



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

Instituto de Ecología

Evaluación de bacteriófagos FRNA
como indicadores de contaminación
fecal en sistemas acuáticos

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

(BIOLOGIA AMBIENTAL)

PRESENTA

LUIS JOSE RENE ARREDONDO HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARISA MAZARI HIRIART

MÉXICO, DF

NOVIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas.

Al programa de becas nacionales CONACyT.

Al programa de becas complementarias DGEP, UNAM.

Al programa de financiamiento DGAPA N0 IN219303 para la realización del trabajo de investigación.

A mi comité tutorial:

Dra. Marisa Mazari Hiriart.

Dr. Daniel Piñero Dalmau.

Dr. Germán Aguilar Gutiérrez.

A los miembros del jurado.

A los integrantes del laboratorio de Ecología Química, Instituto de Ecología.
UNAM.

A los integrantes del programa de inmunología molecular microbiana, Facultad de Medicina. UNAM.

Agradecimientos

A la Doctora. Marisa Mazari por su guía y apoyo a lo largo del desarrollo del proyecto de investigación.

Al Doctor Daniel Piñero por sus acertadas críticas y perspectiva de este trabajo.

A la Doctora Yolanda López –Vidal por sus valiosos comentarios y facilidades prestadas a la realización de la investigación.

A los Doctores Luis Padilla y Gonzalo Castillo por compartir su experiencia y conocimiento a favor de este trabajo.

Al Doctor Germán Aguilar por sus aportaciones al trabajo metodológico y escrito.

A los integrantes del laboratorio de Ecología Química por su apoyo y solidaridad en este proceso.

Índice

Índice.....	i
Índice de tablas.....	iv
Índice de figuras	iv
Abreviaturas.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	viii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	5
2.1 Epidemiología.....	5
2.2 Características físicas e inmunológicas.....	6
2.3. Transmisión medio ambiental de rotavirus.....	7
2.4 Transporte de virus en el medio ambiente.....	8
2.5 Ventajas y desventajas de la detección de virus entéricos por RT- PCR.....	9
2.6 Bacteriófagos FRNA como indicadores.....	11
3. Objetivos.....	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos particulares.....	13
4. Material y métodos.....	14
4.1Diseño del estudio.....	14
4.2 Generalidades sobre detección de bacteriófagos FRNA a partir de agua.....	14
4.3 Estandarización del método ISO10705 para la detección y cuantificación de bacteriófagos FRNA en agua.....	15
4.3.1 Preparación de cultivos semilla (Stock) y de trabajo de acuerdo a ISO 10705.....	15
4.3.2 . Propagación de MS2.....	16
4.3.3 Control de calidad: crecimiento, segregación del plásmido y resistencia a antibióticos.....	16
4.3.4 Validación.....	16
4.3.4.1 Cinética de crecimiento de WG49.....	16
4.3.4.2 Segregación del plásmido F´42 lac: :Tn5.....	16

4.3.4.3 Resistencia a acido nalidixico	16
4.3.4.4 Implementación del procedimiento estándar.....	17
4.4. Estandarización del método para la detección de genomas de rotavirus en agua.....	17
4.4.1. Cultivo de células MA 104.....	17
4.4.2. Producción de rotavirus RRV.....	17
4.4.3. Extracción de dsRNA	18
4.4.4. Procedimiento de RT-PCR para Vp7 de rotavirus grupo A.....	19
4.4.4.1. Transcripción reversa.....	20
4.4.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	20
4.4.5.Sensibilidad de la detección de genomas de rotavirus por RT-PCR..	21
4.5. Indicadores microbiológicos y parámetros fisicoquímicos.....	21
4.6 Muestreos de agua de segundo uso y fuente de agua superficial para uso y consumo humano.....	21
4.6.1. Selección de sitios de muestreo.....	22
4.6.2. Concentración de muestras.....	25
4.7. Análisis estadístico.....	25
5 Resultados y discusión.....	27
5.1 Estandarización del método ISO10705 para la detección y cuantificación de bacteriófagos FRNA en agua.....	27
5.2 Estandarización del método para la detección de genomas de rotavirus en agua por RT-PCR.....	28
5.2.1. Método de extracción de dsRNA de rotavirus.....	28
5.2.2. RT-PCR e hibridación.....	29
5.3. Resultados de los muestreos en Xochimilco y Valle de Bravo.....	30
5.4. Bacteriófagos FRNA como indicador de contaminación fecal en agua de segundo uso.....	33
5.5. Indicadores de contaminación fecal en una fuente de agua superficial para uso y consumo humano.....	37

5.5.1. Caracterización de los sitios de muestreo en Valle de Bravo.....	37
5.5.2. Indicadores de contaminación fecal en fuentes de agua para uso y consumo humano.....	38
5.6. Indicadores de contaminación viral.....	39
6. Conclusiones.....	42
7 Bibliografía.....	43

Índice de tablas

Tabla 1. Posición y secuencia de iniciadores descritos por Le Guyader y colaboradores.....	20
Tabla 2. Porcentaje de segregación del plasmido F42'Lac::Tn5.....	28
Tabla 3. Concentración de nutrientes en agua de nutrientes en agua de segundo uso.....	31
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos en agua de segundo uso.....	33
Tabla 5. Indicadores microbiológicos en agua de segundo uso.....	33
Tabla 6. Relación entre el numero de bacteriófagos FRNA e indicadores bacterianos.....	35
Tabla 7. Concentración de nutrientes en una fuente superficial de agua para uso humano.....	37
Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos en una fuente de agua superficial para consumo humano.....	37

Índice de figuras

Figura 1. Estandarización del método de detección molecular de rotavirus.....	19
Figura 2. Localización geográfica de los puntos de muestreo en Xochimilco.....	23
Figura 3. Localización geográfica de los puntos de muestreo en la presa Miguel Alemán, Valle de Bravo.....	24
Figura 4. Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> WG49.....	27
Figura 5. Segmentos del genoma de rotavirus, cepa RRV.....	29
Figura 6. PCR e hibridación del fragmento de 392 pb	30

Abreviaturas

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementario

Célula BGM Buffalo green monkey

dNTP Desoxinucleótido trifosfato

DO Densidad óptica

dsRNA Ácido ribonucleico de cadena doble

DTT Dithiothreitol

dTTP 2'-deoxitimidina-5'-trifosfato

EDTA Ácido etileno-diamina-tetraacético

FRNA Bacteriófago F- específico

MEM Medio de cultivo mínimo esencial

MS2 Bacteriófago F- específico prototipo

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

Pm Peso molecular

Primer oligonucleótido, cebador

RNAsa Ribonucleasa

Rt Transcripción reversa

SDS Sodio dodecil sulfato

Tm Temperatura de fusión

TYGB Caldo glucosado de triptosa- levadura

UFC Unidad formadora de colonia

UFP Unidad formadora de placa

Resumen

Introducción

El potencial del agua en la transmisión de patógenos está bien documentado. Aún a pesar de las mejoras sanitarias, la aparición de casos esporádicos y brotes de virus entéricos transmitidos por medio de agua libre de coliformes en 100mL, ha llamado la atención sobre las limitaciones de los indicadores bacterianos para advertir la exposición a altos títulos de virus patógenos en agua de segundo uso y el riesgo que podrían significar en fuentes de agua superficial para consumo humano.

Objetivo

El estudio fue diseñado para determinar la importancia y limitaciones del bacteriófago FRNA como indicador de contaminación viral en función del título y frecuencia de aislamiento, en comparación con la detección de genomas de rotavirus por RT-PCR en agua superficial de diferente calidad bacteriológica.

Material y métodos

Los métodos de detección y cuantificación de bacteriófagos FRNA por agar en doble capa (ISO10705) y la detección de rotavirus por RT-PCR fueron estandarizados y aplicados en muestras de agua procedentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria, Canales de Xochimilco y de la Presa Miguel Alemán, Valle de Bravo, como prototipos de un amplio espectro de calidad. Los resultados fueron analizados para investigar diferencias en el comportamiento de los indicadores en cada tipo de agua y posibles asociaciones entre estos y los parámetros fisicoquímicos.

Resultados y discusión

Comparativamente, los bacteriófagos FRNA mostraron la segunda mayor resistencia a tratamiento secundario de agua residual. Los bacteriófagos FRNA fueron el único indicador capaz de discriminar de forma certera las fuentes de contaminación fecal en agua de segundo uso, mostrando que los indicadores

bacterianos y los bacteriófagos siguen diferentes vías de inactivación, y que estos últimos podrían representar mejor el comportamiento de virus entéricos en el ambiente acuático.

Conclusiones

Se recomienda el uso de bacteriófagos FRNA como el indicador más certero en agua de segundo uso y se sugiere un estudio más completo de detección de genomas de rotavirus y asociación epidemiológica.

Abstract

Introduction

Water pathogen spread potential is well established. Even with sanitary improvements, sporadic cases and enteric virus waterborne outbreaks via water that lacks fecal coliform in 100 mL has pointed out bacterial index disabilities to warn about high virus titer exposure in reclaimed water and risk assessment of fresh natural water sources for human use.

Objective

- Experimental design was aimed to characterize, the importance of FRNA bacteriophage titer and isolation rate compared to rotavirus RT-PCR genome detection in natural water of varied bacteriological index quality
- Material and methods

FRNA bacteriophage detection and quantification by double agar layer method (ISO10705) and rotavirus genome RT-PCR detection method were standardized and tested on Ciudad Universitaria wastewater treatment plant, Xochimilco Canals and Miguel Aleman dam samples at Valle de Bravo.

Results were analyzed comparing bacterial and viral indexes among them and with water's physicochemical parameters

Results and discussion

Comparatively, FRNA bacteriophages showed the second lower reduction rate after biological wastewater treatment and was the only one able to accurately discriminate fecal contamination sources in reclaimed water, suggesting different inactivation ways are followed by bacterial and bacteriophages indexes. FRNA bacteriophages showed to be the best suited index for enteric viruses in the environment

Conclusions

FRNA bacteriophages was the most accurate index of enteric viruses and hence it's use recommended for reclaimed water. An in deep research of rotavirus genome detection in water and epidemiological associations is suggested.

1. Introducción

A la par del crecimiento poblacional, hemos sido testigos de una cada vez mayor presión sobre las fuentes de agua para diferentes usos y del deterioro en grado variable de acuíferos y cuerpos de agua superficial. En tanto que el tratamiento de agua para reúso en riego agrícola, en la conservación de sistemas acuáticos, y uso recreativo, como operaciones bien planeadas están entre las vías de reutilización que mayores beneficios reportan, no en todos los casos es claro si el tratamiento río arriba, cuando ocurre, protege efectivamente de la exposición a patógenos emergentes.

Si bien, en principio, el tratamiento ineficiente o la purificación debida sólo a procesos naturales y dilución han mostrado no ser suficientes, para limitar la transmisión de patógenos a un nivel mínimo aceptable, el mayor riesgo a la salud pública radica en la dificultad de predecir de forma certera la seguridad del agua para un uso específico.

A pesar de que desde hace más de un siglo microorganismos asociados a contaminación fecal son empleados para cuantificar la eficiencia de procesos de tratamiento, o como prueba de contaminación fecal, sólo recientemente sus limitaciones se han hecho aparentes y relativamente poco se ha investigado la relación entre indicadores de diferente naturaleza o sus componentes y la calidad del agua.

A partir de brotes, y casos esporádicos ocasionados por la transmisión a través de agua, lo mismo se ha reportado la introducción de nuevas cepas rotavirus a una población (Van Zyl W *et al.*, 2006), que el mantenimiento de la endemicidad por *Giardia lamblia* (Ashbolt, 2004) en otras; mientras un número cada vez mayor de investigaciones muestran que pequeñas densidades de patógenos en el agua pueden ser las responsables. En México sólo 28.2% del agua residual es tratada, aumentando la probabilidad de que patógenos en concentraciones significativas accedan a su hospedero (de Anda, 2008).

Debido a que la exposición es prácticamente directa, y por su efecto a la salud pública, la mayor preocupación se centra en el agua para riego de hortalizas y en la contaminación microbiológica de fuentes de abastecimiento de agua para uso y consumo humano.

El riego con agua residual y residual tratada es una realidad común en países en desarrollo. De acuerdo con Hussain *et al.* (2001) 20 millones de hectáreas en cincuenta países son irrigadas con agua residual, y los productos cosechados son consumidos por lo menos por el 10 % de la población mundial (Smith y Nasr, 1992). Desde luego, este consumo de vegetales irrigados con agua residual conlleva un riesgo significativo de infección por *Ascaris lumbricoides* y a un incremento en la diarrea no específica cuando la calidad del agua excede 10^4 coliformes fecales por 100 mL (Carr *et al.*, 2004).

A fin de restringir el paso de patógenos del ambiente al humano, disposiciones diversas marcan los límites permisibles en agua para diferentes tipos de cultivos. En tanto en un extremo, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) sólo considera el agua residual tratada como adecuada para riego cuando contiene menos de 2.2 coliformes fecales por 100 mL, la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de un máximo de 1000 coliformes fecales por 100 mL para riego irrestricto. Cabe destacar que el límite propuesto, fue concebido considerando una densidad viral de una partícula por cada 10 litros, densidad frecuentemente superada en el agua residual tratada (Tanaka *et al.*, 1998).

Aun cuando la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) considera un nivel de 4 logaritmos de inactivación viral como satisfactorio, títulos muy superiores han sido reportados, junto con un comportamiento bifásico en la inactivación viral, la detección sub-poblaciones resistentes y un mayor riesgo de infección del que se consideraría aceptable (Pettersen *et al.*, 2001 a 2001 b, Caballero *et al.*, 1994, Hamilton *et al.*, 2006).

La transmisión de patógenos no se restringe al consumo de vegetales irrigados con agua de mala calidad, de acuerdo con Crockett (2007) es posible para virus entéricos y parásitos, viajar en altas concentraciones transportados

por agua distancias de hasta 160 kilómetros amenazando la seguridad de las fuentes de abastecimiento de agua para uso humano.

Resultado del tratamiento de aguas residuales, monitoreo y potabilización, en los últimos cien años se ha observado un cambio en la etiología de los brotes de enfermedades transmitidas por agua. En países desarrollados, en tanto se ha reducido considerablemente el número de brotes de origen bacteriano como el cólera y la salmonelosis, se observa un aumento en la frecuencia de brotes ocasionados por virus y parásitos como el virus de la hepatitis A, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, y otros caracterizados por dosis infectivas bajas, buena sobrevivencia en agua, y resistencia a las prácticas de tratamiento a las que no sobreviven los coliformes (Hunter 2002).

Históricamente, debido a la dificultad técnica para detectar una amplia gama de microorganismos patógenos, incluyendo, sólo entre los más comunes norovirus, virus de la hepatitis A, bacterias y parásitos, que de hecho, en bajas concentraciones usan el agua como vehículo, originó el desarrollo de métodos para detección de contaminación fecal en la forma de indicadores- microorganismos no patógenos presentes en el agua residual en mayores números que los patógenos y con características de sobrevivencia similares (Yates,2007).

A pesar de que actualmente con nuevos medios y técnicas de cultivo es posible aislar algunos patógenos, y/o detectar e identificar sus componentes en el agua, el nivel de protección a la salud pública obtenido es menor al que se consigue con los organismos indicadores.

Siendo el concepto de indicador simple en esencia, las características biológicas y capacidades analíticas en gran medida determinan el uso potencial de un microorganismo como indicador en un contexto particular. Así, el grupo de los coliformes (conformado por enterobacterias capaces de degradar lactosa con producción de gas) y los coliformes termotolerantes, un sub-grupo relativamente más específico de contaminación fecal, son los indicadores de uso más corriente en la medición de la calidad del agua (Leclerc, 2001), y los

únicos reglamentados en México. Sin embargo, por su menor sobrevivencia no reflejan los últimos rastros de contaminación fecal, ni el riesgo de transmisión de virus. Existe además un problema de especificidad, su número puede no indicar el grado de contaminación sino ser una manifestación de la presencia de fuentes no fecales de coliformes o de su multiplicación en el ambiente. Estas limitaciones explican porque aún el cumplir con normas de cero coliformes por 100 mL no es una indicación del potencial para un brote o porque los coliformes han sido detectados en tan sólo el 69% de los brotes registrados en los Estados Unidos de América en la última década (Hunter 2002).

Aún cuando es improbable que un sólo indicador de contaminación fecal pueda representar en diferentes ambientes acuáticos el comportamiento ecológico de una amplia gama de microorganismos patógenos, el estudio de indicadores alternativos más sensibles y específicos, resistentes al tratamiento, con sobrevivencia y transporte similar a los patógenos virales en el medio ambiente, idealmente redundará en una mejor caracterización de la calidad del agua.

2. Antecedentes

2.1. Epidemiología

En México, las enfermedades infecciosas gastrointestinales continúan siendo una de las principales causas de morbi – mortalidad. Hasta el año 2000, ocuparon el segundo lugar como causa de morbilidad infantil y preescolar, además fueron la cuarta causa de mortalidad infantil Sepúlveda, (2002). Tomando en cuenta el sub- registro existente debido a casos leves de enfermedad intestinal, los 278,997 casos de diarrea aguda en niños menores a cinco años atendidos del 2001 al 2003 representan sólo la punta del iceberg de un problema aun mayor.

Rotavirus es el agente etiológico único más importante de la diarrea severa en infantes. Debido a que la incidencia de infección observada es similar en países con estándares de salud altos o bajos, se supone no es afectado por las medidas sanitarias que reducen las diarreas de origen bacteriano. De acuerdo con Parashar (2003, 2006) la proporción en el número de hospitalizaciones debidas a rotavirus casi se duplicó en seis años, ocasionando alrededor de 454,000 - 705,000 muertes anuales en menores de cinco años alrededor del mundo, 85% de ellas en los países más pobres. Otros estudios muestran tasas de enfermedad causada por rotavirus en promedio del 45% en Asia (Bresee *et al.*, 2004, Orenstein *et al.*, 2007), 24% en África y 31% en América Latina, sin embargo, tasas de detección superiores al 50% han sido reportadas en ciertas regiones (Kane *et al.*, 2004).

Aún cuando ocurren casos a lo largo de todo el año, un pico de incidencia es común en los meses de invierno. En México, al menos el 65% de todos los casos ocurren antes de un año de edad y alrededor de la totalidad antes de los 3 años, siendo el grupo más afectado el que comprende entre 6 y 11 meses, sin embargo, el patrón puede ser distinto presentándose el grueso a edades significativamente superiores como en Paraguay, Argentina y Brasil (Kane *et al.*, 2004).

2.2. Características físicas e inmunológicas

Rotavirus, junto con reovirus y orbivirus pertenece a la familia *Reoviridae*. Son virus icosaédricos, de 70 nm de diámetro, con un genoma de RNA de doble cadena segmentada que, infectan tanto a animales como al humano.

Su apariencia morfológica es distintiva, recuerda a una rueda con espículas cortas. La cápside proteica de la partícula infectiva está formada por tres capas, los constituyentes principales de la capa externa son vp4 y vp7 que determinan los 19 serotipos P y G respectivamente. El componente único de la intermedia contiene los determinantes antigénicos empleados en la clasificación serológica de los seis grupos (A-F). Rotavirus en humanos y animales puede tener el mismo serotipo, en tanto que los grupos A,B y C se presentan en humanos y animales, los grupos D,E,F son exclusivos de animales (Hoshino *et al.*, 2000)

La presencia de iones de calcio es indispensable para mantener la infectividad, los tratamientos quelantes de calcio (EDTA y EGTA), remueven la cápside externa y resultan en la pérdida de infectividad. Por otro lado, el rotavirus es relativamente estable a la inactivación dentro del intervalo de pH de 3 a 9, son capaces de soportar temperaturas de incluso a 45 – 50°C. Muestras de virus de ganado y humanos han retenido la infectividad por meses a 4°C o incluso a 20°C cuando son estabilizados con 1.5 mM CaCl₂ (Kapikian *et al.*, 2001).

La existencia de múltiples serotipos implica que el contacto previo con el virus sólo brinda protección parcial contra nuevas infecciones, pudiendo llegar a ser necesarias hasta seis infecciones para obtener protección contra la diarrea (Velázquez *et al.*, 1996).

2.3. Transmisión medio ambiental de rotavirus.

Como la mayoría de los virus que tienen como órgano blanco el intestino, rotavirus está especialmente bien adaptado para soportar el tránsito a través del medio ambiente. Factores físicos de la matriz: como luz, temperatura, factores químicos; incluyendo pH, y fuerza iónica, por no mencionar, la presencia de otros microorganismos o sus enzimas, interactúan, de forma compleja con las partículas virales y determinan la tasa de inactivación, permaneciendo en agua superficial por periodos prolongados (Pancorbo *et al.*, 1987, Nasser *et al.*, 1999 y Gordon *et al.*, 2003).

Excretados en concentraciones del orden de 10^{10} partículas virales por gramo de heces, se ha reportado su aislamiento en diferentes tipos de agua en países con niveles de ingreso económico y servicios de salud disimiles. En el Reino Unido (Genthe *et al.*, 1991) y Sudáfrica (Oragui *et al.*, 1989), alrededor de la mitad de las muestras de agua residual tratada, y hasta en el cien por ciento de las muestras de agua residual cruda, y agua residual tratada, en Brasil o Estados Unidos (Oragui *et al.*, 1989, Hejkal *et al.*, 1984), resultaron positivas para rotavirus. Las diferencias en los títulos reportados en agua residual cruda alcanzan las cuatro unidades logarítmicas. Sin descartar, que se deba a diferencias metodológicas, los valores promedio de diez estudios analizados por Gerba *et al.*, (1996) están en el intervalo de 9.8 a 30,700 por litro en agua residual. Son detectables en el 100% de las muestras antes de tratamiento y entre el 50 y 100% en agua tratada.

Experimentos de sobrevivencia en microcosmos demuestran que rotavirus se mantiene infectivo por más tiempo que enterovirus tanto en agua potable, como en efluente secundario, y una vez que las partículas se han agregado puede permanecer activo por hasta 64 días en agua entubada (Pancorbo *et al.*, 1987), probablemente debido a su genoma de RNA de doble cadena que lo hace más resistente a la luz UV. En trabajos previos, Toranzos (1988) y Deetz (1984) aislaron rotavirus en el 48% y 40% de las muestras de agua superficial y agua potabilizada respectivamente, en concentraciones promedio de entre 1.99 y 4.85 unidades formadoras de placa por litro (UPF/L). Cabe destacar que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

(USEPA) recomienda un riesgo de transmisión de 1×10^{-4} personas /año, o lo que es lo mismo 2×10^{-3} virus por litro en aguas superficiales antes de potabilización, debido a su alta infectividad, las concentraciones encontradas implican un riesgo de transmisión por agua significativo.

2.4. Transporte de virus en el medio ambiente

Recientemente se han acumulado nuevas evidencias del potencial del agua como vehículo de transmisión de virus entéricos, incluyendo a rotavirus consecuencia de un número creciente de investigaciones en torno al destino y transporte de virus a nivel de cuenca, hoy día, se reconoce una asociación estadísticamente significativa entre la lluvia y enfermedad en los E.U. (Van Zyl *et al.*, 2006, Ueki *et al.*, 2005, Curriero *et al.*, 2001).

Curriero *et al.*, (2001), al respecto destaca en su análisis de los brotes ocurridos entre 1948 y 1994, que 51% fueron precedidos por eventos de precipitación por arriba del percentil 90 ($P=0.002$), y 68% por eventos por arriba del percentil 80 ($p=0.001$).

A pesar de brechas en el conocimiento, es posible recomponer un diagrama con los principales eventos que determinan la movilidad de los microorganismos en el medio ambiente y sus consecuencias.

Es sabido que muestras de agua provenientes de áreas con diferente uso de suelo presentan un diferente perfil de calidad, variable en función de la precipitación en la temporada (Vikaskumar *et al.*, 2007). Los cuerpos de agua superficial con el mayor riesgo de contaminación son los que pertenecen a cuencas donde se descarga agua residual y/o tienen escorrentía proveniente de áreas agropecuarias (Ferguson, 2003).

No siendo exclusivo de los eventos de tormenta, la temporada de lluvias registra la mayor concentración de coliformes (Vikaskumar *et al.*, 2007), y otros indicadores en agua (Ferguson *et al.*, 2007).

Es durante los eventos de tormenta, cuando la lluvia puede exceder la capacidad de los sistemas de drenaje o plantas de tratamiento que descargan en los cuerpos de agua superficiales. Una interpretación completa incluye la

existencia de reservorios de virus en el suelo y sedimentos; accionado por cambios en el patrón de lluvias y en la química del ambiente acuático, puede ocurrir la elusión de virus adsorbidos al suelo, y la resuspensión de sedimentos con concentraciones 10 a 10000 veces superiores al agua sobre ellos (Gerba *et al.*, 1977), resultan en concentraciones pico de virus y en un incremento de la capacidad de viajar grandes distancias y encontrar un hospedero susceptible. (Ferguson *et al.*, 2003).

De acuerdo con Metcalf (1984) entre el 14 y el 50% de las muestras de agua sin sólidos suspendidos son positivas para enterovirus y rotavirus respectivamente en comparación de 72 y 78% en las muestras con sólidos suspendidos.

Los virus entéricos y bacteriófagos se adsorben a partículas de diámetro muy pequeño, o a otras partículas virales formando agregados, más resistentes a la inactivación que las partículas virales individuales. La adsorción les provee de protección a presiones ambientales como radiación solar, luz UV, pH extremos y desecación (Ferguson *et al.*, 2003).

De este modo, no es inusual detectar entre un 52 y un 72% de muestras positivas para enterovirus, y hepatitis A gracias a la amplificación de ácidos nucleicos por PCR, - PCR anidado en la escorrentía urbana (Jiang, 2004).

2.5. Ventajas y desventajas de la detección de virus entéricos por RT-PCR

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), diseñado para amplificar exponencialmente una secuencia seleccionada, tiene gran aplicación en microbiología ambiental. La consulta de bibliotecas genómicas resulta en el diseño de iniciadores (primers) para un grupo o virus en particular.

La detección específica de la secuencia y la sensibilidad dependiendo de las condiciones puede aproximarse a un genoma. Especialmente útil en la detección del virus de la hepatitis A y del virus de Norwalk que crecen poco en cultivo celular o no crecen en lo absoluto, los resultados, a partir de la extracción de los ácidos nucleicos, amplificación, separación electroforética y tinción del cDNA amplificado se obtienen en un tiempo menor a cuatro horas.

El método de RT-PCR ha sido empleado en la detección y tipificación de rotavirus en agua residual (Dubois *et al.*, 1997), agua subterránea (Borchardt *et al.*, 2003), agua superficial (Kittigul *et al.*, 2005, Van Zyl *et al.*, 2006), agua potable (Gratacap-Cavallier *et al.*, 2000) y alimentos (Leguyader., 1994, Van Zyl *et al.*, 2006, Kittigul *et al.*, 2008).

A pesar de sus ventajas, a la fecha algunos aspectos intrínsecos de la prueba dificultan la interpretación de los resultados y su uso para medición rutinaria de calidad microbiológica del agua. (Metcalf *et al.*, 1995). A pesar de su alta sensibilidad, se presentan limitaciones, debido a que las partículas virales se encuentran en baja concentración, dispersas en el agua, y dado que sólo unos cuantos mililitros pueden ser examinados es necesario recurrir a métodos de concentración de eficiencia variable. Esto aunado a que el método sólo brinda información cualitativa hace complicado calcular la concentración real de virus en la muestra aun bajo esquemas del número más probable.

Es importante considerar que los resultados obtenidos por este método no se asocian al riesgo de transmisión de virus. Se reconoce la posibilidad real de falsos negativos debido a inactivación enzimática, por compuestos comunes en el agua (ácidos fúlvico y húmicos), por otra parte existe una tendencia a generar falsos positivos, sobreestimando la presencia de virus. Choi (2005) demuestra que en agua superficial aún con una alta prevalencia de genomas de adenovirus humanos, las partículas infecciosas pueden no ser detectables. En el mismo sentido Grabow (2001) asegura que aún con los mejores sistemas de potabilización actuales no es posible llegar a un nivel de cero virus detectables cuando se mide la calidad virológica del agua por PCR.

2.6. Bacteriófagos FRNA como indicadores

Cierto número de indicadores alternativos, diferentes a la detección de virus líticos en cultivos de células BMG han sido propuestos para señalar eventos de contaminación antigua, y probable presencia de virus entéricos. La lista incluye; colífagos somáticos, bacteriófagos F específicos o (FRNA) y fagos de *Bacterioides fragilis*, entre otros. Se argumenta que los bacteriófagos, poseen una composición, estructura y morfología más parecida a los virus entéricos que las bacterias empleadas como indicadores (Skraber *et al.*, 2004). Debido a sus similitudes, se han desempeñado como modelo de virus entéricos para probar la eficiencia de tratamientos para agua residual (Arraj *et al.*, 2005; Tree *et al.*, 2003), desinfección y potabilización (Allwood *et al.*, 2005), resistencia a valores extremos de pH y temperatura (Feng *et al.*, 2003) así como a luz UV (Simonet *et al.*, 2006), y transporte a través de medios porosos (David, 2003, Van der Wielen *et al.*, 2008) y redes de distribución de agua (Helmi *et al.*, 2008).

En vista de que los bacteriófagos antes mencionados se replican en bacterias capaces de sobrevivir en una variedad de nichos, la especificidad del hospedero, y las condiciones en que ocurre la replicación adquiere relevancia.

Entre los bacteriófagos con mejores posibilidades para ser usados como indicadores, los bacteriófagos con genoma de RNA, de los géneros Levivirus y Alevivirus, pertenecientes a la familia *Leviviridae* son únicos. En tanto que su receptor se encuentra en el pilli F de *Escherichia coli* y la expresión del receptor está condicionada a que el microorganismo se encuentre a una temperatura superior a los treinta grados centígrados (Woody *et al.*, 1995) poco frecuente en agua superficial. Si a esta restricción le sumamos una replicación ineficiente por debajo de una concentración de 10^4 bacterias hospederas /mL (Wiggins *et al.*, 1985), los nichos que proveen las condiciones para la replicación de bacteriófagos FRNA se reducen al intestino de animales de sangre caliente y al agua residual cuando contiene bacterias portadoras del pilli F que han crecido previamente a 37°C (Havelaar., 1987).

Independientemente de constituir un grupo relativamente uniforme, las diferencias antigénicas en las proteínas de la cápside son la base para la clasificación en cuatro serogrupos, identificables también por hibridación con sondas específicas (Hsu *et al.*, 1995). Resulta interesante que los grupos predominantes en humanos y animales difieren. En tanto los grupos II y III predominan en humano, los grupos I y IV predominan en animales.

En países en vías de desarrollo, en donde es crítico hacer el mejor uso posible de los recursos, indicadores más sensibles y específicos, fáciles de enumerar e identificar reportarán el mejor balance costo-beneficio.

Con métodos adecuados para el monitoreo, la detección bacteriófagos FRNA fue sugerida por la Agencia de Protección Ambiental como indicador de contaminación fecal en agua subterránea (Jiang *et al.*, 2007) y se ha especulado que podría usarse como indicador de contaminación viral por su resistencia a procesos de tratamiento y purificación de agua y al haberse encontrado correlación con la presencia de virus en cierto número de ambientes (Havelaar *et al.*, 1993). Sin que se haya podido demostrar que los bacteriófagos FRNA se encuentran siempre que hay virus entéricos en el agua, Armon y colaboradores (1997) señalan que los bacteriófagos FRNA pueden ser aislados en un porcentaje significativo de muestras de agua potable, en las que no es posible aislar coliformes.

3. Objetivo

3.1. Objetivo general

- Determinar la importancia y limitaciones de F RNA como indicador de contaminación viral

3.2. Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia de aislamiento y densidad de bacteriófagos F RNA en agua de diferente calidad.
- Comparar la frecuencia de detección F RNA y genomas de rotavirus en agua de diferente calidad.

4. Material y métodos

4.1. Diseño del estudio

A fin de definir el potencial de tres diferentes indicadores de contaminación fecal en agua - dos virales y uno bacteriano - se estandarizaron en condiciones controladas tanto el método de detección de rotavirus por RT-PCR (Le Guyader *et al.*, 1994) como la detección y cuantificación de bacteriófagos FRNA por el método ISO 10705 de agar en doble capa (Anónimo, 1995). El desempeño de los métodos fue probado mediante comparaciones entre la frecuencia y título expresado como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por cien mililitros o partículas formadoras de placa por cien mililitros, y la presencia de genomas de rotavirus en muestras de agua de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria y de cuerpos de agua en la mesa central de la República Mexicana con diferente grado de vulnerabilidad e influencia humana.

4.2. Generalidades sobre detección de bacteriófagos FRNA a partir de agua

Una amplia gama de herramientas metodológicas han sido desarrolladas en el estudio ecológico de virus bacterianos en ambientes acuáticos; aun tratándose de la detección y cuantificación de grupos específicos de bacteriófagos, variaciones en el método de concentración y análisis, en la forma de diferentes matrices adsorbentes, volúmenes o bacterias hospederas introducen sesgos y dificultan la comparación.

A lo largo de la última década, dos metodologías han sido estandarizadas para la detección y cuantificación de bacteriófagos FRNA, mismas que evolucionaron independientemente. Por un lado, el método 1602-de capa única-elaborado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA ,2001), por otro, con agar en doble capa el método 10705 de la International Standard Organization (Anónimo,1995), más flexible que el primero exige validación a través de una serie de eventos cuyo fin es limitar la

variabilidad del ensayo asegurando que la pureza del cultivo de la bacteria hospedero *Salmonella typhimurium* WG49 (*Salmonella* WG 49) y su sensibilidad en la caja de Petri permanezcan en un intervalo constante.

4.3. Estandarización del método ISO10705 para la detección y cuantificación de bacteriófagos FRNA en agua

4.3.1. Preparación de cultivos semilla (Stock) y de trabajo de acuerdo a ISO 10705

Los cultivos semilla de *Salmonella* WG 49 - que posee el inserto genético F'42 lac: :Tn5 - y de *Escherichia coli* K12 fueron preparados como cultivos de 18± 2 horas a partir de liofilizados de las cepas de referencia ATCC 700730 y ATCC 23631. Almacenados a -70°C con glicerol al 20% son el origen de los cultivos de trabajo; éstos fueron obtenidos de la selección de cinco colonias lactosa positivas, inoculadas y cultivadas en TYGB a 37°C durante cinco horas, los cultivos finalmente alicuotados y almacenados fueron sometidos a pruebas de control de calidad y destinados a la replicación de bacteriófagos MS2 (*E.coli*), o como inóculo para la detección y cuantificación de bacteriófagos FRNA en muestras ambientales (WG49).

4.3.2. Propagación de MS2

Para la obtención de los bacteriófagos se tomaron 250 µL de un cultivo de *Escherichia coli* K12 de 18 horas para inocularse en 25 mL de medio TYGB, incubándose a 37°C con agitación por 90 minutos previo a la adición de bacteriófagos MS2 (ATCC 15597-B1) y durante las cinco horas posteriores, antes de purificar los bacteriófagos del cultivo se adicionó cloroformo a baja temperatura. Al cabo de 18 horas, se centrifugó la fase acuosa a 3000g por 20 minutos, las partículas virales en el sobrenadante se extrajeron y almacenaron a 4°C.

4.3.3. Control de calidad: crecimiento, segregación del plásmido y resistencia a antibióticos.

En 1984 Havelaar y Hogeboom reportaron la construcción y evaluación de una *Salmonella* productora de pilli F morfológicamente indistinguible del de *E. coli* WG21, y por tanto sensible a la infección por bacteriófagos FRNA. Determinaron que la diferencia clave respecto a experimentos anteriores fue una baja tasa de segregación del plásmido F'42 lac: :Tn5 y resistencia a ácido nalidíxico.

4.3.4. Validación

4.3.4.1 Cinética de crecimiento de WG49

Matraces conteniendo medio TYGB fueron inoculados con un cultivo secundario de WG49 (cultivo de trabajo) en una relación 1:1000 e incubados en agitación a 37°C. Con un espectrofotómetro Hach DR2400 (U.S. Colorado, 2006) se midió la densidad óptica del cultivo ($\lambda = 520$ nm) en intervalos de 30 minutos, al mismo tiempo se inocularon por triplicado en medio TYGA 0.1 mL de la cuarta a sexta diluciones seriales de 10.

4.3.4.2 Segregación del plásmido F'42 lac: :Tn5

Diluciones seriadas preparadas a partir del cultivo en crecimiento en los tiempos cero y tres horas fueron inoculadas en agar McConkey e incubadas. Al término de 24 horas a 37°C, se contaron las colonias individuales y se calculó el porcentaje de colonias lactosa negativa.

4.3.4.3 Resistencia a Ácido nalidíxico

En placas de agar McConkey se inocularon 100 μ L de la dilución 10^{-2} del cultivo en crecimiento en los tiempos cero y tres horas, posteriormente se depositaron sobre el agar dos discos con ácido nalidíxico ug/mL o kanamicina ug/mL por placa.

4.3.4.4 Implementación del procedimiento estándar.

Estandarizado de acuerdo con ISO10705 (Anónimo, 1995) la detección y cuantificación de bacteriófagos FRNA en muestras ambientales se llevó a cabo por triplicado. Trabajando en paralelo con dos series independientes de las mismas muestras; tubos estériles con 2.5 mL de medio ssTYGA suave a 45°C con RNAasa (40 µg/mL) o sin ella, fueron inoculados con un mililitro de la muestra o dilución relevante, más un mililitro de cultivo de *Salmonella* WG49 en crecimiento exponencial ($\approx 1 \times 10^8$ UFC). Una vez mezclado el contenido del tubo- antes de polimerizar- fue distribuido uniformemente sobre una capa de agar TYGA e incubado por 24 horas a 37°C.

Los resultados se expresan como partículas confirmadas por unidad de volumen y resultan de la relación del número de zonas de lisis, visibles como áreas circulares claras en la superficie del medio con RNAasa y sin RNAasa y el volumen de la muestra (Anónimo, 1995).

4.4. Estandarización del método para la detección de genomas de rotavirus en agua

4.4.1. Cultivo de células MA 104

Células de riñón de mono MA104 de un cultivo confluyente fueron transferidas a un frasco de poliestireno (Costar) F162, sub cultivadas con 30 mL de medio mínimo esencial (MEM) de Gibco BRL (Invitrogen) enriquecido con 10% de suero fetal bovino, fueron incubadas a 37°C y presión de CO₂ al 5% hasta alcanzar el punto de inhibición por contacto.

4.4.2. Producción de rotavirus RRV

La cepa RRV de rotavirus de mono fué propagada en células MA104 confluentes en frascos F162, en medio MEM sin suero fetal bovino con L- glutamina-estreptomicina-penicilina.

Se adicionaron 10 mL de MEM sin suero y el inóculo viral previamente activado con tripsina a una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se adsorbió el virus por 60 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se adicionaron 20 mL de MEM sin suero más tripsina (1 $\mu\text{g/mL}$) y se incubó hasta observar efecto citopático en el 80% del cultivo.

Las células fueron lisadas congelando el frasco a -20°C y raspando las paredes por agitación de la escarcha. Finalmente para liberar el virus de membranas celulares se añadió freón 11 (tricloro-fluorometano) a la mitad del concentrado en una proporción 1:1, se mezcló vigorosamente y centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos. Habiendo recuperado el sobrenadante se ultracentrifugó por 60 minutos a 25,000 rpm en un rotor sw28, el concentrado se resuspendió en 800 μL de agua Milli Q.

4.4.3. Extracción de dsRNA

A 250 μL de la resuspensión del concentrado de virus se adicionaron 200 μL de agua Milli Q y 12 μL de SDS al 20%, mezclando con la pipeta, se agregaron 300 μL de una mezcla de fenol saturado y cloroformo, y agitando en vortex por un minuto, se fracturó la cápside viral. la fracción proteica fué eliminada por centrifugación (12,000rpm, 3 minutos), se colectó y midió la fracción acuosa dividiéndola en dos tubos de 1.5 mL se mezcló la mitad del volumen obtenido más una décima parte de acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, homogeneizado suavemente se dejó precipitar toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 15 minutos, tras eliminar el sobrenadante se agregaron lentamente 750 μL totales de etanol frío al 70%, se centrifugó por un minuto (14,000 rpm) se decantó y evaporó el alcohol excedente. Finalmente se resuspendió en 100 μL de agua Mili Q, cuantificó por espectrofotometría con un espectrofotómetro marca nanodrop (U.S. Denver 2006) ($\lambda=260\text{nm}$, $\lambda=280\text{nm}$) y almacenó a -70°C (Figura 1).

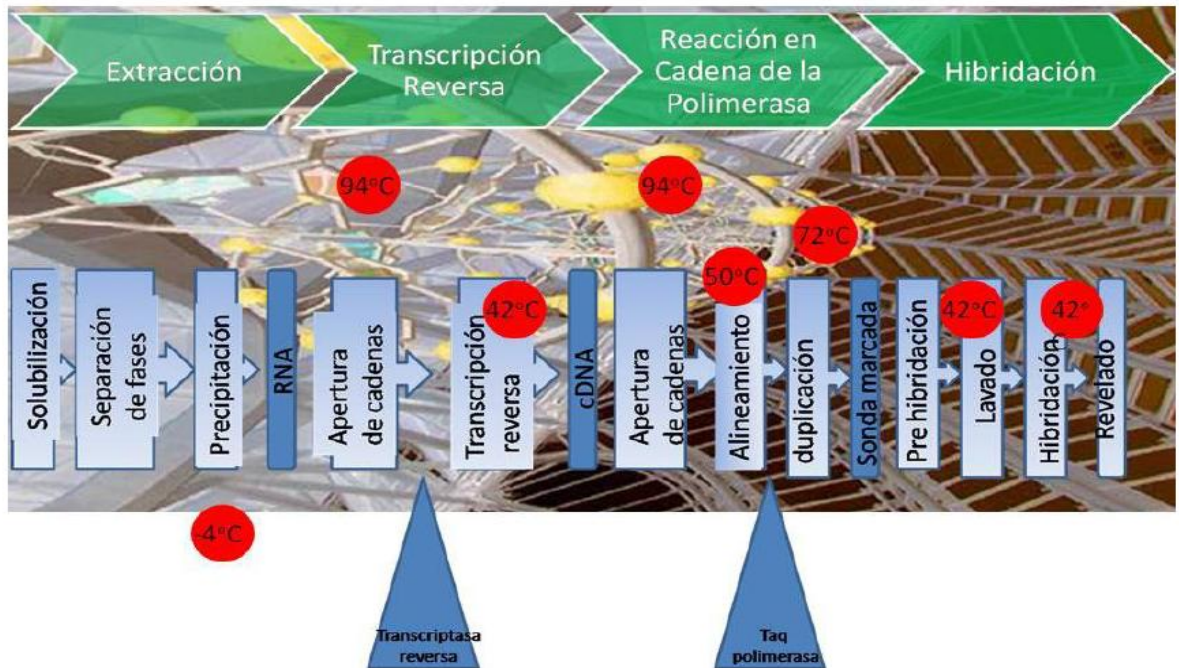


Figura 1 Estandarización del método de detección molecular de rotavirus

4.4.4. Procedimiento de RT-PCR para Vp7 de rotavirus grupo A

Para detectar genomas de rotavirus con alta sensibilidad fue necesario llevar a cabo la transcripción reversa y la amplificación por PCR semi anidado; se seleccionaron oligonucleótidos diseñados por Le Guyader y colaboradores (1994) por flanquear una secuencia altamente específica de rotavirus grupo A en la región 5' no codificante del gen Vp7 de rotavirus.

Se llevó a cabo el análisis de la secuencia de los iniciadores, y los resultados se usaron para calcular la T_m y temperatura óptima de alineamiento

R1 fue usado como iniciador de la reacción de transcripción reversa y junto con R2 en la amplificación de un fragmento de cDNA 392 pb, en tanto que el segmento interno (de la posición 51 a 392) fue amplificado con los iniciadores R2 Y R3 (Tabla 1)

Tabla 1. Secuencia y posición de iniciadores descritos por Le Guyader y colaboradores.

Oligonucleótido	Secuencia	Posición
R1	5'GGCTTTAAAAGAGAGAATFITCCGTCTGG 3'	1 a 28
R2	5'GATCCTGTTGGCCATCC 3'	376 a 392
R3	5'GTATGGTATTGAATATACCAC 3'	51 a 71
Rp	5'TCCAATGATCCTGTTATGG 3'	220 a 239

4.4.4.1. Transcripción reversa

El tubo de reacción con un volumen final de 10 µl contenía 0.5mM de cada uno de los oligo nucleótidos, 2 µL de RNAcid, buffer de síntesis cDNA 1 X, DTT 5Mm, dNTPs 1mM y Super script II. La reacción tuvo lugar en un termociclador Perkin Ellmer 9600 a 94°C por tres minutos, y al descender a 42°C se agregó la mezcla de Super script II, permaneciendo a la misma temperatura por sesenta minutos, posteriormente a 85°C por cinco minutos y a 4°C al concluir la reacción.

4.4.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa;

La mezcla de reacción para la amplificación del cDNA se llevo a cabo en un volumen de reacción de 20 µL conteniendo: buffer High fidelity (10X, 600 nM Tris-SO₄ pH9, 180 mM de (NH₄)₂SO₄), MgSO₄ 2 mM, dNTPs 0.2 mM, cDNA 1mL, 0.2 mM para cada oligonucleótido y 0.2µL de DNA polimerasa Platinum Taq (invitrogen), se pre incubó a 94°C por dos minutos, seguidos de 25 ciclos de 94°C por 15 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, y finalmente se mantuvo a 4°C hasta recuperar el tubo. En un segundo tubo se añadieron 2 µL del producto de PCR y amplificó bajo las mismas condiciones.

Los productos se evidenciaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en tinción con bromuro de etidio junto con un marcadores de peso molecular de 50 y 100 pb y se comprobó su identidad por hibridación de acuerdo a le Guyader y colaboradores (1994).

4.4.5. Sensibilidad de la detección de genomas de rotavirus por RT-PCR

El ensayo de RT-PCR se realizó de la forma anteriormente descrita, usando como blanco diluciones seriadas 1:4 y 1:10 preparadas a partir una concentración conocida de dsRNA de la cepa RRV de rotavirus. Tomando como base la masa del genoma de rotavirus se calculó el límite de detección definido como el número mínimo de genomas necesario para detectar una banda visible en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio tras ser transcrito y amplificado por RT-PCR o RT-PCR anidado.

4.5. Indicadores microbiológicos y parámetros fisicoquímicos

La detección de indicadores microbiológicos fué llevada a cabo por la M. en C. Jazmín Aguilar M empleando el método de filtración a través de membrana. (Clersceri *et al.*, 1998). Volúmenes conocidos de muestra fueron filtrados a través de membranas de acetato de celulosa con un diámetro de poro de 0.45 μ m (Millipore tipo HA) e incubadas con 2.5 mL de medio m- FC a 44.5°C por 24 horas para aislamiento de coliformes fecales o bien en medio KF a 35°C por 48 horas para aislamiento de enterococos.

Las mediciones de pH, temperatura y conductividad, concentración de oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno fueron tomadas *in situ* con un multiparametros (Sension 156 HACH. U.S. Colorado 2005).

Las determinaciones de nutrientes fue llevada a cabo por el M en C Gustavo Pérez Ortiz mediante espectrofotometría utilizando kit HACH (método 10173, método 10129, método10128).

4.6 Muestreos de agua de segundo uso y fuente de agua superficial para uso y consumo humano

La colección de muestras tuvo lugar como parte del proyecto PAPIT. Los datos generados corresponden a la campaña de muestreo en la época de lluvias del ciclo 2007.

4.6.1. Selección de sitios de muestreo;

Si bien la seguridad del agua potable solo puede garantizarse combinando la protección de las fuentes de agua, controlando los procesos de tratamiento y distribución. El comportamiento de virus patógenos e indicadores se ve en parte determinado por las características del agua.

La decisión de seleccionar sitios con agua de diferente calidad se tomó para conocer la interrelación entre indicadores de uso común e indicadores de contaminación viral en diferentes matrices de agua.

Xochimilco

Constituido por aproximadamente 84 kilómetros de canales es el remanente del ex lago de Xochimilco, un sistema hiper eutrófico antiguamente alimentado por manantiales, hoy día su principal afluente es el caudal terciario de las plantas de tratamiento de aguas residuales Cerro de la Estrella y San Luis.

Además de transporte, el agua de los canales es empleada para riego de diversos cultivos incluyendo hortalizas (Figura 2).

Valle de Bravo;

Principal embalse de la cuenca del río Cutzamala, con un escurrimiento de 15.8% la presa recibe un volumen de 407.22Mm³/año de la subcuenca a través del río Amanalco. El agua captada se destinaba principalmente al abastecimiento de agua y suministro de energía eléctrica para el sistema hidroeléctrico Miguel Alemán. Actualmente se utiliza para abastecimiento de agua potable, uso recreativo y deportivo (Figura 3).

Puntos de muestreo en el sistema Xochimilco

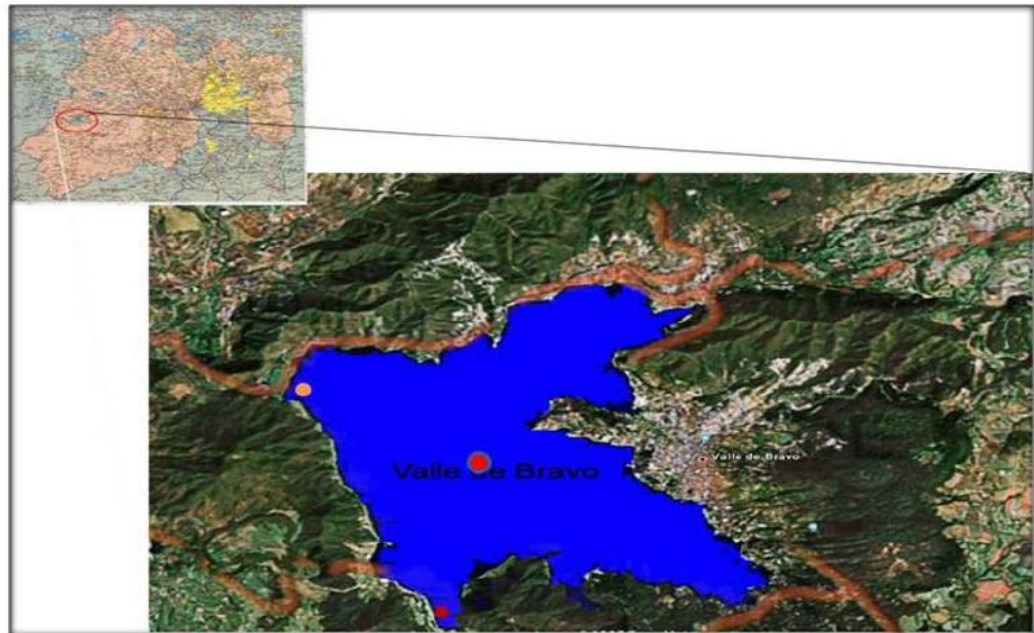


Sitio de muestreo	Localización geográfica (UTM)	
● La draga	492602	2131847
● Apatleco	491187	2129726
● Japón	488997	2130639



Figura 2. Localización geográfica de los puntos de muestreo en Xochimilco, D.F.

Puntos de muestreo en la presa Miguel Alemán, Valle de Bravo



● Cortina	376022	2124125
● Centro	378832	2122836
● Afluente	380365	2125107

Figura 3. Localización geográfica de los puntos de muestreo en la presa Miguel Alemán, Valle de Bravo, Edo. de México, México

Los puntos de monitoreo en ambos cuerpos de agua incluyeron el afluente, efluente y parte media de cada sistema de modo que fuera posible contar con muestras de agua de diferente calidad

Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria. Se tomaron muestras de agua residual cruda en el afluente y de un tanque de sedimentación, después de haber recibido tratamiento biológico.

La colección de muestras se llevó a cabo a las dos semanas de haber puesto en funcionamiento el sistema de tratamiento.

4.6.2. Concentración de muestras

Debido a que en la mayoría de los cuerpos de agua las partículas virales se pueden encontrar dispersos o en bajas concentraciones, en el presente estudio se decidió coleccionar muestras de veinte litros en bidones previamente esterilizados con hipoclorito de sodio (0.52%) y concentrarlas por el método adsorción – elusión usando filtros electropositivos (Virosorb). En primer lugar se hizo pasar el agua a través del filtro a una velocidad menor a los 12 L/min permitiendo la adsorción de las partículas cargadas a la matriz del filtro, en aguas alcalinas con valores de pH superiores a 8.0, previamente se ajustó el pH de la muestra a un valor de entre 6.5 y 7.5 unidades de pH, intervalo en el que está reportada la mayor eficiencia del dispositivo. Para recuperar los virus entéricos y bacteriófagos, se eluyó el filtro en una solución de extracto de carne al 3% (Bioxon) durante 15 minutos. Tras adsorber los virus a los flóculos del eluato a pH ácido (3.5) por media hora, se reconcentró por centrifugación a baja velocidad (2500 g/15 min/4°C) y purificó, disolviendo el precipitado en 30 mL de fosfato de sodio 0.15 mol (pH 9), seguido de una centrifugación a 10,000 g/10min/4°C. Finalmente el concentrado fue almacenado en alícuotas esterilizadas por filtración, conservadas a pH neutro y a -70°C hasta el análisis (USEPA, 2001b, Hurst *et al.*, 2002).

4.7. Análisis estadístico

Estadística descriptiva; se calcularon media geométrica y aritmética como medidas de tendencia central y desviación estándar para dispersión. Se determinó si los valores de las variables medidas: Concentración de oxígeno disuelto, porcentaje de saturación de oxígeno disuelto, pH, temperatura, conductividad, concentración de sólidos totales disueltos, concentración de fósforo total, concentración de nitrógeno total, concentración de carbono orgánico total y logaritmo base 10 del título de cada uno de los indicadores por cien mililitros se distribuyen bajo la curva de forma normal.

Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para definir diferencias significativas entre tipos de agua, y sitios de muestreo para cada variable. Y se modelaron las asociaciones más significativas entre indicadores y parámetros físico-químicos a través de la regresión no paramétrica para un factor.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en plantillas de Microsoft Office Excel (2007) empleando macros xlstat y pop tools.

5. Resultados y discusión

5.1. Estandarización del método ISO10705 para la detección y cuantificación de bacteriófagos FRNA en agua

Como parte del proceso de estandarización del método ISO 10705-1 y control de calidad del hospedero se construyó la curva de crecimiento de WG49 (Figura 4) y se determinó el punto de inflexión que marca el inicio de la meseta a los 120 minutos de cultivo y un título 10%, superior al valor mínimo crítico recomendado por ISO(Anónimo, 1995).



Fig. 4 Se muestra la curva de crecimiento de *Salmonella typhimurium* WG49. Nótese la densidad óptima del cultivo para inóculo se alcanza a una absorbancia de 0.12 OD(\approx 120 minutos de incubación a 37C en medio TYGB).

Con una tasa de segregación de plásmido (F42 lac::Tn5) del 6.36 % (Tabla 1) y habiendo demostrado resistencia a ácido nalidíxico a una concentración de 100 μ g/mL, se limita la variabilidad entre replicas y asegura que los aislamientos obtenidos de muestras de agua no representen una subestimación importante del número real de bacteriófagos FRNA, siempre que

se conserven las condiciones del ensayo de acuerdo con el procedimiento estándar descrito en material y métodos.

Tabla 2 Porcentaje de segregación del plásmido F42⁺Lac::Tn5. Se muestra como porcentaje, la fracción del total de colonias inoculadas en agar Mc Conkey que perdieron el plásmido F42⁺lac::Tn5 al término dos horas de incubación a 37C en caldo TYGB.

UFC/mL	Lac(-)	% de LAC (-)
76	5	6.5
100	7	7
290	17	5.8

5.2. Estandarización del método para la detección de genomas de rotavirus en agua por RT-PCR

5.2.1. Método de extracción de dsRNA de rotavirus

Debido a la fuerte asociación del genoma de dsRNA de rotavirus y las proteínas de la cápside se decidió usar dodecil sulfato de sodio (SDS), un surfactante aniónico altamente eficaz inhibiendo RNAasa, y eliminando proteínas que pudieran inhibir la acción enzimática de la transcriptasa reversa, y no un agente caotrópico, independientemente de la probabilidad de obtener un dsRNA más fragmentado.

La separación final de dsRNA y proteínas se logró por diferencias de hidrofobicidad en fenol- cloroformo obteniendo un dsRNA de alta pureza (tasa 260/280= 1.49) El tratamiento del lisado con Freón y la precipitación del dsRNA extraído en etanol adicionado con acetato de sodio rindieron una concentración final de dsRNA 23.865 µg/mL de dsRNA y 6.425 µg/mL de proteína (Figura 5).

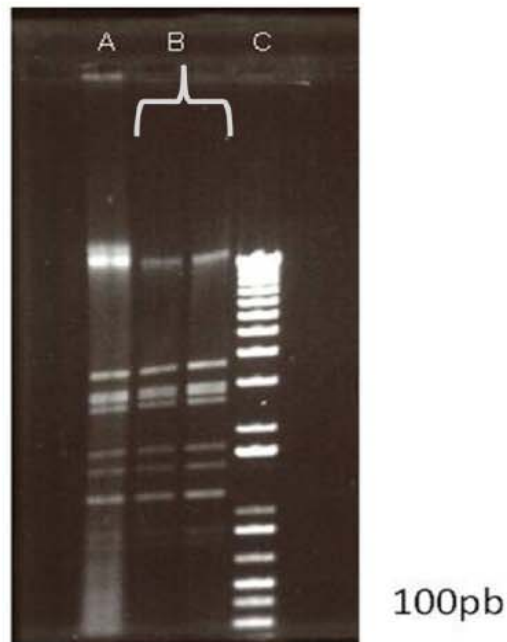


Figura 5 Se muestra el patrón de electroforesis los 11 fragmentos de ds RNA que constituyen e genoma de RRV en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Note. A) Sin freón. B) Tratado con freón. C) Marcador de peso molecular (100pb)

5.2.2. RT-PCR e hibridación.

Teóricamente la naturaleza exponencial del PCR está ligada a la eficiencia con la cual ocurre el reconocimiento de las regiones complementarias antes de la extensión, debido a que dicho reconocimiento no tiene lugar con las cadenas cerradas; se calculó que se requieren 66.9°C para mantener abiertas el 50% de las cadenas del primer R1, 57.1°C para primer R2 y una T_m de 46.3°C para R3. Una vez optimizada la temperatura de alineamiento, y el número de ciclos, se determinó un límite de detección de entre 4.9×10^9 y 4.4×10^6 genomas de rotavirus para la primera reacción de PCR y de 1.6×10^4 genomas con el PCR anidado.

La identidad del segmento se confirmó por hibridación (Figura 6).

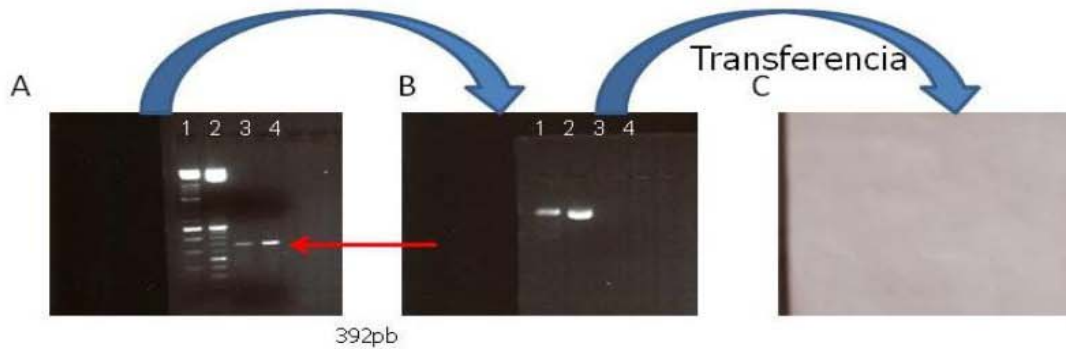


Figura 6. Se muestra en A. La electroforesis del pPCR de RRV en el carriles 1 y 2 Marcador de peso molecular de 100 pb , carriles 3 y 4 pPCR del RRV. B. imagen remanente de la electroforesis previamente detallada después de la transferencia. C. Hibridación del pPCR de 392 pb con la sonda RP marcada con HRP. Se observó una banda correspondiente al 392 pb.

5.3. Resultados de los muestreos en Xochimilco y Valle de Bravo

Como es de esperar a partir de un número reducido de observaciones del funcionamiento de sistemas dinámicos, se encontró que los valores de las variables consideradas no se distribuyen de manera uniforme bajo la curva. Para la mayor parte de las variables, a excepción de la concentración de oxígeno disuelto en el agua y el valor de pH, el análisis de comparación no paramétrica de Kurskal-Wallis mostró diferencias significativas entre Xochimilco y Valle de Bravo, no así, entre el agua colectada en Xochimilco y en la planta de tratamiento de aguas residuales de C.U.

5.3.1. Caracterización de los sitios de muestreo en Xochimilco

Los canales de Xochimilco son un sistema híper eutrófico. La máxima concentración de fósforo se encontró en canal Apatlaco seguido por el canal Japón y la Draga. Como era de esperar, la concentración de nitrógeno total encontrada en la Draga fue entre 3.2 y 4.2 veces mayor que en los otros dos puntos de muestreo del sistema. Así mismo, debiendo ser la concentración de carbono por lo menos un orden de magnitud mayor a la de nitrógeno, se determinó que en ninguno de los puntos de muestreo se conserva esta relación

C:N, lo que sugiere que no se ha alcanzado el punto en que se presenta una mayor resistencia de los compuestos orgánicos frente a la degradación bacteriana. A diferencia del nitrógeno las concentraciones más altas de carbono orgánico total se detectaron en las áreas agrícolas y pecuarias de Xochimilco (Tabla 3).

La concentración de carbono orgánico total resulta importante en tanto que los virus entéricos y bacteriófagos que forman agregados o son adsorbidos a sólidos suspendidos incluyendo a la fracción particulada de la materia orgánica muestran menores tasas de inactivación protegidos de la radiación solar. Debido a que la adsorción es un fenómeno reversible, al cambiar el valor de pH del agua o el medio iónico, la partícula viral es liberada. Esto ocurre más frecuentemente en aguas someras y puede resultar en concentraciones pico de virus e incrementos en la capacidad de viajar grandes distancias (Ferguson *et al.*, 2003).

Por otro lado se ha señalado que en ambientes subtropicales con vegetación natural, y prolongada acumulación de sedimentos, una fuente de carbono orgánico disuelto puede dar lugar al crecimiento de *E. coli*, enterococos y coliformes termotolerantes no relacionados con fuentes de contaminación fecal (Desmarais *et al.*, 2002, Beauchamp *et al.*, 2006).

Tabla 3. Concentración de nutrientes en agua de segundo uso

Tipo de agua/sitio	P total (mg/L)	N total (mg/L)	C orgánico total (mg/L)
Planta de tratamiento de Ciudad Universitaria			
Agua residual cruda	Nd	Nd	nd
Agua residual tratada	Nd	Nd	nd
Canales de Xochimilco			
La Draga	4.8	9.56	10.46
Apatlaco	7.26	2.23	17.2
Japón	5.26	2.9	15.93

Tomando la conductividad eléctrica como un índice de la concentración y actividad de las sales disueltas en el agua se explica su aumento progresivo a partir del punto de muestreo La Draga y hasta la salida del sistema Xochimilco

en el punto inundado más bajo de la subcuenca. La conductividad eléctrica registrada en el canal Japón representó un incremento del 21.68% (Tabla 4) respecto de la conductividad registrada a la entrada del sistema Xochimilco y contrasta con el aumento de 3% en la conductividad eléctrica en la presa de Valle de Bravo.

La diferencia proporcional en el aumento de la conductividad eléctrica entre una y otra cuenca podría deberse a la escorrentía urbana, actividades humanas y a una mayor tasa de meteorización cuando la roca está expuesta.

Independientemente del origen de las sales disueltas en el agua se ha demostrado que mayores concentraciones de sal resultan en mayor adsorción. Una alta concentración se relaciona con una mayor capacidad de adsorción lo que se comprueba al señalar que hasta 77.4% de los virus entéricos en agua de río permanecen libres en comparación con sólo el 14% en agua de mar.

Los valores de pH encontrados en los muestreos se desvían ligeramente de la neutralidad hacia la parte alcalina de la escala. (Tabla 4) La carga de las partículas virales dentro del intervalo de pH encontrado debe ser negativa. Como se mencionó líneas arriba el valor de pH determina la carga neta de la partícula viral en virtud del punto isoeléctrico; virus como rotavirus o Poliovirus 1 con altos puntos isoeléctricos se adsorberán más que virus con un punto isoeléctrico bajo como el de el Virus de la Hepatitis A o los bacteriófagos FRNA.

Por su tamaño y resistencia a condiciones ácidas MS2 suele compararse con enterovirus, en estudios de transporte, sin embargo, de acuerdo con Feng y colaboradores (2003) en soluciones ligeramente ácidas o alcalinas las proteínas de la cápside viral pueden sufrir deformación en puntos críticos, pero en el caso de valores de pH extremos, las superficies virales serían atacadas y ocurriría la disociación de la cápside. Muestra de lo anterior es que a pH 9 y 25°C la tasa de inactivación es 3.3 veces mayor que a pH 5.

La temperatura es frecuentemente el factor ambiental más influyente en la sobrevivencia de virus (Ferguson *et al.*, 2003). Debido a que controla la

velocidad de las reacciones químicas se observa que para un valor de pH dado, la inestabilidad de la cápside viral y las tasas de inactivación tanto de bacteriófagos FRNA como de virus entéricos aumentan con la temperatura. (Feng et al.,2003)

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos en agua de segundo uso

Tipo de agua/sitio	pH	Conductividad (μS/cm)	Temperatura (°C)
Planta de tratamiento de Ciudad Universitaria			
Agua residual cruda	8.2	361	17.1
Agua residual tratada	7.55	866	17.1
Canales de Xochimilco			
La Draga	7.55	596	22
Apatlaco	8.15	699	21.8
Japón	8.45	761	21.5

5.4. Bacteriófagos FRNA como indicador de contaminación fecal en agua de segundo uso

Debido a diferencias climáticas y socio económicas con otros países en los que se ha investigado el potencial de los bacteriófagos FRNA como indicadores, resultaba importante determinar el intervalo de concentración o título en que podían ser detectados en el tipo de agua al cual están mejor asociados (Tabla 5)

Tabla 5. Indicadores microbiológicos en agua de segundo uso

Tipo de agua/sitio	Presencia de rotavirus	Bacteriófagos FRNA (Log pfp/100mL)	Coliformes fecales (Log UFC/100mL)	Enterococos fecales (Log UFC/100mL)
Planta de tratamiento de Ciudad Universitaria				
Agua residual cruda	✓	4.3	7.48	7.4
Agua residual tratada		3.84	6.91	6.68
Canales de Xochimilco				
Draga	✓	6.53	4.24	3.73
Apatlaco (riego)	✓	4	3.87	4.11
Japón	✓	5.34	3.5	3.2

Como se verá la densidad media de bacteriófagos FRNA encontrada en agua de segundo uso ($4.8 \text{Log}_{10}/100 \text{ mL}$) se ubica dentro del intervalo reportado para aguas con contaminación fecal intermedia.

En tanto que Lucena (2003) reporta en haber encontrado en agua residual en países de Europa y América del Sur un promedio de $5.6 \text{ log}_{10} \text{ pfp}$ por 100 mL, en el presente trabajo el mayor título ($6.53 \text{ log}_{10} \text{ pfp}/ 100\text{mL}$) se encontró en el punto de muestreo La Draga) próximo al efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales ; Cerro de la Estrella.

A partir de este punto de muestreo, siguiendo la dirección general del flujo de SW a NE, se observó una disminución del 99.7% en el número de bacteriófagos en el área de riego (Canal Apatlaco; $4 \text{ log}_{10} \text{ pfp} /100\text{mL}$) y un título intermedio ($5.34 \text{ log}_{10} \text{ pfp} /100\text{mL}$) en el canal Japón que conecta una zona de cría y pastoreo de ganado y la salida del sistema de canales de Xochimilco.

Consistente con un menor caudal de agua residual municipal. En el agua residual cruda en la Planta de Tratamiento de Ciudad Universitaria se determinó un título de $4.3 \text{ log}_{10} \text{ pfp}/100\text{mL}$ y un título 10.7% menor en el agua residual una vez tratada.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos por Araujo en España (1997), donde a partir de 257 muestras de agua con diferentes niveles de contaminación debiera concluirse que los puntos de muestreo Japón y La Draga representan sitios de contaminación reciente, en tanto que el canal de Apatlaco el agua residual cruda y tratada en la planta de Ciudad universitaria son sitios con contaminación intermedia.

En todos los casos, el título de coliformes fecales sobrepasó el límite permisible establecido en la NOM- 001-ECOL-1997 para riego no restringido y la recomendación de 1,000 coliformes fecales por 100mL de la Organización Mundial de la Salud. (WHO, 1989 ; Carr *et al.*, 2004)

El hecho de que la densidad de bacteriófagos FRNA en el punto de muestreo La Draga sea $0.65 \log_{10}$ pfp/100mL superior al máximo encontrado por Araujo levanta un velo de duda sobre la efectividad de la eliminación de virus entéricos y bacteriófagos con el actual tratamiento para agua residual.

Se calculó el porcentaje de inactivación para los microorganismos indicadores después de tratamiento secundario al arranque de la planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria-

La misma tendencia se observó en los tres indicadores con diferencias en el grado de inactivación; con un porcentaje de 9.8% los enterococos fecales fueron los microorganismos indicadores más resistentes, seguidos de los bacteriófagos FRNA (inactivación=10.7%) y coliformes fecales (inactivación =18.45%).

Aun siendo sistemas no relacionados, llama la atención que la abundancia relativa de bacteriófagos FRNA respecto de los indicadores bacterianos, en los puntos de muestreo del sistema Xochimilco presenten tasas (bacteriófagos: indicador bacteriano) sensiblemente distintas a las registradas en la planta de tratamiento de C.U. (Tabla 6).

Tabla 6 Se muestran las tasas de abundancia relativa de bacteriófagos FRNA respecto de coliformes fecales y enterococos fecales en agua de segundo uso.

Tipo de agua o sitio	FRNA/Coliformes fecales	FRNA/Enterococos
Residual cruda	0.575	0.581
Residual tratada	0.556	0.575
La draga	1.539	1.748
Apatlaco	1.0327	0.973
Japón	1.526	1.669

Estas diferencias, incluyendo el aumento relativo en el número de bacteriófagos FRNA respecto de los indicadores bacterianos en el punto la Draga y Japón podrían explicarse por la mayor sobrevivencia de los bacteriófagos FRNA en el agua del sistema Xochimilco.

Adicionalmente cuando se comparan las desviaciones estándar calculadas a partir de la densidad de cada indicador y coeficientes de variación; resulta que son los coliformes fecales ($s=0.37$) y los enterococos fecales ($s=0.45$) los que muestran los valores residuales más pequeños entre sitios, lo que implica valores similares en todos los puntos de muestreo del sistema Xochimilco. Por el contrario, al no reproducirse en el ambiente, los bacteriófagos FRNA ($s=1.2$) son capaces de discriminar de forma precisa las fuentes de contaminación.

A pesar de que se detectaron en el mismo número de muestras, los bacteriófagos FRNA, coliformes fecales y enterococos fecales, no representan de igual modo la contaminación fecal en agua de segundo uso en el medio ambiente. Los resultados de regresiones no paramétricas para un sólo factor demuestran diferentes patrones y vías de inactivación.

Por una parte las correlaciones entre el título de enterococos y la concentración de oxígeno ($r = -0.975$) o entre coliformes fecales y la temperatura ($r=0.994$) y el pH ($r=0.982$), apuntan a factores que regulan el metabolismo de estos microorganismos.

Por otra parte, la correlación positiva entre el título de bacteriófagos FRNA y la concentración de carbono total ($r=0.889$) podría estar relacionada con la protección contra foto inactivación, del mismo modo menores concentraciones de fósforo total ($r= -0.952$) y nitrógeno total, ($r= -0.928$) tenderían a reducir el estrés causado por otros microorganismos.

Estas tendencias deberán ser confirmadas o descartadas a través de un monitoreo sistemático que incluya un mayor número de puntos de muestreo.

5.5. Indicadores de contaminación fecal en una fuente de agua superficial para uso y consumo humano

5.5.1. Caracterización de los sitios de muestreo en Valle de Bravo

Una presa funciona esencialmente como un lago administrado con diferentes recursos para evitar la eutricación del agua.

Tabla 7. Concentración de nutrientes en una fuente de agua para consumo humano

Tipo de agua /sitio	P total (mg/L)	N total (mg/L)	C total (mg/L)
Valle de Bravo Fuente de agua para uso y consumo humano			
Boca del río Amanalco	0.33	0.1	1.63
Centro	0.06	0.58	1.63
Cortina	0.11	≤ 0.5	2.2

La concentración de fósforo determinada en los puntos de muestreo en la presa Miguel Alemán (Valle de Bravo) se mantuvo de un intervalo entre un valor mínimo de 0.06 mg/L en la parte central de la presa y un máximo de 0.33 mg/L en el principal afluente, la boca del río Amanalco. El fósforo es raramente encontrado en altas concentraciones y frecuentemente su concentración media en agua subterránea ronda los 0.02mg/L (Chapman *et al.*, 1996).

El carbono orgánico total se considera una indicación útil del grado de contaminación, aunque no diferencia entre fuentes microbianas, las concentraciones encontradas en la presa de Valle de Bravo son alrededor de un orden de magnitud menores a las encontradas en Xochimilco (Tabla 7 y Tabla 3).

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos en una fuente de agua para consumo humano

Tipo de agua/sitio	pH	Conductividad (µS/cm)	Temperatura (°C)
Valle de Bravo Fuente de agua para uso y consumo humano			
boca del río Amanalco	7.7	122.2	22.5
Centro	9.11	125.3	23.9
Cortina	9.14	126.1	23.8

Los valores de pH medidos (Tabla 8) en el centro y en la cortina de la presa sobrepasan ligeramente el valor al cual Feng *et al* (2003) encontró tasas de inactivación tan altas como 0.5 Log₁₀/L dia⁻¹ de para los bacteriófagos MS2 y Qβ a una temperatura de 25°C, la conductividad eléctrica se encuentra en el límite inferior para agua superficial (Chapman *et al.*, 1996).

5.5.2. Indicadores de contaminación fecal en fuentes de agua para uso y consumo humano

Tabla 9. Indicadores microbiológicos en una fuente de agua para consumo humano

Valle de Bravo Fuente de agua para uso y consumo humano	Presencia de rotavirus	Bacteriófagos FRNA (Log ₁₀ pfp/100mL)	coliformes fecales(Log ₁₀ UFC/100mL)	enterococos fecales (Log ₁₀ UFC/100mL)
Boca del río Amanalco		<1/100mL	1.7	1.5
Centro		<1/100mL	1.3	0.9
Cortina	√	<1/100mL	1.3	1.6

El título más alto de coliformes fecales se detectó en afluente (punto de muestreo boca del río Amanalco) y títulos alrededor de 40% menores en los puntos de muestreo centro y cortina (Tabla 9).

El mayor título de enterococos fecales se encontró en la cortina seguido por el afluente y un título un orden de magnitud menor en el centro de la presa.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003) el riesgo de padecer una enfermedad gastrointestinal transmitida por agua recreacional es del 5% cuando se encuentran entre 1.6 y 2.3 Log₁₀ enterococos fecales por 100 mL (percentil 95). Al respecto Ferley (2003) señala que la concentración de estreptococos fecales por arriba de la cual la morbilidad entre los bañistas es significativamente mayor a la de los no bañistas es de 1.30 Log₁₀ enterococos fecales por 100 mL

El título de bacteriófagos FRNA estuvo por debajo del límite de detección del método en el 100% de los puntos de muestreo. Este resultado no es del todo inesperado. Araujo (1997) señala que en su estudio en España que los bacteriófagos FRNA sólo fueron detectables en el 14% de 92 muestras, que

contenían entre 1 y 2.2×10^3 coliformes fecales por 100 mL. En este sentido, Duran (2002) manifiesta que los bacteriófagos FRNA pueden ser más sensibles a la luz solar de lo que han reportado otros autores, al igual que Sinton (1999) aduce la mayor tasa de inactivación en verano debida a la foto-oxidación. En este sentido Badireddy *et al.*, (2007) demostró que la tasa de inactivación del bacteriófago MS2 se duplica en presencia de radicales de oxígeno y aumenta 125% en presencia de superóxido a comparación de con sólo luz UV.

5.6. Indicadores de contaminación viral

Con métodos cada vez más sensibles para detección de virus entéricos en muestras de agua, resulta natural que en una proporción significativa se detecte una señal viral. El porcentaje de muestras positivas reportado varía en función de la calidad microbiológica del agua, el virus objetivo, y de la sensibilidad de los métodos empleados. Así; Jiang (2004) detectó adenovirus en el 50% de las muestras de ríos y arroyos muestreados en el sur de California y Ueki (2005) genomas de Norovirus en el total de muestras de agua residual examinadas y entre el 50 y 75% de las muestras de agua de río en dos años consecutivos.

En este trabajo se calculó una tasa de detección de genomas de rotavirus del 80% (4/5 muestras positivas) en agua residual y de segundo uso, y del 33% (1/3) en una fuente de agua superficial para uso y consumo humano. Aún cuando el método de concentración de virus por adsorción – elusión empleando el filtro electropositivo Cuno 1 MDS en agua es entre 11.5 y 22.4 veces más eficiente concentrando cápsides virales que RNA desnudo (Haramoto *et al.*, 2007). Sin embargo no es posible descartar la adsorción de partículas virales incompletas aún capaces de proteger el RNA viral. Debido a que el método de RT-PCR no discrimina entre partículas infectivas y no infectivas, a la alta persistencia de partículas no infectivas en estudios de microcosmos (Espinosa *et al.*, 2008), aunado al que una alta prevalencia de genomas cuantificados por RT-PCR en tiempo real que no pueden ser correlacionados infectividad por ser mucho menor la sensibilidad del cultivo en comparación con la sensibilidad del RT-PCR (Choi *et al.*, 2005), se resalta la

necesidad de incorporar otros elementos de juicio a la interpretación de riesgo a los resultados de detección rotavirus por RT-PCR.

En este contexto, al comparar la detección molecular de rotavirus en agua residual y de segundo uso con el título de otros indicadores virales y bacterianos de calidad del agua se determinó el título mínimo de bacteriófagos FRNA que se corresponde con una señal positiva de rotavirus es de 7×10^3 pfp/100mL, detectados en el efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de C.U. Del mismo modo se determinó el título mínimo de coliformes fecales (3.5 log/100mL) y enterococos fecales (3.2 log/100mL) concurrentes con una señal positiva para rotavirus en agua de segundo uso.

En agua superficial como fuente para uso y consumo humano se encontró un título mínimo de 1.28 log UFC/100mL y 1.56 log UFC/100mL para coliformes fecales y enterococos fecales respectivamente concurrentes con una señal positiva para rotavirus, sin que se hubieran detectado bacteriófagos FRNA en este tipo de agua.

La pregunta sobre cual indicador representa mejor la presencia de virus infecciosos o el riesgo de transmisión continua abierta y se recomienda el uso de más de un indicador para la caracterización de la calidad del agua y riesgo de transmisión de patógenos.

En agua de segundo uso, debido a su alta prevalencia, los indicadores bacterianos y bacteriófagos pueden alertar con un cierto margen de seguridad sobre la presencia de genomas virales. Asumiendo un comportamiento similar al de bacteriófagos FRNA, podemos concluir que en agua de segundo uso la proporción de los genomas de rotavirus detectados pertenecientes a virus infecciosos podrían significar un riesgo.

Por otro lado, la ausencia de bacteriófagos FRNA en una fuente de abastecimiento de agua superficial para uso y consumo humano, no se traduce en ausencia de genomas virales. Independientemente del potencial infeccioso, la detección de genomas de rotavirus sugiere la existencia de trayectorias de contaminación fecal.

Dado que de acuerdo con Parashar (2006) la proporción de casos de diarrea causada por rotavirus ha aumentado respecto del total de casos, y en virtud de la variación en los serotipos epidémicos entre años, resulta especialmente importante conocer las trayectorias de contaminación.

Teniendo en mente que en el agua se pueden identificar los serotipos causantes de enfermedad y los poco prevalentes, de acuerdo a van Zyl *et al.*, (2006), se anticipa una mejor comprensión de la dinámica de transmisión de rotavirus a través del agua al acumularse el número de investigaciones que muestren genotipos específicos asociados a diferentes tipos de agua.

6. Conclusiones

- Se recomienda el uso de bacteriófagos FRNA para la evaluación de procesos de tratamiento de agua residual y para el monitoreo de agua de segundo uso donde sea importante discriminar la localización de la fuente y grado de contaminación fecal.
- Se demuestra que indicadores bacterianos y bacteriófagos FRNA responden de forma distinta a parámetros ambientales, lo que sugiere que siguen vías alternas de inactivación en agua de segundo uso.
- Se determinaron tasas de detección de genomas de rotavirus y títulos de bacteriófagos FRNA similares a los encontrados por otros autores en los diferentes tipos de agua, y un título mínimo de 7×10^3 bacteriófagos FRNA/100mL, concurrente con la detección de genomas de rotavirus.
- Las bajas tasas de detección de bacteriófagos FRNA reportadas en este estudio en una fuente de agua superficial para uso y consumo humano limitan el potencial de los bacteriófagos FRNA para rastrear el origen de la contaminación fecal.
- Una mejor caracterización se puede obtener la identificación de los genomas de rotavirus como de origen probablemente humano, animal o vacunal.

Bibliografía

Allwood PB, Malik YS, Maherchandani S, Hedberg CW, Goyal SM. Effect of temperature on the survival of F-specific RNA coliphage, feline calicivirus, and *Escherichia coli* in chlorinated water. *Int J Environ Res Pub Health*. 2005;2(3-4):442-6.

Anónimo, 1995. ISO 10705-1: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 1. Enumeration of F-specific RNA Bacteriophages. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.

Araujo R, Puig A, Lasobras J, Lucena F, Jofre J. Phages of enteric bacteria in fresh water with different levels of faecal pollution *J Appl Microbiol* 1997; 82(3) : 281-286

Armon R, Araujo R, Kott Y, Lucena F, Jofre J. Bacteriophages of enteric bacteria in drinking water comparison of their distribution in two countries *J Appl Microbiol* 1997;83(5):627-633

Arraj A, Bohatier J, Laveran H, Traore O. Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. *J Appl Microbiol*. 2005; 98(2):516-24.

Ashbolt N. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*. 2004;198 (1-3): 229-38.

Badireddy A, Hotze E, Chellam S, Alvarez P, Wiesner M. Inactivation of bacteriophages via photosensitization of fullerol nanoparticles. *Environ Sci Technol*. 2007;15;41(18):6627-32.

Beauchamp C, Simao-Beaunoirb A, Beaulieu C, Chalifour C. Confirmation of *E. coli* among other thermotolerant coliform bacteria in paper mill effluents, wood chips screening rejects and paper sludges *Water Res* 2006 40: 2452 – 2462

Borchardt MA, PD Bertz, SK Spencer, DA Battigelli. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*. 2003 69(2):1172-80.

Carr RM, Blumenthal UJ, Mara D. Guidelines for the safe use of wastewater in agriculture: revisiting WHO guidelines. *Water Sci Technol*. 2004;50(2):31-8.

Caballero S, Abad FX, Loisy F, Le Guyader FS, Cohen J, Pintó RM, Bosch A. Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Jul;70(7):3904-9

Chapman. *Water Quality Assessments -A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring* Second Edition
UNESCO/WHO/UNEP 1996 Cambridge

Choi S. and Sunny C. Jiang. Real-Time PCR Quantification of Human denoviruses in Urban Rivers Indicates Genome Prevalence but Low Infectivity. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):7426-33

Clersceri, S.L., Greenberg, E.A., Eaton, D.A. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association/ American Water Works Association/Water Environ Fed. Baltimore, Maryland

Crockett C. The Role of Wastewater Treatment in Protecting Water Supplies Against Emerging pathogens. *Water Environ Res*. 2007;79(3):221-32

Curriero F, Patz J, Rose J, Lele. The Association Between Extreme Precipitation and Waterborne Disease Outbreaks in the United States, 1948-1994 *American J. Pub Health* 2001;91(8):1194-99

David EJ. *Transport and Survival of Water Quality Indicator Microorganisms in the Ground Water Environment of Florida: Implications for Aquifer Storage and Waste Disposal*. Thesis doctoral College of Marine Science University of South Florida 2003

De Anda. Challenges Facing Municipal Wastewater Treatment in Mexico. *Public Works Management & Policy*. 2008;12 (4):590-598

Deetz T, Smith EM, Goyal S, Gerba C, Vollet III J, Tsai L, DuPont HL. Occurrence of rota- and enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. *Water Res* 1984;18 (5):567-571.

Desmarais R, Sóló-Gabriele H, Palmer C. Influence of Soil on Fecal Indicator Organisms in a Tidally Influenced Subtropical Environment *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(3):1165–1172

Dubois E, Le Guyader F, Haugarreau L, Kopecka H, Cormier M, Pommepuy M. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase semi nested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl Environ Microbiol*.1997 (63)5:1794–00

Duran A,. Muniesa M,. Mendez X,. Valero F,. Lucena F, JofreJ. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters *J Appl Microbiol* 2002; 92(2): 338–347

Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Arias CF. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Res*. 2008 May;42(10-11):2618-28

Feng YY, Ong SL, Hu JY, Tan XL, Ng WJ. Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Qbeta. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003;30(9):549-52.

FerleyJ. Epidemiological significance of microbiological pollution criteria for river and recreational waters. *Int J Epidemiol* 1998;18(1):198-205

Ferguson C, de Roda Husman A,Altavilla N, Deere D, Ashbolt N. Fate and transport of surface wáter pathogens in watersheds. *Critical reviews in environmental Science and technology*. 2003;33(3):299-361

Ferguson CM, CM Davies, C Kaucner, M Krogh, J Rodehutsors, DA Deere, NJ Ashbolt. Field scale quantification of microbial transport from bovine faeces under simulated rainfall events.*J Water Health*. 2007;5(1):83-95.

Genthe B,IdemaK, Kfir R,Grabow W. Detection of rotavirus in waters: comparison of a cytoimmunolabeling technique with commercially available immunoassay. *Wat.Sci.Technol*. 1991;24:241-4

Gerba C,Smith E,Melnick J. Development of a quantitative method for detecting enteroviruses in estuarine sediments *Appl Environ Microbiol* 1977;34(2) 158

Gerba.C, Rose J, Haas C, Crabtree.K Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Water Res* 1996;30(12)::2929-2940.

Gordon, C, Toze. S Influence of Groundwater Characteristics on the survival of enteric viruses. *J Appl Microbiol.* 2003;95: 536 – 544.

Grabow WO, Taylor MB, de Villiers JC. New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Sci Technol.* 2001; 43(12):1-8.

Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Brengel-Pesce K, Soule H, Innocenti-Francillard P, Bost M, Gofiti L, Zmirou D, Seigneurin JM. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(6): 2690-2.

Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Appl Environ Microbiol.* 2006 May;72(5):3284-90

Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J Virol Meth.* 2007;142(1-2):169-73.

Havelaar AH. Bacteriophages as model organisms in water treatment. *Microbiol Sci.* 1987;4(12):362-4. Review

Havelaar AH, Hogeboom WM. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J Appl Bacteriol.* 1984;56(3):439-47

Havelaar AH, van Olphen M, Drost YC. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol.* 1993.59(9):2956-62

Hejkal T, Smith E, Gerba C. Seasonal occurrence of rotavirus in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984;47(3):588-90

Helmi K, Skraber S, Gantzer C, Willame R, Hoffmann L, Cauchie HM. Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, vaccinal poliovirus type 1, and bacteriophages phiX174 and MS2 with a drinking water biofilm and a wastewater biofilm. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(7):2079-88.

Hoshino. Y, Kapikian. A. (2000). Rotavirus serotypes: Classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J. Health. Popul. Nutr* 18:1;5-14.

Hussain I, Raschid L, Hanjra M, Marikar F. and van der Hoek W. *A Framework for Analyzing Socioeconomic Health and Environmental Impacts of Wastewater*

Use in Agriculture in Developing Countries. International Water Management Institute (IWMI) Colombo, Sri Lanka, Working 2001:26:23.

Hunter R, Waite M, Ronchi E. Drinking water and infectious disease establishing the links. IWA publishing CRC press 2002 New York

Hsu FC, Shieh YS, van Duin J, Beekwilder MJ, Sobsey MD. Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(11):3960-6.

Hurst C, Reynolds K. Detection of viruses in environmental waters, sewage, and sewage sludges. In: Manual of environmental microbiology 2002. Crawford R, Kundsén G, Mc Inerney M, Stetzenbach L. ASM press. Second edition. Washington DC

Jiang SC, Chu W. PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *J Appl Microbiol*. 2004; 97(1):17-28

Jiang S, Chu W, Wen He J. Seasonal Detection of Human Viruses and Coliphage in Newport Bay, California. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(20):6468-6474

Kane EM, Turcios RM, Arvay ML, Garcia S, Bresee JS, Glass RI. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. *Rev Panam Salud Pública*. 2004;16(6):371-7.

Kapikian A, Hoshino Y, Chanock R. Rotaviruses. In D.M. Knipe, P.M. Howley (ed) Fields virology 4th edition Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA 2001; 2:1787-1883.

Kittigul L, Ekchaloemkiet S, Utrarachkij F, Siripanichgon K, Sujirarat D, Pungchitton S, Boonthum A. An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples. *J Virol Meth*. 2005;124(1-2):117-22.

Kittigul L, Pombubpa K, Rattanatham T, Diraphat P, Utrarachkij F, Pungchitton S, Khamrin P, Ushijima H. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Int J Food Microbiol*. 2008;29(1-2):204-10.

Le Guyader F, Dubois E, Menard D, Pommepuy M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and

sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(10):3665-71.

Leclerc H, Mossel DA, Edberg SC, Struijk CB. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety *Ann. Rev. Microbiol.* 2001;55:201–34

Lucena F, Méndez X, Morón A, Calderón E, Campos C, Guerrero A, Cárdenas M, Gantzer C, Schwartzbrod L, Skrabber S, Jofre J1 Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America: *J Appl Microbiol.* 2003;94(5):808-15.

Metcalf T, V, Rao J Melnick. Solid associated viruses in a polluted estuary. *Monography Virol.* 1984;5:97

Metcalf T Melnick J, Estes M. Environmental Virology: From Detection of Virus in Sewage and Water by Isolation to Identification by Molecular Biology-A Trip of Over 50 Years. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:461-487

Nasser.A, Oman.S Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Res* 1999;33 (7):1748-1752.

Oragui J. Mara D, Silva S, Konig A. A new technique for the enumeration of rotavirus in wastewater samples *Wat.Sci.Technol.*1989; 21:99-104

Orenstein EW, Fang ZY, Xu J, Liu C, Shen K, Qian Y, Jiang B, Kilgore PE, Glass RI. The epidemiology and burden of rotavirus in China: a review of the literature from 1983 to 2005. *Vaccine.* 2007;25(3):406-13

Pancorbo.O.C, Evanshen.B.G., Campbell.W.,Lambert.S, Curtis.S.K, Woolley.T.W Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh waters. *Appl Environ Microbiol*1987;.53 (8) :1803-1811

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(5): 565-72

Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(2):304-6.

Petterson S, Ashbolt N, Sharma A. Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: a screening-level risk assessment, *Water Environ Res.* 2001; 74(4):411

Petterson SR, Ashbolt NJ, Sharma A. Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: a screening-level risk assessment *Water Environ Res.* 2001 73(6):667-72.

Petterson SR, Teunis PF, Ashbolt NJ. Modeling virus inactivation on salad crops using microbial count data. *Risk Anal.* 2001;21(6):1097-108.

Sepulveda.A, Hernández.A, Morales.C, Velasco.M. Atlas de la salud 2002. Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México.

Simonet J, Gantzer C. Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(12):7671-7.

Sinton LW, Finlay RK, Lynch PA. Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(8):3605-13.

Skraber S, Gassilloud B, Gantzer C. Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(6):3644-9.

Smith J. and Naser J. Urban agriculture for sustainable cities: using wastes and idle land and water bodies as resources. *Environ Urb.* 1992;4(2):141-52.

Tanaka H, Asano T, Schroeder E, Tchobanoglous G. Estimating the safety of wastewater reclamation and reuse using enteric virus monitoring data. *Water Environ Res.* 1998;70(1):39-51

Toranzos G, Gerba C, Hanssen H. Enteric viruses and coliphages in Latin America. *Toxicity Assessment. Int. J.* 1988; 3:491-510.

Tree JA, Adams MR, Lees DN. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(4):2038-43.

Ueki Y, D Sano, T Watanabe, K Akiyama, T Omura. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters *Water Res* 2005;39(18):4271-80

US Environmental Protection Agency (US EPA), 2001. Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer Procedure. Office of Water, Washington, DC (EPA 821-R-01-029)

US Environmental Protection Agency (US EPA), 2001b:Manual of methods for virology. Office of Research and development, Washington DC(EPA600/4-84/013)

Van Zyl W, Page, Grabow W, Steele A, Taylor M. Molecular Epidemiology of Group A Rotaviruses in Water Sources and Selected Raw Vegetables in Southern Africa. *Appl environ microbiol.* 2006;72(7):4554–60.

Van der Wielen PW, Senden WJ, Medema G. Removal of bacteriophages MS2 and phiX174 during transport in a sandy anoxic aquifer. *Environ Sci Technol.* 2008;15:42(12):4589-94.

Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996;335(14):1022-8.

Vikaskumar G. R. Shah, H Dunstan, MG. Phillip P Coombes,TK. Roberts, T. Rothkirch. Comparisons of water quality parameters from diverse catchments during dry periods and following rain events *Water Res.* 2007;(41):3655–66

WHO. *Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture.* 1989 Report of a Scientific Group, Technical Report Series 778. World Health Organization, Geneva, 74 p.

WHO. Guidelines for safe recreational water environments. Vol1 coastal and fresh waters 2003 World Health Organization, Geneva, 219p

Woody M A and Cliver DO. Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage Q beta. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(4): 1520–26

Wiggins B , Alexander M. Minimum Bacterial Density for Bacteriophage Replication Implications for Significance of Bacteriophages in Natural Ecosystems *Appl Environ Microbiol.* 1985;49 (1):19-23

Yates M. Classical indicators in the 21 st century- far and beyond the coliform. *Water Environ Res.* 2007;79 (3):279-286