otras agua residual tratada dependiendo de la disponibilidad de la misma.



ARTR P-TF: Agua residual tratada de uso en riego aspersor pumitas ARTR B-TF: Agua residual tratada de uso en riego aspersor bigotes ARTR R-TF: Agua residual tratada de uso en riego aspersor rectoría.

Figura 4. Conteos de los diferentes indicadores para residual tratada de reúso en riego durante la temporada fría-seca.

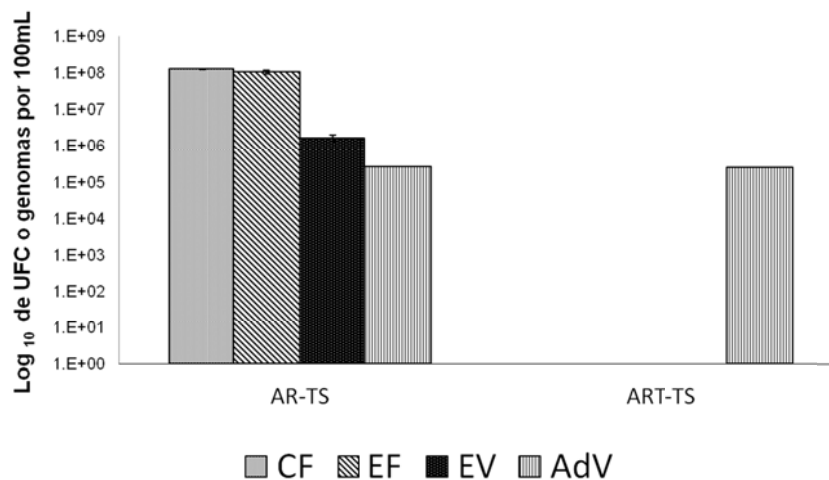
8.3.2 Temporada cálida-seca

En el caso de AdV en agua residual se obtuvo un conteo promedio de 2.6×10^5 genomas/100 mL y para el agua residual tratada de 2.6 genomas/100 mL. En ambos casos son un orden de magnitud mayor que en la temporada fría (Figura 5).

En el agua residual tratada de uso en riego los conteos de AdV estuvieron en el rango de 2.6×10^4 a 6.7×10^4 genomas/100 mL (Figura 6).

En esta temporada para agua residual se obtuvieron conteos de EV de 1.6×10^6 genomas/100 mL (Figura 5) lo que coincide con las fechas del inicio de la temporada de vacunación infantil.

Al igual que durante la TF, no se detectaron genomas virales de EV en el agua residual tratada.



AR-TS: Agua residual temporada cálida-seca. ART-TS Agua residual tratada temporada cálida-seca.

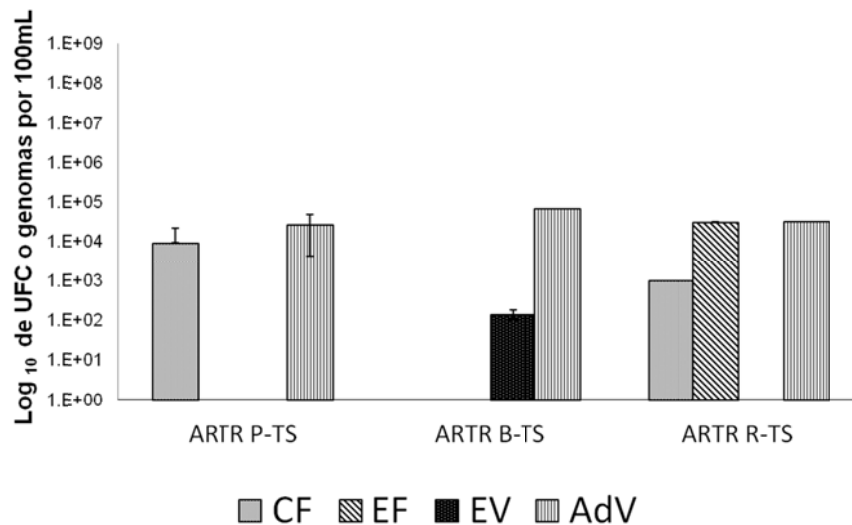
Figura 5. Conteos de los diferentes indicadores para agua residual y residual tratada durante la temporada cálida-seca.

En el caso del agua residual tratada de reúso en riego solo la zona denominada aspensor bigotes tuvo muestras positivas con un promedio de 141 genomas/100 mL (Figura 6).

Para las bacterias indicadoras, el conteo promedio en agua residual tratada fue de 1.3×10^8 y de 1.1×10^8 UFC/100 mL para CF y EF respectivamente (Figura 5).

No se detectaron bacterias indicadoras en ninguna muestra para el agua residual tratada.

En el caso del agua residual tratada de reúso en riego solo se encontraron muestras positivas para CF en el aspersor Pumitas y Rectoría con conteos de 9×10^3 y 1×10^3 UFC/100 mL y para EF solo en aspersor Rectoría con 3×10^4 UFC/100 mL (Figura 6).



ARTR P-TS: Agua residual tratada de uso en riego aspersor Pumitas ARTR B-TS: Agua residual tratada de uso en riego aspersor Bigotes ARTR R-TS: Agua residual tratada de uso en riego aspersor Rectoría.

Figura 6. Conteos de los diferentes indicadores para residual tratada de reúso en riego durante la temporada cálida-seca.

Durante esta temporada no se detectaron bacterias indicadoras ni genomas virales de AdV o EV en el agua subterránea. Por lo que no se muestran datos.

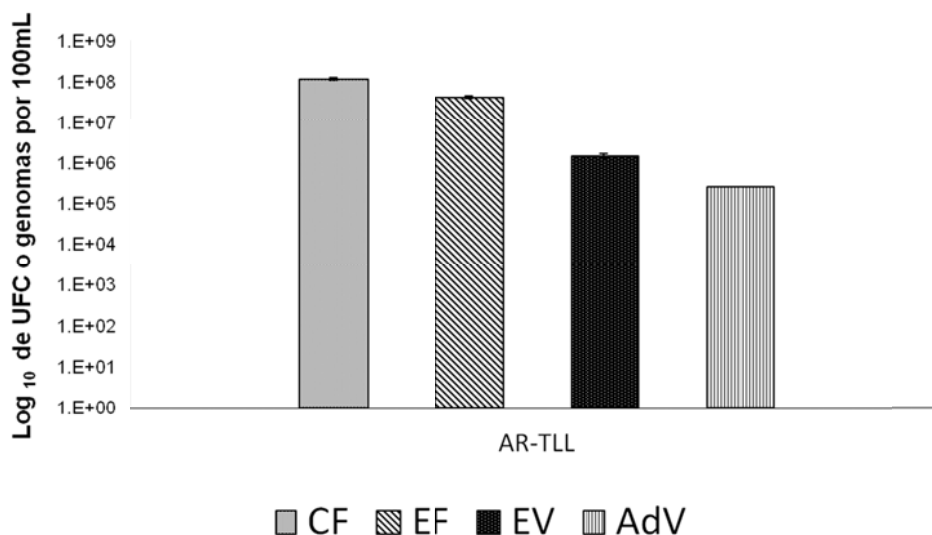
8.3.3 Temporada cálida-lluvias

Durante esta temporada el agua que se recibe en la PTARCA no es tratada, ya que se considera que el agua de lluvia recibida tiene un efecto de dilución sobre los agentes patógenos debido al aporte de agua pluvial.

Debido a ello el agua es dirigida directamente al sistema de alcantarillado público sin ningún tratamiento por lo que únicamente se tomaron muestras a la entrada de la planta. Durante esta temporada también se hace innecesario el uso del sistema de riego debido a las lluvias, por lo que tampoco se tomaron muestras de agua residual tratada de reúso en riego. En el agua residual los conteos de AdV fueron de 2.6×10^5 genomas/100 mL mientras que los de EV fueron de 1.5×10^6 genomas/100 mL (Figura 7).

Los conteos promedio de CF fueron de 1.2×10^8 UFC/100 mL y lo de EF de 4.2×10^7 UFC/100 mL.

Para el agua subterránea solo se tiene un resultado positivo para EV y EF en Pozo Vivero, con un conteo de 50 genomas/100 mL y una muestra positiva de EF.

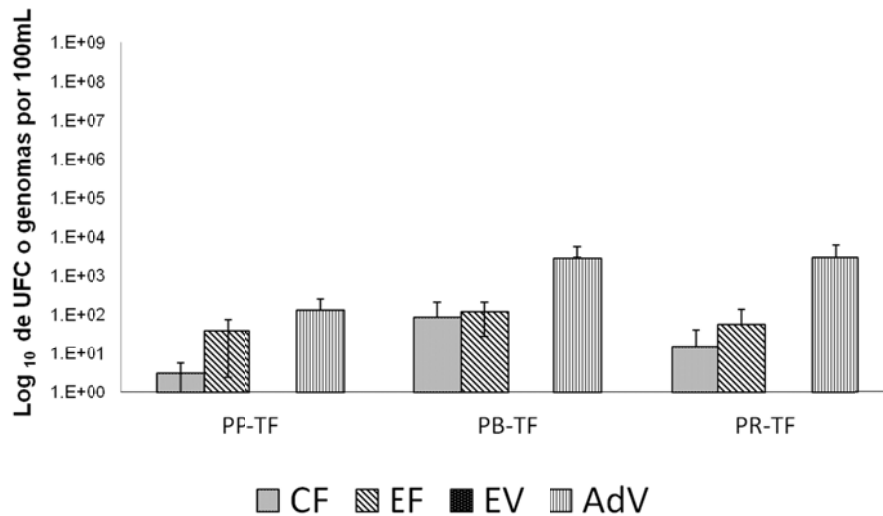


AR-TLL: Agua residual temporada cálida-lluvias.

Figura 7. Conteos de los diferentes indicadores para agua residual y residual tratada durante la temporada cálida-lluvias.

8.3.4 Matriz vegetal

Durante la TF el conteo de AdV fue entre 1.2×10^2 y 2.8×10^3 genomas/100 mL, mientras que no se tuvieron resultados positivos para EV. El conteo de CF se registró en un intervalo de 3 a 8.1×10^1 UFC/100 mL y el de EF entre 3.8×10^1 y 1.2×10^2 UFC/100 mL (Figura 8).



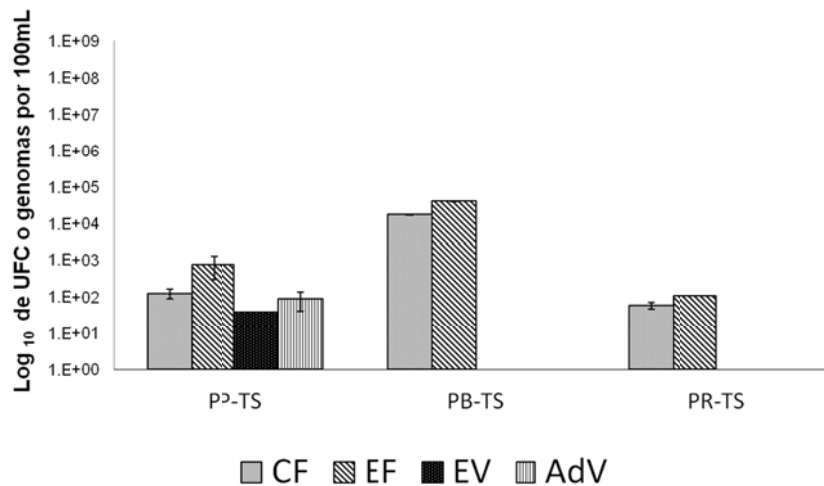
PP-TF: Pasto Pumitas temporada fría-seca, PB-TF: Pasto Bigotes temporada fría-seca, PR-TF: Pasto Rectoría temporada fría-seca.

Figura 8. Conteos de los diferentes indicadores para pastos de CU durante la temporada fría-seca.

Durante la TS el conteo de AdV y EV se vio disminuido ya que solo se encontró un conteo de 90 genomas/100 mL para AdV y de 40 genomas/100 mL Pumitas mientras que los otras muestras resultaron negativas.

Para el caso de bacterias el conteo durante TS aumentó con respecto al de la TF, para CF el conteo estuvo entre 6×10^1 a 1.8×10^4 UFC/100 mL y el conteo de EF entre 1.1×10^2 a 4.2×10^4 UFC/100 mL (Figura 9).

Es posible que debido a la radiación solar tuviera un efecto negativo sobre las partículas virales durante la TS afectando su viabilidad, ya que puede desestabilizar las proteínas de la cápside viral y destruir el material genético (Meng y Gerba, 1996).



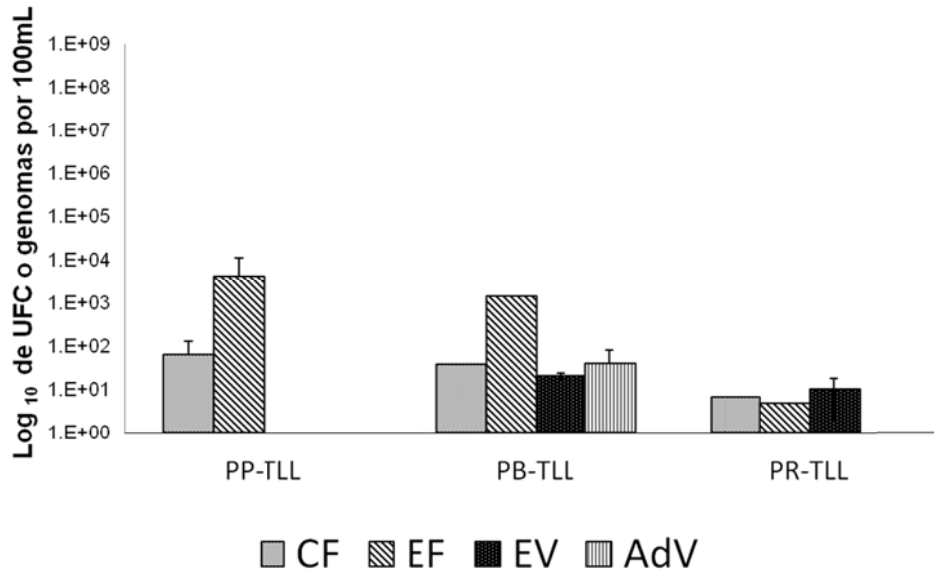
PP-TS: Pasto pumitas temporada cálida-seca, PB-TS: Pasto bigotes temporada cálida -seca, PR-TS: Pasto rectoría temporada cálida -seca.

Figura 9. Conteos de los diferentes indicadores para pastos durante la temporada cálida-seca.

Durante la TLL la tendencia es similar a la encontrada durante la TS, el conteo de bacterias indicadoras aumentó con respecto al título encontrado de genomas virales.

AdV fue positivo para el sitio Pumitas, con un conteo de 40 genomas/100 mL y el conteo de EV fue positivo en el sitio bigotes con 20 genomas/100 mL y de 10 genomas/100 mL en el sitio de rectoría.

Para CF los conteos fueron entre 7 a 6.3×10^1 UFC/100 mL y para EF de 5 a 4×10^3 UFC/100 mL (Figura 10).



PP-TLL: Pasto Pumitas temporada cálida-lluvias, PB-TLL: Pasto Bigotes temporada cálida-lluvias, PR-TLL: Pasto Rectoría temporada cálida-lluvias.

Figura 10. Conteos de los diferentes indicadores para pastos durante la temporada cálida-lluvias.

8.3.5 Análisis de varianza

Con el fin de conocer si existe una diferencia significativa en el número de UFC o genomas durante las diferentes temporadas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los indicadores cuantificados en este estudio, usando una transformación logarítmica de los datos; los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Análisis de varianza para comparar datos microbiológicos entre temporada fría-seca, cálida-seca y cálida-lluvias del ciclo 2009 para los diferentes muestreos en Ciudad Universitaria.

Parámetro	Muestra	Fría-seca (TF) Media geométrica	Cálida-seca (TS) Media geométrica	Cálida-lluvias (TLL) Media geométrica	F	P	Rangos múltiples		
							TF	TS	TLL
Coliformes fecales UFC/100mL	AR	10,533,333	127,111,111	116,888,889	84.66	0.0000	X	XX	XX
	ART	0	0	-	-	-	-	-	-
	ARTR	43,000	50,000	-	0.20	0.6617	X	X	-
	Subter.	1	0	0	2.15	0.1395	X	X	X
	Pasto	48	5973	36	2.22	0.0305	X	XX	X
Enterococos fecales UFC/100mL	AR	10,533,333	104,777,778	41,888,889	65.63	0.0000	X	XX	XX
	ART	0	0	-	-	-	-	-	-
	ARTR	113,778	100,000	-	2.19	0.1670	X	X	-
	Subter.	1	0	1	0.54	0.5920	X	X	X
	Pasto	68	14,237	1,791	1.64	0.0147	XX	X	X
Adenovirus F genomas/100mL		Media geométrica	Media geométrica	Media geométrica					
	AR	15,487	261,733	258,553	24.72	0.0000	X	XX	XX
	ART	87,333	245,739	-	5.45	0.6329	X	X	-
	ARTR	61,694	41,328	-	1.24	0.2900	X	X	-
	Subter.	343	0	0	0.94	0.0000	XX	X	X
Pasto	1,335	92	62	0.36	0.0280	X	XX	XX	
Enterovirus genomas/100mL	AR	0	1,644,444	1,506,667	27.01	0.0000	X	XX	XX
	ART	0	0	-	-	-	-	-	-
	ARTR	0	47	-	2.54	0.1394	X	X	-
	Subter.	18	0	6	1.75	0.1957	X	X	X
	Pasto	0	1	6	2.19	0.1335	X	X	X

De acuerdo con estos resultados, en el agua residual se tienen diferencias significativas para todos los indicadores de contaminación fecal y viral considerados en este trabajo., Cabe hacer notar que mientras la cantidad de bacterias indicadoras aumenta en la TS y TLL la cantidad de genomas de AdV disminuye.

Se observa además una diferencia en la cantidad de bacterias y genomas virales detectados en pasto durante las diferentes temporadas. Cabe destacar que durante la temporada fría es cuando se cuantifica una mayor cantidad de partículas virales., Mientras que las bacterias tienen un comportamiento inverso, ya que el mayor número fue detectado durante la TS y TLL, cuando la temperatura fue más alta.

9. DISCUSIÓN

De acuerdo con los datos obtenidos en el sistema de abastecimiento y manejo de agua de CU, se detectó la presencia de diferentes tipos de indicadores de contaminación fecal y viral.

Debido a las características y manejo de CU, estos datos son de utilidad para conocer si la presencia de estos microorganismos indicadores puede significar un riesgo potencial para el personal y estudiantes del Campus. Además este estudio puede ser un precedente para poder diseñar estudios similares en los diferentes *campi* de la universidad o incluso en diferentes áreas de la ciudad de México o del país.

Es importante recalcar que el método modificado de concentración de muestras de agua por ultrafiltración utilizado durante este estudio resultó adecuado para la aumentar la cantidad de partículas virales detectables en las diferentes tipos de agua (Hill *et al.*, 2005). El cartucho filtrante utilizado es casi 10 veces más barato que los cartuchos electropositivos (CUNO) propuestos por la EPA (EPA, 1995). La eficacia de

recuperación del cartucho CUNO es de alrededor del 90% mientras que la eficacia de recuperación de partículas virales con los cartuchos de polisulfona F80A fue del 70% sin embargo estos pueden ser reutilizados una vez que se desinfecten. Esto repercute en una disminución significativa de costo de la realización de las pruebas de detección de partículas virales y brinda la posibilidad de realizar muestreos más amplios, lo que incrementa la representatividad de los resultados.

Durante el estudio se cuantificaron los genomas de AdV F y EV. Ambos agentes virales han sido propuestos como indicadores de contaminación fecal y viral en agua de uso humano (EPA, 2009). Evaluar la presencia y la cantidad de virus tiene como ventaja frente a las bacterias indicadoras que no pueden presentar un recrecimiento que afecte a los resultados, ya que requieren de una célula hospedero humana para replicarse (Noble *et al.*, 2001), lo cual hace que su evaluación sea más cercana a la realidad en cuanto a la contaminación fecal y riesgos potenciales a la salud

AdV F fue el único que se detectó después del proceso de tratamiento en la PTARCA, mientras que EV fue removido durante el proceso de tratamiento.

Se ha reportado que los AdV F son comunes en lodos de aguas residuales tratadas y se encuentran en cantidades de alrededor de 10 veces superiores a EV, y se ha reportado su presencia en diferentes plantas de tratamiento alrededor del mundo bajo diferentes condiciones de tratamiento, lo que lo hace un buen candidato para ser usado como indicador de contaminación viral fecal (Dong *et al.*, 2010; Maier *et al.*, 2009; Bofill-Mas *et al.*, 2006)

Se ha reportado que AdV presenta una gran resistencia a los métodos de desinfección como la cloración, y que es termoestable a temperaturas mayores a 50°C, temperaturas a las cuales EV es inactivado rápidamente (Enriquez *et al.*, 1995; Thurston-Enriquez, 2003). Es además un virus con doble cadena de DNA y cuenta con sistema de reparación de nucleótidos dañados lo que puede aumentar su persistencia en condiciones adversas frente a otros virus como EV o hepatitis A, que son virus de RNA de cadena sencilla y no cuentan con un sistema de reparación (Jiang, 2006).

Nuestros resultados apoyan la idea de que la cuantificación de AdV F nos podría permitir conocer la eficacia del sistema de tratamiento, ya que se presenta en más muestras con respecto a EV, CF y EF. Además, la presencia de AdV F nos podría indicar la presencia de otros grupos virales en el agua que pueden ser de importancia para la salud pública.

La cantidad de EV fue mayor sobre todo en el agua residual. Por otro lado, es probable que las partículas de EV sean más susceptibles a la cloración y factores ambientales que AdV (Jiang, 2006).

En el agua residual sin embargo, hubo un marcado aumento de partículas virales de poliovirus durante la TS y la TLL que coincidieron con fechas posteriores a la primera (21 a 27 de febrero) y la segunda (13 al 19 de junio) semanas Nacionales de Vacunación del 2009, durante las cuales se administra la vacuna polio oral a niños menores de cinco años. Es probable que los genomas detectados de EV pertenezcan al grupo de Poliovirus 1, 2 y 3. Los poliovirus de la vacuna oral son partículas activas atenuadas que al ser aplicados se replican en los enterocitos de los infantes, por lo que las heces de los niños vacunados contienen grandes cantidades de poliovirus que son descargados al agua residual y pueden ser detectados (Pavlov *et al.*, 2005; Lago *et al.*,

2004; Jiménez *et al.*, 2001). En CU, el Centro de Desarrollo Infantil (CENDI, CU) atiende y da servicio a infantes hijos de empleados de la UNAM, y el agua residual que generan es conducida y tratada directamente en la PTARCA.

Se tienen reportados algunos estudios donde se busca la cantidad de poliovirus vacunal en cuerpos de agua de diferentes partes de la República Mexicana y se reportan en mayor grado en los estados de Tlaxcala y en el D.F. (Rodríguez Mejía, 2001).

Es recomendable considerar como parte de los estudios de este tipo la secuenciación de los segmentos de genoma detectados a fin de identificar específicamente a los EV y los virus entéricos de interés.

Es importante señalar que estos datos nos indican que la cloración, como es manejada, no parece ser efectiva para la eliminación de patógenos como los virus entéricos, por lo que es recomendable considerar el uso de otros métodos de desinfección como el ozono (O₃) que, además de no producir subproductos potencialmente cancerígenos como trihalomentanos, favorece la destrucción de ácidos nucleicos y produce lisis celular, con la consecuente eliminación de bacterias y virus de forma efectiva (Bitton, 2005).

A pesar de que todas las muestras de agua residual tratada fueron negativas para bacterias indicadoras, sí se encontraron resultados positivos en el agua residual tratada para reúso en riego, lo que sugiere una contaminación del sistema de almacenamiento (cisternas) o bien un recrecimiento debido posiblemente a que el agua permanece almacenada, en oscuridad y a una temperatura promedio de 18°C. Ya se ha reportado la sobrevivencia de CF y EF asociados a sedimentos y biopelículas, sobre todo en ambientes intertropicales y tropicales (Hardina y Fujiorka, 1991). También se ha

reportado un recrecimiento de *Escherichia coli* en sistemas de distribución y ambientes naturales, sobre todo en zonas de temperaturas cálidas (Byappanahalli y Fujioka, 1998; Desmaris *et al.*, 2002; Uhl *et al.*, 2004). En un estudio reciente de Gerba y colaboradores (2009) encontraron que la formación de biopelículas en zonas de almacenamiento de agua como cisternas y pipas de agua puede favorecer el recrecimiento de bacterias coliformes debido a que se crean microambientes donde la acción de los desinfectantes es menor y donde las condiciones protegidas pueden favorecer su crecimiento.

En varias muestras de agua subterránea se encontraron resultados positivos para CF y EF así como para los genomas de AdV F y EV, lo que sugiere la existencia de una contaminación del acuífero, posiblemente debido a que el tipo de terreno volcánico permite una rápida infiltración del agua (Noyola y Morgan-Sagastume, 2004) y la baja cobertura de drenaje en la zona. Fonseca (2010) reporta la presencia de bacteriófagos en muestras de las mismas zonas de abastecimiento de agua y estos resultados recalcan la importancia de considerar la búsqueda de estas fuentes de contaminación y poner especial cuidado en la desinfección y monitoreo del agua que es extraída.

Un aspecto muy importante a considerar es la presencia de virus y bacterias en el agua residual de reúso en riego, ya que se utiliza en áreas verdes del *campus* Universitario. En estos sitios se realizan diversas actividades deportivas y recreativas por parte de la comunidad universitaria así como por vecinos y visitantes. Es común el juego, el descanso y la ingesta de alimentos. Esta población está expuesta a la presencia de los patógenos detectados, por lo que puede considerarse como un riesgo potencial para la salud de los usuarios de estas áreas (Datos PUMAGUA, 2010). Es

importante señalar que la cantidad de bacterias CF encontradas en el agua residual tratada de reúso para riego rebasa los límites permisibles que se señalan en la Norma Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997 para este tipo de agua. Además, es fundamental considerar la presencia de los otros patógenos virales y bacterianos que no son considerados en la norma.

El análisis de la matriz vegetal revela un comportamiento diferencial entre las bacterias indicadoras y los virus cuantificados, ya que la cantidad de bacterias detectadas fue menor durante la TF y mayor durante las temporadas más cálidas (TS y TLL), mientras que la cantidad de genomas virales presentó un comportamiento inverso, siendo mayor durante la TF y menor en la TS y TLL.

A pesar de que la temperatura puede jugar un papel importante en este comportamiento, estos datos sugieren que la radiación solar (en particular los rayos UV) puede estar jugando el papel más importante. Se ha reportado que la radiación solar inactiva partículas virales por la desnaturalización de las proteínas que forman la cápside viral y la formación de dímeros de timina, y posteriormente destruye el material genético (Meng y Gerba, 1996; Love *et al.*, 2010). A diferencia de los virus las bacterias coliformes poseen eficientes sistemas de reparación celular y de su material genético y nucleótidos que les permiten ser más tolerantes a los rayos UV (Meng y Gerba, 1996; Maier *et al.*, 2009) y por lo tanto sobrevivir más tiempo a la exposición solar.

Los virus entéricos son resistentes a las bajas temperaturas y se ha reportado que estas temperaturas pueden favorecer la conservación de su estructura proteica y por lo tanto su prevalencia, por el contrario las bacterias se ven afectadas en su ciclo normal de crecimiento y metabolismo cuando las temperaturas descienden, lo que puede disminuir su sobrevivencia (Maier *et al.*, 2009).

Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en la matriz vegetal para los virus y bacterias cuantificados en lo que se refiere al efecto de los cambios de temperatura ambiental durante las temporadas estudiadas.

No existe en México una legislación acerca de las cantidades permisibles de virus entéricos en agua de reúso pero, sin embargo, existen propuestas de organismos como la EPA que propone que los tratamientos de desinfección deben lograr una disminución en 99.99% de partículas virales en agua para consumo humano (EPA, 2009). En el estado de California (California Regulations Related to Drinking Water, 2010) la legislación exige métodos de tratamiento que remuevan 99.99% de bacteriofago F-RNA específico o poliovirus para el agua de consumo, y Hawaii (Hawaii Administrative Rules, 2005, Hawaii Water Reuse, 2004) exige igualmente una reducción del 99.99% de virus para el agua de consumo y de reúso en riego agrícola. En la legislación de Australia también se exige para el agua de consumo métodos de tratamientos que remuevan el 99.99% de los virus entéricos en agua de consumo (Australian Drinking Water Guidelines, 2004)

En México, la legislación para el manejo del agua para uso y consumo humano (NOM-127-SSA1-2000) y para el reúso de agua residual tratada (NOM-003-SEMARNAT-1997) establece los límites permisibles de coliformes fecales, pero no contempla otros microorganismos como protozoarios y virus que pueden significar un riesgo importante para la salud pública. En este trabajo la detección de virus en el agua subterránea y agua de reúso demuestra que es importante revisar la normatividad vigente y sugerir la posible inclusión de un indicador de contaminación viral que puedan indicar la presencia de virus y protozoarios de importancia para la salud pública.

10. CONCLUSIONES

- El sistema de tratamiento en la PTARCA es adecuado para la remoción de CF, EF y EV pero no para AdV F.
- AdV F presenta una mayor resistencia a los sistemas de tratamiento y desinfección de agua residual que EV, CF y EF. Es por ello que se propone como indicador de la eficiencia de tratamiento de agua residuales y de contaminación fecal y viral de fuentes de abastecimiento, además de que es un indicador confiable debido a que no puede crecer en los sistemas de almacenamiento.
- La presencia de genomas EV en agua residual puede estar relacionada con las campañas de vacunación infantil, ya que el agua proveniente del CENDI CU es tratada en la PTARCA, donde se vacuna a infantes de trabajadores del campus. Sin embargo es necesario un estudio directo en las aguas residuales del centro para poder comprobarlo.
- Este trabajo proporciona información sobre la persistencia de virus y bacterias en áreas verdes lo que puede significar un riesgo para los usuarios de estas áreas.
- La temperatura y la incidencia de rayos solares pueden afectar el número de bacterias y virus, disminuyendo en mayor grado la cuantificación de genomas virales.
- La detección de bacterias indicadoras en sistemas de almacenamiento de agua residual de reúso en riego brinda información sobre su probable recrecimiento, lo que puede significar un riesgo potencial para los usuarios en contacto con

áreas verdes, por lo que es recomendable dar mantenimiento y limpieza a las cisternas y realizar un monitoreo de la calidad del agua que se almacena..

- Este trabajo proporciona información sobre el comportamiento de virus y bacterias indicadoras en diferentes tipos de agua, específicamente para México, cuya localización intertropical puede afectar la temporalidad de los patógenos cuantificados.
- La identificación de virus y bacterias en este trabajo pone en evidencia que es importante la revisión de la normatividad vigente en materia de calidad del agua en México y proponer la inclusión de indicadores de la presencia de enteropatógenos virales que pueden ser de importancia para la salud pública en nuestro país.

LITERATURA CONSULTADA

Aboites L., Cifuentes E., Jiménez B., Terregrosa M.L. 2008. *Agenda del Agua*.

Academia Mexicana de Ciencias. 56 pag.

APHA, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 2005. APHA, AWWA 21 th edition, Washington D.C.

Ashbolt N.J., Grabow W.O., Snozzi M. 2001. *Indicators of microbial water quality. in Water quality – Guidelines, standards and health*. Fewtrell, L., Bartram J. IWA Publishing. London.

Australian Drinking Water Guidelines (ADWG). 2004. National Water Quality Management Strategy.

- Borrego J.J., Córnox R. Moriñigo M. A., Martínez-Manzanares E., Romero P. 1990. Coliphages as an indicator of fecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Water Research*. 24:111-116
- Bosch, A., Guix S., Sano D., Pintó R. 2008. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*.19:295-301
- Byappanahalli, M. y Fujioka R. 1998. Evidence that tropical soil environmental can support the growth of *Escherichia coli*. *Water Science and Technology*. 38:171-174.
- California Regulations Related to Drinking Water. 2011. California Department of Public Health. USA States Regulations.
- Carabias, J., Landa R., Collado J., Martínez P. 2005. *Agua, Medio Ambiente y Sociedad Hacia la Gestión Integral de los Recursos Hídricos en México*. Universidad Nacional Autónoma de México, El colegio de México, Fundación Gonzalo Rio Arronte. México D.F.
- Cliver, D.O. 2009. Capsid and Infectivity in Virus Detection. *Food and Environmental Virology*. 1:123-128.
- Cruz, J.R., Caceres, P., Cano F., Flores J., Bartlett A., Torun B.1990. Adenovirus types 40 and 41 and rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala. *Journal of Clinical Microbiology*. 28:1780-1784
- Deetz, T.R., Smith E.M., Goyal S.M., Gerba C.P., Vollet Iii J.J., Tsai L., Dupont H. L., Keswick B. H. 1984. Occurrence of rota- and enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. *Water Research*. 18: 567-571.

- Denis-Mize K., Shay Fout G., Dahling D.R., Francy D.S. 2004. Detection of human enteric viruses in stream water with RT-PCR and cell culture. *Journal of Water and Health*. 02: 37-47
- Desselberger U. y Gray J. 2005. Viral Gastroenteritis. *Medicine* 33: 78-81
- Desmarais T.R., Solo-Gabriele H. M., Palmer C.J. 2002. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:1165–1172.
- Bitton G. 2005. *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss, New York. Block, S.S. 1991. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Fourth Ed. Lea and Febiger, Philadelphia. 746 págs.
- Bofill-Mas S., Albinana-Gimenez N., Clemente-Casares P., Hundesa A., Rodriguez-Manzano J., Allard A., Calvo M., Girones R. 2006. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7894-7896.
- Divizia M., Gabrieli R., Donia D., Macaluso A., Bosch A., Guix S., Sanchez G., Villena C., Pinto R., Palombi M., Buonomo E., Cenko F., Leno L., Bebeci D., Bino S.. 2004. Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Science and Technology*. 50:57-61.
- Dong Y., Kim J., Lewis G.D. 2010. Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. *Journal of Applied Microbiology* 108:800-809.
- Donia D., Bonanni E., Diaco L., Divizia M. 2010. Statistical correlation between enterovirus genome copy numbers and infectious particles in wastewater samples. *Letters in Applied Microbiology*. 50:237-240.

- Dubois E., Agier C., Traoré O., Hennechart C., Merle G., Crucière C., Laveran H. 2002. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *Journal of Food Protection* 12:1962–1969.
- Dubois E., Hennechart C., Deboosère N., Merle G., Legeay O., Burger C., Le Calvé M., Lombard B., Ferré V., Traoré O. 2006. Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 2:164–171.
- Enriquez C. E., Hurst C. J., Gerba C. P. 1995. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and wastewater. *Water Research*. 29:2548-2553.
- EPA. 2009. National Primary Drinking Water Regulations.
- EPA. 2007. Drinking Water Contaminant Candidate List 3—Final.
- EPA. 2006. *Ultraviolet Disinfection Guidance Manual for the Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule*, 2006.
- EPA . 1995. EPA/814-B-95.002 Virus Monitoring Protocol for the Information Collection Requirements Rule.
- Espinosa-García A.C., Arias-Ortiz C., Mazari-Hiriart M. 2004. Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública. *Hidrobiológica* 14: 166-178.
- Espinosa A.C., Arias C.F., Colón S.S., Hiriart M.M. 2008. Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. *Environmental Health*. 8: 49

- Espinosa A.C. 2008. Presencia de virus entéricos en agua: efecto de la calidad del agua sobre su estabilidad e infectividad. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Estadística del Agua en México. 2010. Reporte anual de la Comisión Nacional del Agua México.
- Fields B., Knipe D., Howley P., Griffin D. 2006. Fields' virology. 5ta edición. Lippincott Williams & Wilkins. 3177 pág.
- García E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köepen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.
- Gerba C.P., Gramos D.M., Nwachuku N. 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus type 2 by UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5167-5169.
- Gerba C.P. 2009. Environmentally Transmitted Pathogens *in* Maier R., Pepper I., Gerba C.P. 2009. *Environmental Microbiology* 2nd ed. Academic Press. págs. 445-484.
- Gerba C.P., Farrah S.R., Goyal S.M., Wallis C., Melnick J. L. 1978. Concentration of Enteroviruses from Large Volumes of Tap Water, Treated Sewage, and Seawater. *Applied and Environmental Microbiology.* 35: 540-548
- Gerba C.P., Goyal S.M., Labelle R.L., Cech I., Bodgan G.F. 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *American Journal of Public Health* 69:1116–1119.
- Haramoto E., Katayama H., Oguma K., Ohgaki S. 2005. Application of Cation-Coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 2403–2411

- Hardina C.M. y Fujiorka R.S.. 1991. Soil: The Environmental Source of *Escherichia coli* and Enterococci in Hawaii's Streams. *Environmental Toxicology and Water Quality: An international Journal*. 6:185-195 págs.
- Hawaii Administrative Rules, 2005, Title 11, Chapter 20, Potable Water Systems
- Hawaii Water Reuse Survey and report final. 2004
- Health Canada. 2004. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Supporting Documentation.
- Hernandez-Morga J., Leon-Felix J., Peraza-Garay F., Gil-Salas B.G., Chaidez C. 2009. Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration – RT-PCR integrated methods. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 1579–1590
- Hijnen, W.A., Beerendonk E.F., Medema G.J.2006. Inactivation Credit of UV Radiation for Viruses, Bacteria and Protozoan (oo)cysts in Water: A Review, *Water Research*. 40:3-22
- Hill V.R., Polaczyk A.L., Hahn D., Narayanan J., Cromeans T.L., Roberts J.M. 2005. Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6878–6884.
- Hot D., Legeay O., Jacques J., Gantzer C., Caudrelier Y., Guyard K., Lange M., Andréoletti L. 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Research*. 37:4703-4710.

- Hurts C.J., Benton W. H., McClellan K. A. 1988. Suppression of viral replication by guanidine: a comparison of human adenovirus and enterovirus. *Journal of Virology Methods*. 22:1-11.
- INEGI 2008. México y sus municipios. Segundo conteo de población y vivienda 2005. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México D.F.
- Jiang, S.C. 2006. Human Adenoviruses: Occurrence and Health Implication: A critical review. *Environmental Science and Technology*. 40:7132-7140
- Jiménez B. 2006. Irrigation in Developing Countries Using Wastewater. *International Review for Environmental Strategies*. 6: 229-250.
- Jiménez P., Más P.J., Sarmiento L.R., Barrios M.B. 2001. Aportes al conocimiento acerca de la permanencia y circulación del poliovirus vacunal en el ambiente. *Rev Cubana Med Trop*. 53:118-21
- 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*. Ed. Feyen, Shannon y Neville, Londres. pp. 387-396.
- Karim M., Rhodes E.R., Brinkman N, Wymer L., Fout G. S. 2009. New Electropositive Filter for Concentrating Enteroviruses and Noroviruses from Large Volumes of Water. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2393–2399.
- Koopmans M., Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90 (1), 23–41.
- Kuo D., Simmons F.J., Blair S., Hart E., Rose J.B., Xagorarakis I. 2010. Assessment of human adenovirus removal in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water Research*. 44:1520-1530.

- Ma J.F., Straub T.M., Pepper I.L., Gerba C.P.. 1994. Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:4203-4206.
- Marshall J.A., Bruggink L.D., Sturge K., Subasinghe N., Tan A., Hogg G.G. 2007. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 67–71.
- Mazari M., Jiménez B., López Y. 2005. Programa Agua, Medio Ambiente y Sociedad. Documento de trabajo No. 4. Publicación del Colegio de México. 91 pags.
- Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. 2009. *Environmental Microbiology*. China. Academic Press. 598 págs.
- Meng Q.S., Gerba C.P. 1996. Comparative inactivation of enteric adenovirus, poliovirus, and coliphages by ultraviolet irradiation. *Water research*. 30:2665-2668.
- Modificación a 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.
- Monpoeho S., Dehee A., Mignotte B., Schwartzbrod L., Marechal V., Nicolas J.C., Billaudel S., Ferre V. 2000. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques* 29: 88–93.
- Mocé-Llivina L., Lucena F., Jofre J. 2005. Enteroviruses and Bacteriophages in Bathing Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6838–6844
- Muir P., Van Loon A.M. 1997. Enterovirus infections of the central nervous system. *Intervirology*. 40:153-66.
- Muir P., Ras A., Klapper P.E., Cleator G.M., Korn K., Aepinus C., Fomsgaard A., Palmer P., Samuelsson A., Tenorio A., Weissbrich B., van Loon A. M. 1999. Multicenter

quality assessment of PCR methods for detection of enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:1409-1414.

Noble R.T., y Fuhrman J.A. 2001. Enteroviruses detected in the coastal waters of Santa Monica Bay, CA: low correlation to bacterial indicators. *Hydrobiologia* 460:175–184.

Norma Mexicana NMX-AA-003-SCFI-2006 Aguas residuales, municipales e industriales – muestreo

Norma Mexicana NMX-AA-102-SCFI-2006 Calidad de Agua – Detección Enumeración de Organismos Coliformes, Organismos Coliformes Termotolerantes y *Escherichia coli* Presuntiva – Método de Filtración en Membrana.

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997 Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2000, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano.

Norma Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998, Vigilancia y evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano, distribuida por sistemas de abastecimiento público.

- Lago P., Sarniento L., Díaz J., Barrio A.G. 2004. Circulación silenciosa de poliovirus demostrada por interferencia a los enterovirus no polio. *Rev Cubana Med Trop.* 56:117-25
- LeGuyader F., Dubois E., Menard D., Pummepuy M. 1994. Detection of hepatitis A virus rotavirus and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 60:3665-3671
- 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*, 18: 6965-6970.
- OECD. (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico). 1998. Análisis del desempeño ambiental: México. Perspectivas. París.
- Parashar U.D., Gibson C.J., Bresee J.S., Glass R.I. 2006. Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases.* 12: 304-306
- Pavlov D.N., Van Zyl W.B., Van Heerden J., Grabow W.O., Ehlers M.M. 2005. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in sewage and river water in South Africa. *Water Research.* 14:3309–3319
- Payment P. y Locas A. (2011). Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water* 49: 4-11.
- Peel, M. C., B. L. Finlayson, and T.A. McMahon. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Earth* 1633-1644.
- Polaczyk A., Narayanan J., Cromeans T., Hahn D., Amburgey J., Hill V. 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

Programa Nacional de Salud 2007-2012. 2007. Secretaria de Salud. México D.F.

PUMAGUA avances 2009, Instituto de Ingeniería. UNAM.

Reynolds, K.A. 2001. Introducción a las Enfermedades Microbianas Propagadas a Través del Agua. *Agua Latinoamérica*. Julio/agosto.

Rivera, S.C., Hazen T.C., Toranzos G.A. 1988. Isolation of fecal coliforms from pristine sites in a tropical rain forest. *Applied and Environmental Microbiology*. 54:513-517.

Rodriguez Mejia, Araceli. 2001. Aislamiento y caracterización del poliovirus vacunal en aguas residuales de la república Mexicana. (Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México).

Simonet J., y Gantzer C. 2006. Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *J Appl Microbiol*. 4:862-70.

Skraber S., Gassiolloud B., Schwartzbrod L., Gantzer C. 2004. Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliformes and Poliovirus-1 genome. *Water Res*. 38 (12), 2927–2933.

Scott T., Rose J., Jenkins T., Farrah S., Lukasik J. 2002. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:5796-5803.

SMA D.F. (Secretaria del Medio Ambiente del Distrito Federal). 2000. Estudio para la recarga del acuífero en el suelo de conservación del Distrito Federal.

- Tantawiwat S., Tansuphasiri U., Wongwit W., Wongchotigul V., Kitayaporn D. 2005. Development of multiplex pcr for the detection of total coliform bacteria for *escherichia coli* and *clostridium perfringens* in drinking water. Southeast Asian. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 36: 162-169.
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas C.N., Jacangelo J., Gerba C.P.2003. Chlorine Inactivation of Adenovirus Type 40 and Feline Calicivirus. Applied and Environmental microbiology. 69: 3979–3985.
- Toranzos G. 1991. Current and Possible Alternate Indicators of Fecal Contamination in Tropical Waters: A Short Review. Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal 6:121-130
- 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.
- Uhl W., Schaule G. 2004. Establishment of HPC(R2A) for regrowth control in non-chlorinated distribution systems. International Journal of Food Microbiology. 92: 317-325
- Valiente- Banuet, A. y de Luna García E. 1990. Una lista florística del pedregal de San Ángel. Acta Botánica Mexicana. 9:13-30.
- Vaughn, J. M. y Novotny J. F.1991. Virus inactivation by disinfectans en Hurst, C. J.
- Vega E. 2006. Attachment and survival of viruses on lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L.): role of physicochemical and biotic factors. Tesis de Doctorado. Texas A&M University, EUA.
- WHO. World health organization (Organización Mundial de la Salud). 2006. Guidelines for drinking-water quality.

WHO. World health organization (Organización Mundial de la Salud). 2010. Polio, global eradication initiative. Reporte anual 2010.

Wheeler C., Vogt T.M., Armstrong G.L., Vaughan G., Weltman A., Nainan O.V., Dato V., Xia G., Waller K., Amon J., Lee T.M., Highbaugh-Battle A., Hembree C., Evenson S., Ruta M.A., Williams I.T., Fiore A.E., Bell B.P. 2005. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *N. Engl. J. Med.* 353 (9), 890–897.

Xagorarakis I., Kuo D.H., Wong K., Wong M., Rose J.B. 2007. Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the Great Lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7874–7881.

PAGINAS ELECTRÓNICAS CONSULTADAS

Boletín UNAM-DGCS-582

http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2007/2007_582.html

UNESCO. World Water Development Report: Water for Life. Water for People. 2003.

www.unesco.org/water/wwap/wwdr/table_contents.shtml

Portal de estadística universitaria. La UNAM en números 2009

www.estadistica.unam.mx/numeralia/

Dirección General de Epidemiología.

<http://www.dgepi.salud.gob.mx>