

03041

2
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE ECOLOGIA

**USO DE INDICADORES BIOLÓGICOS DE CALIDAD
DEL AGUA SUBTERRANEA EN UNA ZONA DE LA
CIUDAD DE MEXICO**

maestría en Ecología

ING. BEATRIZ TORRES BERISTAIN

Ciudad Universitaria, México, D. F. 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

274621



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

Resumen	i
Introducción	1
Resultados y discusión	9
Conclusiones	23
Bibliografía	25
Anexo 1. Potential Fate viruses in the quifer underlying Mexico City	30
Anexo 2. Bacterial and viral Indicators of fecal pollution in Mexico City's Southern Aquifer	36

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgo para realizar mis estudios de maestría.

Al Instituto de Ecología de la UNAM por ser el marco en el cual se desarrollo este trabajo y mi formación académica en general.

A mi asesora Marisa Mazari Hiriart por la dirección y acompañamiento en el proceso de este trabajo y por su apoyo.

A mi comité Tutorial y que siguió el proceso de elaboración de éste trabajo y me asesoró en su desarrollo.

Al Dr. Suresh D. Pillai y a Kenneth Widmer por su apoyo en la elaboración de este trabajo y a la Universidad de Texas A & M por las facilidades otorgadas.

Al Dr. Juan Calva por su asesoría en la parte estadística y epidemiológica de este trabajo.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Ecología Química de los cuales compartí tantas horas de trabajo formal y de convivencia no formal.

A todos mis amigos y amigas que vivieron y sufrieron este largo proceso, a los que estuvieron en cuerpo y alma y a los que en espíritu estuvieron conmigo.

A mi Familia por su cariño y apoyo incondicional que son el motor de mi vida, gracias por la libertad.

RESUMEN

Se presentan los resultados del trabajo de investigación realizado durante la maestría en Ecología en el Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo se realizó en el laboratorio de Ecología Química, bajo la tutoría de la Dra. Marisa Mazari Hiriart sobre el uso de indicadores biológicos de calidad del agua subterránea en una zona de la Ciudad de México y la temática central de esta investigación fue el uso de colifagos como indicadores alternos de calidad de agua.

El primer trabajo "*Potential Fate of Viruses in the Aquifer Underlying Mexico City*", se presentó en forma de póster en el 8o Simposium Internacional de Microbiología del Agua y Salud, en Palma de Mallorca, España, 6-10 octubre, 1996. Se seleccionó el bacteriófago MS-2 por tener características físicas similares y de comportamiento ambiental con los enterovirus, se realizaron experimentos de supervivencia utilizando viales con agua subterránea de 5 localidades en la Ciudad de México y creando un microcosmo para simular las condiciones del acuífero con una duración de 20 días. Se encontró que estos colifagos sobreviven en las condiciones del acuífero con una disminución en población de entre 1 y 2 ordenes de magnitud, no habiendo diferencias significativas entre los sitios.

El segundo trabajo "*Bacterial and Viral Indicator of Fecal Pollution in Mexico City's Southern Aquifer*" se encuentra en prensa en *Journal of Environmental Science and Health, Part A* (aceptado mayo 12, 1999). Con base en los resultados de la fase previa se decidió realizar experimentos de supervivencia por 45 días utilizando 2 colifagos MS-2 y PRD-1. La diferencia que se observó entre el día 20 (primera etapa) y el día 45 fue de aproximadamente 1 orden de magnitud para ambos fagos. Los resultados muestran la capacidad de supervivencia de colifagos por periodos largos lo que sugiere un comportamiento similar de enterovirus en estos ambientes. Así mismo se realizó un monitoreo a lo largo de 10 meses en 5 pozos de extracción analizando muestras de agua subterránea mediante parámetros tradicionales como coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales, así como colifagos. Se analizaron las ventajas del uso de los 4 indicadores así como sus posibles combinaciones para proporcionar una evaluación más completa de la calidad bacteriológica y virológica del agua subterránea.

En este estudio se observó que la presencia de colifagos en agua presentan una buena correlación con la calidad de la misma. Los colifagos cumplen con los criterios de un buen indicador de contaminación, están presentes cuando otro microorganismo está presente, son más resistentes a condiciones ambientales adversas y a tratamientos de desinfección del agua. Además por los tiempos de supervivencia más larga en el acuífero dan un margen de seguridad con respecto a la posible existencia de enterovirus; siendo de utilidad para la evaluación tanto de contaminación reciente como antigua.

Los niveles de contaminación encontrados en el agua subterránea evidencian la vulnerabilidad del acuífero que subyace a la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, y que tradicionalmente se consideraba de buena calidad y protegida por las formaciones geológicas. La detección de colifagos es un método sencillo y accesible desde el punto de vista técnico y económico, por lo que se recomienda como un parámetro básico para la determinación de calidad de agua, especialmente aplicable como indicador de calidad de agua para el uso doméstico por su sensibilidad y especificidad.

INTRODUCCIÓN

El Agua subterránea en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM)

Numerosos centros urbanos en todo el mundo dependen del agua subterránea como su única fuente de agua potable. El agua superficial en la Cuenca de México es escasa. El 70% del agua que consume esta Megalópolis se extrae del sistema de acuíferos, lo que equivale aproximadamente a 42 m³/s (Ezcurra y Mazari, 1996; NRC, 1995). El área total de la Cuenca de México es de alrededor de 9,000 km² y el sistema de acuíferos que abastece a la Ciudad de México, está localizado en la parte sur occidental de la Cuenca cubriendo 3,448 km² (Lesser *et al.*, 1990).

La Cuenca de México es considerada una de las 10 Regiones en Riesgo Ambiental a nivel mundial por tener una alta densidad poblacional e industrial, estar localizada dentro de una cuenca naturalmente cerrada, y por el rápido deterioro de la calidad del agua y del aire, además de los problemas existentes en el suministro de agua y la dependencia de las regiones que la rodean tanto para el abastecimiento de agua como de alimentos (Kasperson *et al.*, 1995).

Se han definido tres principales zonas geohidrológicas para la Cuenca de México: la zona lacustre, la zona de montaña y la zona de transición (Marsal y Mazari, 1969; NRC, 1995). La forma en que los contaminantes, migran hacia los sistemas de agua subterránea depende de factores que varían entre las tres zonas geohidrológicas mencionadas anteriormente. Estos factores son: la composición y textura de los suelos, el nivel freático, la tasa de recarga, la precipitación, y la temperatura entre otros, influyendo en la movilidad, transporte, transformación y degradación de estos contaminantes (Lesser *et al.*, 1990).

Los suelos lacustres abarcan gran parte de la superficie de la Cuenca donde puede distinguirse el lecho de los antiguos lagos, son suelos muy compresibles de baja permeabilidad y de espesor variable, con promedio alrededor de 60 m (Lesser *et al.*, 1993). Gran parte del acuífero de la ZMCM (834 km²) está cubierto por gruesas capas de arcilla de muy baja permeabilidad (NRC, 1995). Por muchos años se ha considerado que el agua subterránea estaba protegida por las capas de suelo que cubren al sistema de acuíferos, especialmente por los suelos de tipo arcilloso que actúan como un filtro natural de contaminantes. Sin embargo, los contaminantes pueden entrar, migrar y dispersarse en estos sistemas subterráneos (Mazari y Mackay, 1993).

La zona de montaña es de origen volcánico e incluye sierras y elevaciones que forman el parteaguas de la Cuenca, además de ciertas elevaciones enclavadas dentro de la misma. La zona de transición se extiende entre el lecho del lago y las montañas, es un área en que las capas de arcilla lacustre se intercalan con las de limo y arena, las áreas más cercanas a la base de las montañas en la zona sur están compuestas principalmente de basalto (NRC, 1995; Lesser *et al.*, 1993). Las principales zonas de recarga de agua subterránea son la zona de transición donde se originan infiltraciones de agua pluvial que alimentan al acuífero (NRC, 1995).

Fuentes de contaminación

Si se considera que la ZMCM alberga a una población de aproximadamente 18 millones de habitantes y que en esta área se encuentra aproximadamente el 50 % de la industria del país con la consiguiente producción de desechos que no recibe un tratamiento adecuado, resulta preocupante el alto número de fuentes de contaminación tanto del suelo como del agua en esta zona (Ezcurra y Mazari, 1996; INEGI, 1990).

Dentro de la ZMCM algunas de las fuentes potenciales de contaminación de agua subterránea son: infiltración de lixiviados a partir de sitios de disposición de desechos sólidos, infiltración de aguas residuales de origen tanto doméstico como industrial sin tratamiento, zonas que carecen de drenaje, infiltración de aguas pluviales, canales de drenaje no revestidos, basureros a cielo abierto, con o sin aislamiento del suelo, pozos abandonados, así como problemas en el sistema de distribución del agua y conexiones cruzadas de agua potable con cualquier otro fluido contaminante (Lesser *et al.*, 1990; Mazari y Mackay, 1993; CNA, 1994; SEDESOL-INE, 1994; NRC, 1995).

Un gran número de microorganismos intestinales patógenos y no patógenos son aportados por las excretas de humanos y otros animales de sangre caliente (Rao y Melnick, 1986; Evans, 1991). El agua puede contaminarse por más de 140 serotipos de virus a través de heces fecales de humanos y animales. Virus de Hepatitis A, calicivirus, adenovirus, rotavirus y enterovirus son los grupos de mayor incidencia en la salud humana. Se han reportado un gran número de epidemias debido a la presencia de estos virus en el ambiente (Bosh *et al.*, 1991; Evans, 1991).

La detección de bacterias entéricas en el agua potable, puede servir como una advertencia sobre eventos de contaminación, o problemas en el sistema de distribución de agua potable. Sin embargo, la identificación y enumeración de todas las bacterias patógenas que pueden estar presentes en el

agua es costoso, requiere de tiempo, y es poco práctico para desarrollarlo en forma rutinaria por lo que se utilizan sistemas de evaluación accesibles para uso cotidiano, llamados “indicadores” (Singh *et al.*, 1992).

Calidad microbiológica del agua, uso de indicadores

La evaluación del riesgo de contaminación de agua potable debe ir más allá de enumerar los patógenos cuando estos están presentes. Se necesita proporcionar una evaluación de la probabilidad que se presente un organismo patógeno en el abastecimiento de agua, es decir se trata de utilizar herramientas que midan el “riesgo” en términos de la posibilidad de que el sistema reciba patógenos, esta es la principal función de los indicadores (McJunkin, 1988; Snowdon y Cliver 1989; Godfree *et al.*, 1997).

Los “organismos indicadores” no tienen una relación directa con el número de patógenos presentes en una muestra dada de agua, sino que ayudan a evaluar el grado en que ha sido contaminada el agua, por la presencia de heces humanas y de animales de sangre caliente. Los indicadores evalúan la posibilidad de transmisión por el agua de cualquier tipo de enfermedad como consecuencia de contaminación fecal, así como también la efectividad de los procesos de tratamiento y la seguridad sanitaria del agua potable (McJunkin, 1988; Pontius, 1990).

Cualquier organismo que se encuentre en la heces fecales es un indicador potencial de contaminación fecal, no obstante, no todos los organismos aportan la misma información como indicadores. Algunos son más fáciles de medir o pueden estar en mayor números y otros pueden sobrevivir por largos períodos (Singh *et al.*, 1992). Para que un indicador sea útil su ausencia debe establecer una menor probabilidad (que tienda a cero) de encontrar patógenos (Dan *et al.*, 1996).

Durante décadas el grupo coliforme fecal ha sido usado como indicador de patógenos humanos para evaluar la calidad de agua (Godfree *et al.*, 1997). Las bacterias coliformes no ocupan por periodos prolongados los ecosistemas acuáticos, por tanto su presencia en agua sirve como un indicador de contaminación fecal reciente (FDA, 1997). Estas bacterias son relativamente fáciles de detectar y enumerar, e indican la existencia potencial de enteropatógenas en agua potable (Singh *et al.*, 1992). La resistencia de los microorganismos enteropatógenos en ambientes externos es muy variable y depende de muchos factores incluyendo las diferencias entre especies y organismos, así como también las condiciones ambientales y el tipo de tratamiento que se le da al agua. Por lo que, en la actualidad los agentes bacterianos que se usan para la evaluación de la calidad del agua y la

prevención de enfermedades causadas por bacterias entéricas han sido cuestionados en su utilidad como indicadores adecuados de contaminación viral (Kott *et al.*, 1974; Mara y Oragui, 1983; Funderberg y Sorber 1985; Snowdon y Cliver 1989; IAWPRC, 1991; Grabow *et al.*, 1993).

Por tanto, parece necesario la utilización de indicadores alternativos de contaminación fecal y que además puedan ser de utilidad para la evaluación de contaminación por virus dentro del monitoreo rutinario del agua para consumo humano. Entre algunos indicadores potenciales están los colifagos somáticos (Hilton y Stotzky, 1973; Kott *et al.*, 1974), colifagos F⁺ (Havelaar y Hogeboom 1984; IAWPRC, 1991) y bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis* (Jofre *et al.*, 1986, Tartera y Jofre 1987; IAWPRC, 1991).

Evidencias de presencia de enterovirus en ausencia de coliformes

Los virus y algunos parásitos presentan una mayor resistencia a la inactivación natural o a los procesos de tratamiento de agua que los indicadores bacterianos usuales (Payment *et al.*, 1985; 1993; Jofre *et al.*, 1997). Puede existir alguna relación entre el número de bacterias indicadoras y virus entéricos en aguas recientemente contaminadas con cargas fecales muy altas, pero ocurren discrepancias cuando el grado de contaminación es menor o ha transcurrido algún tiempo entre el evento de contaminación y la evaluación del mismo (Geldenhuis y Pretorius, 1989). Dichas diferencias parecen ser debidas al tamaño de las muestras usadas en el análisis de virus y bacterias coliformes (400 L vs 50-100 mL respectivamente), a la escasez de nutrientes para mantener con vida a las bacterias y la mayor resistencia de los virus en ambientes acuáticos (Rao y Melnick, 1986).

Las coliformes son organismos celulares mientras los virus son cadenas de ácido nucleico cubiertos con una capa protéica pero sin una maquinaria propia para reproducirse, por lo que las primeras son más susceptibles al estrés ambiental que los VEH (Jawetz *et al.*, 1987; Evans, 1991). Los virus son más pequeños que las bacterias, además presentan propiedades coloidales en agua, esto es, poseen una carga en su superficie y se absorben rápidamente a los sólidos. Por lo tanto, la presencia y distribución de virus y bacterias en agua superficial, subterránea y residual siguen patrones diferentes (Funderberg, y Sorber, 1985; Woody y Cliver, 1995).

Los Virus Entéricos Humanos (VEH) pueden sobrevivir a los procesos de tratamiento de agua mejor que los indicadores bacterianos. Diversos autores reportan la presencia de virus en la ausencia de coliformes (Rao y Melnick, 1986; Hadzen *et al.*, 1993). La supervivencia de los virus

dentro de los acuíferos depende especialmente del sitio y el tipo de virus. (Hurst *et al.*, 1980; Gerba y Goyal 1982; Yates *et al.*, 1985 Dowd y Pillai. 1997; Dowd *et al.*, 1995; 1997). La naturaleza física y química de los acuíferos tienen también influencia en la adsorción viral (Dowd *et al.*, 1996).

Identificación de enterovirus, técnicas, y dificultades

La presencia de virus entéricos humanos en fuentes de agua ha sido reconocida por varias décadas, pero existe poca información sobre los aspectos epidemiológicos. En cuanto al monitoreo del agua para evaluar la presencia de virus, existen problemas relacionados con metodologías específicas para ciertos virus, su estandarización y validación (Keswick y Gerba, 1980; APHA, 1992) Además del gran requerimiento de tiempo para obtener resultados, variación en la detección con precisión y exactitud de diversos tipos de virus, la escasez de personal capacitado y los altos costos de los análisis virales (Evans, 1991; Snowdon y Cliver, 1989).

La ocurrencia de los virus en el ambiente es esporádica y hay diferencia entre virus e indicadores propuestos en cuanto a capacidades de supervivencia, facilidad de detección, respuestas a estrés ambiental y susceptibilidad a la desinfección (Rao y Melnick, 1986; Pontius, 1990). La detección de enterovirus (poliovirus, coxsackievirus grupos A y B y echovirus) por cultivo celular es el método de referencia ya que es la única manera en que la naturaleza infecciosa de los virus aislados puede ser determinada. Una de las principales limitantes en la detección directa es la carencia de células adecuadas para realizar cultivo celular de algunos virus de importancia epidemiológica, incluyendo virus de la hepatitis A, Norwalk virus y rotavirus.

Técnicas de biología molecular como transcripción reversa con reacción en cadena usando polimerasa (RT-PCR) puede ser utilizada por su alta especificidad, sensibilidad y rapidez (24 a 48 h) en la detección del genoma de enterovirus (Kopecka *et al.*, 1993; Gantzer *et al.*, 1997). La detección del genoma de los enterovirus por RT-PCR es una herramienta valiosa y alternativa al cultivo celular en la detección de virus en sistemas acuáticos. Sin embargo la detección del genoma viral por sí mismo no nos proporciona ninguna información acerca de la infectividad de los virus detectados.

Los bacteriófagos como indicadores de enterovirus,

Un indicador de virus entéricos humanos es necesario para el monitoreo adecuado y seguro de calidad del agua. El indicador idóneo debe ser de origen fecal humano y no reproducirse en el agua, debe estar presente en ambientes acuáticos en cantidades representativas de la contaminación por

virus entéricos humanos. Además debe ser similar a los virus entéricos humanos con respecto a sus propiedades físicas, mismas que determina su comportamiento en sistemas acuáticos, no ser patógeno y ser fácil y rápido de detectar (Snowdon y Cliver, 1989; Pontius, 1990; Moringo *et al.*, 1992; Woody y Cliver, 1995)

Algunos bacteriófagos cubren la mayoría estos requerimientos para ser indicadores de enterovirus humanos en agua especialmente en sistemas de agua subterránea (Gerba, 1987). Los bacteriófagos son virus que parasitan bacterias; aquellos que parasitan específicamente *Escherichia coli* se les llama colifagos. Un aspecto que debe enfatizarse es que los colifagos son habitantes del tracto intestinal humano y de otros animales como mamíferos y pájaros, y son encontrados siempre que existe contaminación fecal (Snowdon y Cliver 1988). Los colifagos están presentes en aguas residuales (Furuse, 1987) en agua subterránea (Zohar *et al.*, 1984) y tienen comportamientos similares a los enterovirus en agua subterránea (Skilton y Wheeler, 1988). Algunos colifagos como los que parasitan *B. fragilis* son exclusivamente de origen fecal humano.

Numerosos reportes ha mencionado la utilidad de los bacteriófagos y colifagos para actuar como indicadores de calidad microbiológica del agua (Kott, *et al.*, 1974; Grabow *et al.*, 1984; Snowdon y Cliver, 1989). El posible uso de colifagos como indicadores en procesos de tratamiento de agua potable ha sido estudiado por diversos autores (Guy *et al.*, 1977; Keswick *et al.*, 1984; Stetler, 1984; Bitton, 1987; Ketratanakul y Ohgaki, 1989; Payment *et al.*, 1993). Han sido sugeridos como los mejores indicadores de los enterovirus, dado que tienen características y comportamiento en el ambiente similares a los enterovirus, como es la resistencia a los sistemas de desinfección y transporte a través de los sistemas de distribución muy similar a los enterovirus (Debartolomeis y Cabelli, 1991). Además se ha encontrado que son tan resistentes al estrés ambiental y a la cloración como los enterovirus (Kott *et al.*, 1974). La sobrevivencia de colifagos en el ambiente es afectada por factores tales como la concentración de iones, el pH, la temperatura, la materia orgánica, la presencia de material orgánico particulado, y la actividad microbiana en el agua (Nasser *et al.*, 1993).

Los bacteriófagos comparten propiedades con virus humanos en términos de su estructura, composición, tamaño y morfología. En vista de este parecido algunos colifagos tienen características que los hacen atractivos para su aplicación como indicadores o modelos de virus humanos (IAWPRC, 1991; Grabow *et al.*, 1993; Cabelli *et al.*, 1996; Dowd y Pillai, 1996; Donia y Pana, 1996; Nasser y Blanc, 1996; Tree *et al.*, 1996).

Tres tipos de bacteriófagos han sido propuestos como indicadores específicos de contaminación viral: los colifagos somáticos (Morinigo *et al.*, 1992; Grabow *et al.*, 1993; 1995, Kamiko y Ohgaki, 1993) los RNA colifagos F específicos, (F+) (Havelaar *et al.*, 1986; Havelaar, 1987; DeBartolomeis y Cabelli, 1991; ISO, 1993; Nasser *et al.*, 1993; Woody y Cliver, 1995) y los fagos de *Bacteroides fragilis* (Jofre *et al.*, 1986;1995; Araujo *et al.*, 1996; Gantzer *et al.*, 1998). El tamaño, estructura y la tasa de supervivencia en el ambiente de estos bacteriófagos son similares a los de los enterovirus. Los fagos HSP40 de *B. fragilis* parecen ser indicadores específicos de contaminación fecal humana, mientras los otros dos tipos de bacteriófagos pueden serlo de contaminación tanto fecal humana como animal. Se ha mostrado que los niveles de excreción de colifagos somáticos, F+ específicos y bacteriófagos que infectan *B fragilis* son generalmente constantes en el humano (Araujo *et al.*, 1996).

Los colifagos, somáticos y F específicos

Los colifagos somáticos se encuentran en ambientes contaminados con aguas residuales en concentraciones que regularmente exceden las concentraciones de los VEH por varios órdenes de magnitud (Grabow *et al.*, 1995). Los colifagos somáticos se ha observado que se multiplican en condiciones ambientales, por tanto el uso de estos colifagos implica el riesgo de sobreestimar la concentración de virus patógenos principalmente donde existe una alta concentración de materia orgánica (Kamiko y Ohgaki, 1993). Se han encontrado correlaciones significativas entre colifagos somáticos y la presencia de enterovirus infecciosos, aunque no presentan las mismas fluctuaciones en las concentraciones (Gantzer *et al.*, 1998).

Una de las limitaciones relacionada al uso de colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal, es que pueden llegar a infectar bacterias relacionadas con *E. coli* que se encuentran naturalmente en el ambiente. Ciertos hospederos son metabólicamente activos en ambientes acuáticos lo que pudiera causar su multiplicación y causar la replicación de colifagos somáticos. Esto implica que la presencia y número de colifagos somáticos no siempre esta directamente relacionada cualitativa ni cuantitativamente con la contaminación fecal (Grabow *et al.*, 1995; Handzel *et al.*, 1993).

Los colifagos ARN F-específicos, o F+ han sido propuestos como organismos indicadores de contaminación fecal para ambientes acuáticos (Handzel *et al.*, 1993) y se considera como uno de los indicadores más útiles de virus entéricos (Kamiko y Ohgaki, 1993; Heritage *et al.*, 1996). Los

colifagos F+ han sido utilizados como indicadores de calidad de agua y la Organización Internacional para la Estandarización ha formulado un procedimiento estandar para su detección y enumeración (ISO, 1993; Grabow *et al.*, 1995).

Los colifagos F+ puede infectar células hospederas con una “fimbriae” (pili) sexual que codifica genéticamente la fertilidad (F). La infección de estos colifagos sobre las células hospederas de *E. coli* (F+) se inicia con la adhesión del pili F a la pared celular. Estos pili, contienen los sitios receptores para los colifagos F+, y sólo se producen a temperaturas por arriba de los 30°C. El pili F se sintetiza durante el crecimiento exponencial de las células hospederas con máximo en la fase última de este (Grabow *et al.*, 1995). Cuando la temperatura baja de 25°C después de ser incubados a 37°C los pili F son removidos de la pared celular (Kamiko y Ohgaki, 1993). Por tanto los colifagos encontrados en muestras ambientales presumiblemente vienen de células que crecieron a temperaturas tales como las del intestino de humanos o de otros animales de sangre caliente (Handzel *et al.*, 1993; Woody y Cliver, 1995).

Los colifagos F+ pueden ser comparados con virus entéricos humanos como los enterovirus y los virus like-Norwalk, dada su similaridad estructural (sin envoltura, simetría icosaédrica, 27 nm de diámetro y ARN de cadena única) (Van Olphen *et al.*, 1991; Handzel *et al.*, 1993; Cabelli *et al.*, 1996). Por ejemplo los colifagos del tipo MS-2, en los cuales su tamaño y estructura está muy relacionada a la de los enterovirus típicos como el poliovirus, y tienen una cadena única de material genético ARN como los enterovirus (Grabow *et al.*, 1995). Además estudios de poblaciones mezcladas de colifagos F+ y cadenas prototipo de virus indican similitudes a los virus entéricos humanos en términos de respuesta a procesos de tratamiento tales como la coagulación, floculación y sedimentación y desinfección de agua y aguas residuales (Handzel *et al.*, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El marco geográfico de este estudio es la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM). En la Figura 1. se observa el mapa de esta área, la cual está dividida políticamente en 26 municipios pertenecientes al Estado de México y 16 delegaciones del Distrito Federal. En esta zona geográfica existen tres zonas geológicas: zona lacustre, zona de transición y zona de montaña que se aprecian en la Figura 2 así como también la localización de los pozos de extracción, se puede apreciar que un gran número de estos pozos se encuentra en la zona de transición una de las áreas más vulnerables de contaminarse. En la Figura 3 se puede apreciar la ubicación geográfica de los pozos muestreados en este estudio: Iztapalapa y Xochimilco se encuentran en las zonas de transición, Periférico y Xotepingo dentro del área lacustre y el pozo de Universidad pertenece al zona de montaña o lomas.

Las características fisicoquímicas del agua de los 5 pozos muestreados en este estudio se muestran en la Tabla 1. Se ponen como referencia los límites permisibles según los Criterios Ecológicos de Calidad de Agua (DOF, 1989) y la Norma Oficial Mexicana (DOF, 1996). Los fosfatos no se encuentran dentro de la Norma Oficial Mexicana, sin embargo rebasó en todos los pozos el límite permisible de los criterios ecológicos. El agua subterránea de Iztapalapa fue el agua que presentó una peor calidad y que rebasó los límites para fierro, manganeso, fosfatos y alcalinidad total.

Se analizaron cualitativamente los cuatros indicadores microbiológicos utilizados, coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), estreptococos fecales (EF) y colifagos (FA). Se consideraron como muestras positivas aquellas en las que se observó la presencia de al menos un organismo en cualquiera de las tres replicas por muestra y como muestra negativa cuando hubo ausencia de organismos en todas las réplicas.

Se llevó a cabo una correlación aplicando la prueba de Spearman, tomando la mediana del triplicado de todas y cada una de las muestras independientemente del pozo. Los resultados se muestran en la Tabla 2, de acuerdo con los valores sugeridos por Kramer y Feinstein (1981) se observa una buena correlación (0.7367, significancia <0.001) entre coliformes fecales y estreptococos fecales y una correlación moderada (con valores entre 0.5807, significancia <0.001 y 0.4152, significancia 0.001) entre todos los demás indicadores.

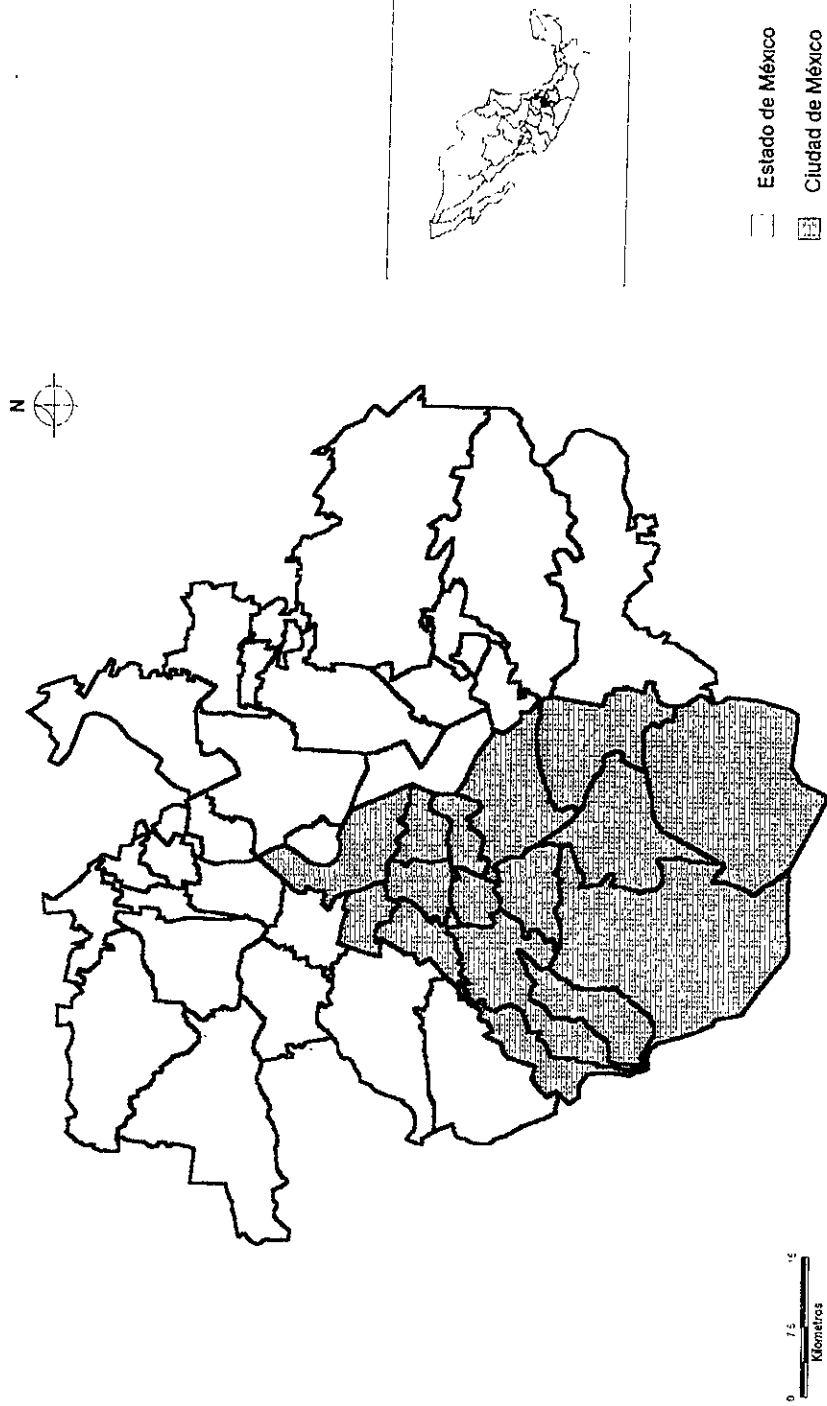


Fig 1. Zona Metropolitana de la Ciudad de México, abarcando la Ciudad de México y los estados conurbados del estado de México

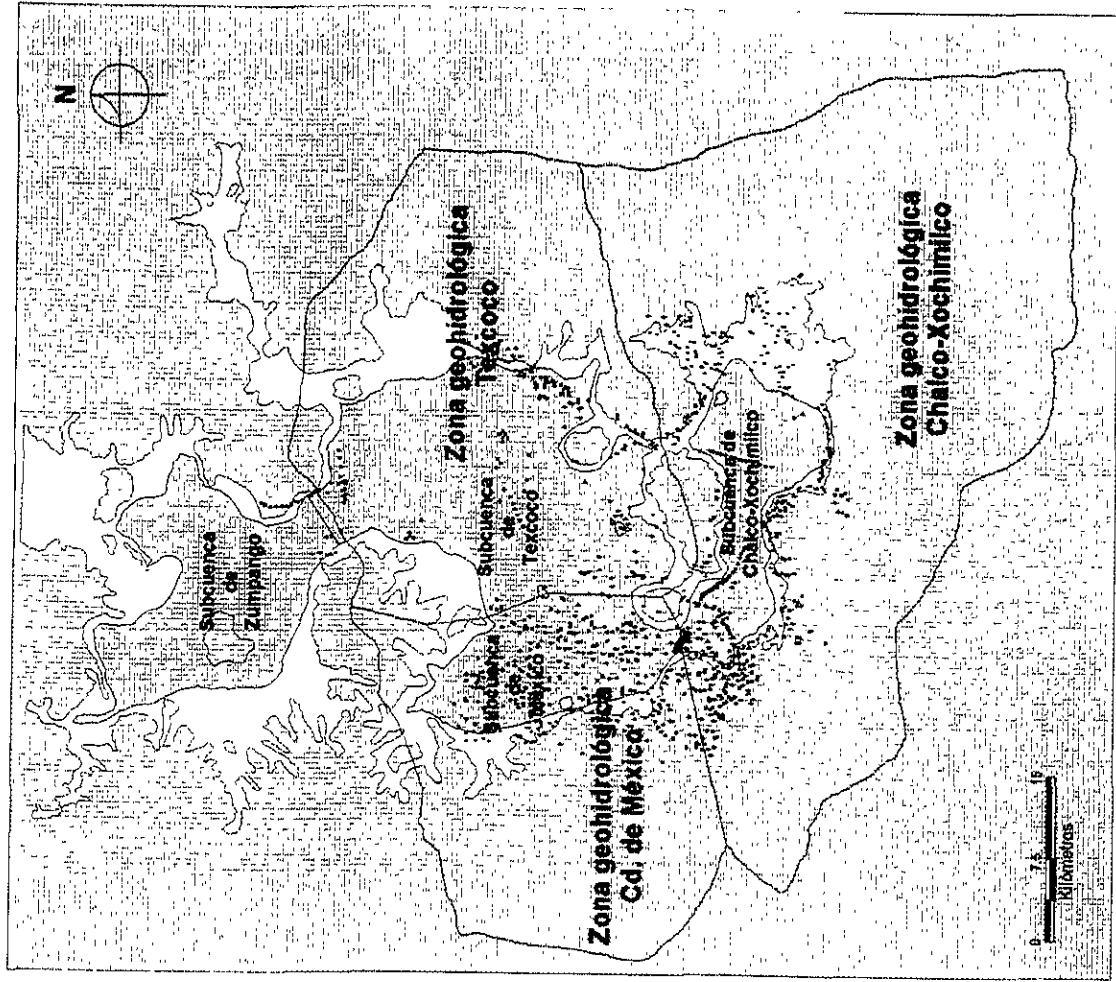


Fig. 2. Zonas geológicas en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México y distribución de los pozos de extracción

- Zona Lacustre
- Zona de Transición
- ▣ Zona de Lomeríos

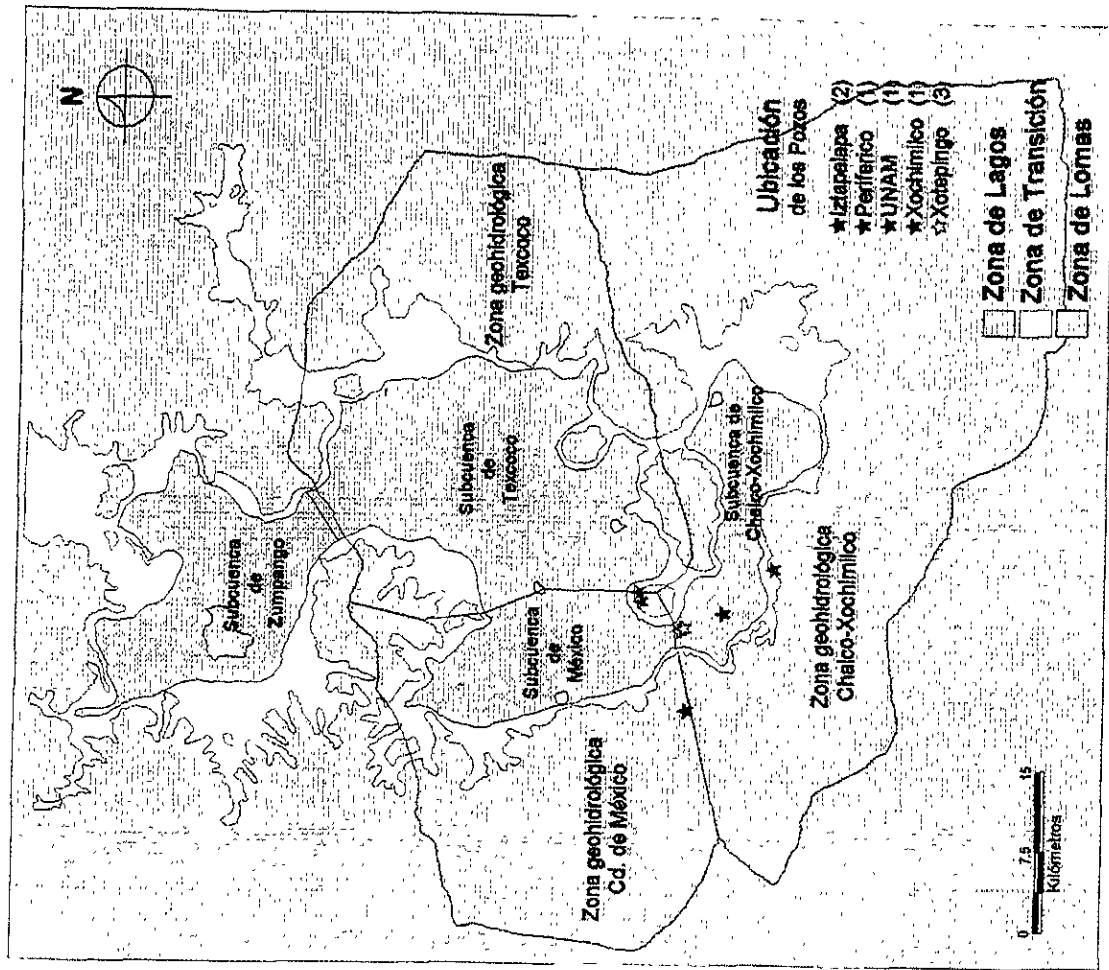


Fig. 3. Localización de los pozos muestreados, 2 en zona de transición, dos en zona de lagos y uno en zona de lomas

Tabla 6. Características fisicoquímicas (mg/L) del agua subterránea de 5 pozos del Area Metropolitana de la Ciudad de México.

Parámetro/Pozo	Universidad		Xochimilco		Periférico		Xotepingo		Iztapalapa		DOF 1989	DOF 1996
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2		
	Temperatura (°C)	13.40	13.50	10.40	10.50	16.90	16.90	16.40	15.40	18.10		
pH (unidades)	7.50	7.30	6.86	7.30	8.00	8.00	7.90	7.65	7.35	8.00	250.00	6.5 - 8.5
Cl ⁻	33.00	27.00	12.00	10.00	32.00	29.00	104.00	94.00	215.00	219.00	5.00	250.00
N-NO ₃	0.248	2.916	0.187	6.715	0.017	0.444	0.032	2.284	0.002	0.049	0.05	10.00
N-NO ₂	< 0.001	0.002	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.05	0.05
N-NH ₃	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	-	0.50
Fe ⁺²	< 0.02	< 0.05	< 0.02	< 0.05	< 0.02	< 0.05	< 0.02	0.08	<u>0.354</u>	<u>0.379</u>	0.30	3.00
Mg ⁺²	12.39	13.89	11.93	7.778	14.16	12.32	42.18	38.00	68.72	57.80	-	-
P-PO ₄	<u>0.138</u>	<u>0.205</u>	<u>0.373</u>	<u>0.331</u>	0.075	<u>0.107</u>	<u>0.167</u>	<u>0.282</u>	<u>0.303</u>	<u>0.478</u>	0.10	-
Mn ⁺²	< 0.01	0.020	< 0.01	< 0.10	< 0.01	< 0.10	< 0.01	< 0.10	<u>0.845</u>	<u>0.555</u>	0.10	0.15
Alcalinidad Total	101.00	100.00	87.00	77.00	154.00	149.00	352.00	299.00	<u>619.00</u>	<u>641.00</u>	400.00	-
Conductividad	371	357	307	252	393	456	1018	960	1675	1596	-	-
SO ₄ ⁻²	33.00	27.00	51.00	21.00	37.00	12.00	56.00	59.00	5.00	15.00	500.00	400.00
SO ₂	< 0.10	0.32	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	0.20	< 0.10	1.02	-	-
Ca ⁺²	1.845	0.915	2.107	0.906	1.131	0.757	4.808	10.37	17.78	3.814	-	-
K ⁺	6.081	-	4.100	-	5.496	-	14.51	-	21.68	-	-	-
Na ⁺	28.37	-	19.14	-	39.37	-	116.00	-	217.00	-	-	200.00
HCO ₃ ⁻	101.00	-	87.00	-	154.00	-	352.00	-	619.00	-	-	-

1 = agosto, 1996

1 = marzo, 1997

Referencias:

Diario Oficial de la Federación, 1989. Criterios Ecológicos de Calidad de Agua. CE-CCA-00/89. Diciembre 2, 1989.

_____ valor mayor que el límite permisible

Diario Oficial de la Federación, 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Enero 18, 1996.

_____ valor mayor que el límite permisible

Tabla 2. Matriz de correlación de Spearman de los cuatro indicadores microbiológicos de calidad de agua

CT	0.5807 n(50) Sig <0.001		
EF	0.7367 n(50) Sig 0.000	0.4152 n(50) Sig 0.001	
FA	0.4376 n(50) Sig. 0.001	0.4329 n(50) Sig 0.001	0.5844 n(50) Sig <0.001
	CF	CT	EF

Se realizó un análisis para conocer cual o cuales de los cuatro indicadores microbiológicos daban un mejor rendimiento. El rendimiento se entiende como el porcentaje de pruebas positivas del total de muestras analizadas, todos los parámetros analizados pueden llegar a presentar tanto falsos positivos como falsos negativos, lo que puede llegar a tener cierto impacto en este valor. El rendimiento de los indicadores analizados individualmente se muestran en la Figura 4, el indicador que mostró un mayor número de muestras positivas (72%) fue el de colifagos seguido de coliformes totales (48%), estreptococos fecales (28%) y coliformes fecales (14%). Los colifagos presentaron el mayor rendimiento, la bacteria hospedera que se utilizó para la detección de estos bacteriófagos es la cepa 15597 ATCC, la cual identifica sólo colifagos F+ que provienen de intestinos de animales de sangre caliente incluyendo al hombre, por lo que es un parámetro altamente específico. Es muy posible que el mayor número de detecciones sea debido a su supervivencia prolongada en ambientes extraintestinales, esto lo hace capaz de detectar contaminación reciente y antigua (Handzel *et al.*, 1993).

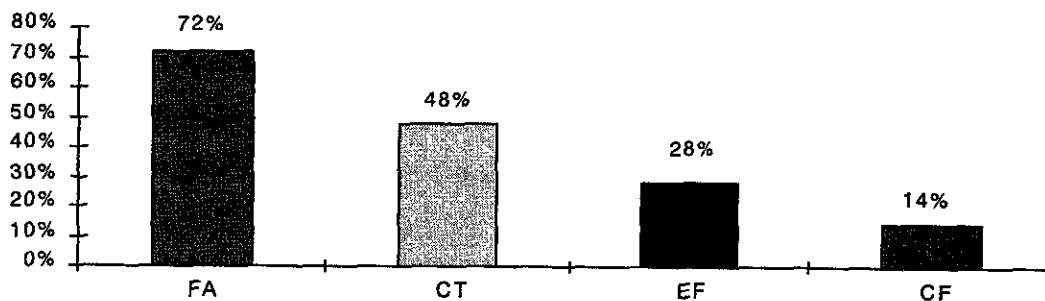


Fig 4. Rendimiento de indicadores microbiológicos de contaminación fecal

Las coliformes totales son el grupo de organismos que presentaron el segundo lugar en rendimiento, esto está relacionado con las características del grupo que cubre un espectro mayor de microorganismos, en cuyos resultados positivos se incluyen bacterias que se encuentran naturalmente en el ambiente, esto puede ser causa de una sobreestimación del grado de contaminación fecal. Los estreptococos fecales, con el tercer lugar en rendimiento, se encuentran tanto en el tracto intestinal humano como animal, este indicador muestra actividad y supervivencia por periodos de tiempo largos en condiciones ambientales tropicales (Handzel *et al.*, 1995) y bajo condiciones naturales existe una tendencia al recrecimiento (McJunkin, 1988). Al comparar los rendimientos de los 4 parámetros, las coliformes fecales son el parámetro que presentan el rendimiento más bajo (14%). Estos microorganismos son específicos del tracto intestinal de animales de sangre caliente, aunque se han reportado algunos casos en zonas tropicales en donde se encuentra *E. coli* en ambientes sin aparente contaminación fecal (Handzel *et al.*, 1995). Las coliformes fecales es el indicador más utilizado a nivel internacional de contaminación fecal para agua de consumo humano, sin embargo existen muchos reportes donde se cuestiona la utilidad de la este grupo como único parámetro como para la evaluación de agua para consumo humano pues se han encontrado tanto bacterias patógenas como virus entéricos en ausencia de coliformes fecales.

Los tres parámetros bacterianos presentan problemas de detección cuando los organismos son “viables pero no cultivables”. Debido al estrés los organismos están presentes en la muestra de agua pero no es posible cultivarlos en medio de cultivos estándar pero si se les da un tratamiento con medios nutritivos y sustancias buffer previo al cultivo en placa llegan a crecer.

Se evaluó la utilización de dos indicadores, tratando de incrementar el rendimiento de detección de muestras contaminadas y para identificar que organismos serían más útiles como pareja de indicadores. Los resultados se muestran en la Figura 5, donde se observa que colifagos-coliformes totales es el par con rendimiento más alto (82%), en segundo lugar colifagos-estreptococos fecales (72%) y colifagos-coliformes fecales (72%), seguidos por coliformes totales-estreptococos fecales (58%), coliformes fecales-coliformes totales (50%) y por último coliformes fecales-estreptococos fecales (30%). Los pares que mejor representan las condiciones de calidad del agua son colifagos en conjunto con otro grupo de microorganismos como son colifagos-coliformes totales, colifagos-estreptococos fecales y colifagos-coliformes fecales.

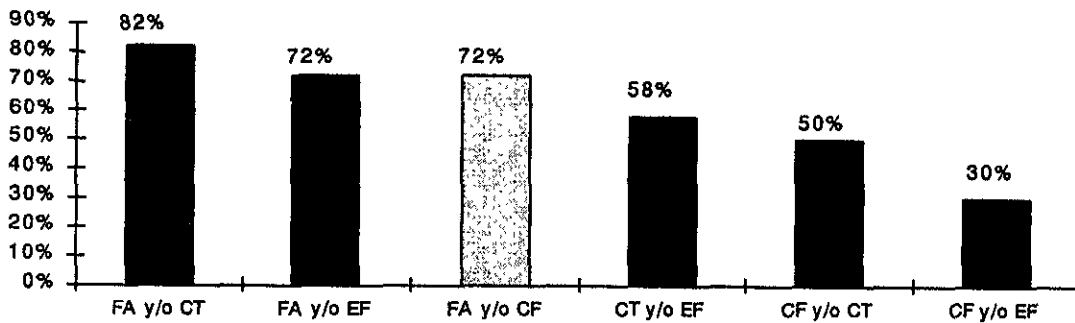


Figura 5. Rendimiento de parejas de indicadores microbiológicos de contaminación

Se organizaron los datos en tablas de contingencia de 2X2 con el objeto de obtener la exactitud, sensibilidad y especificidad por pares de pruebas microbiológicas (Siegel y Castellan, 1995). En el arreglo de 2x2 el parámetro ubicado en el eje de las ordenadas es el que predice los valores positivos y negativos del parámetro en el eje de las abscisas. Esto se hizo con el objeto de visualizar en que medida un parámetro puede predecir la presencia o ausencia de otro, lo que reflejaría su mayor capacidad como indicador. La concordancia es un valor que nos indica que tan similares son los dos parámetros en su capacidad de detección.

Se presenta la tabla de contingencia de coliformes fecales vs estreptococos fecales, que a pesar de ser la pareja que obtuvo el más bajo rendimiento (30%), son indicadores muy utilizados en la determinación de la calidad del agua. En la Tabla 3 se observa que tanto la presencia o ausencia de coliformes fecales predice la presencia o ausencia de estreptococos fecales. Los resultados entre coliformes fecales y estreptococos fecales, muestran una especificidad del 97% y una concordancia o exactitud del 82%. Este par presenta la concordancia más alta de todos los pares de indicadores sugiriendo que la información que aportan estos dos indicadores es similar, lo que coincide con los resultados obtenidos en la correlación de Spearman; siendo consistentes a dos pruebas estadísticas distintas. La tasa entre estos dos indicadores CF/EF ha sido utilizada ampliamente con la idea de distinguir contaminación humana cuando la tasa es >4 y animal cuando la tasa es <1 , sin embargo, se ha cuestionado el uso de esta tasa (APHA, 1992).

Tabla 3. Tabla de contingencia entre coliformes fecales-estreptococos fecales
ESTREPTOCOCOS FECALES

		P	A		
COLIFORMES FECALES	P	6	1	Sensibilidad=	43%
	A	8	35	Especificidad=	97%
				valor predictivo(+)	86%
				valor predictivo (-)	81%
				concordancia=	82%

En la Tabla 4 se presentan las tablas de contingencia para ver que tanto CT, CF y EF predicen la presencia o ausencia de colifagos. La tabla de coliformes totales vs colifagos presentó el rendimiento más alto para la detección conjunta de contaminación fecal, obtuvo una sensibilidad de 53% y una especificidad del 64%, la presencia de coliformes totales predice en un 79% la presencia de colifagos, además estos dos indicadores tienen una concordancia en sus datos del 56%.

El par coliformes fecales vs colifagos (Tabla 4) presenta una especificidad del 100% y el valor predictivo positivo es también del 100%, lo que quiere decir que siempre que se detectaron coliformes fecales se detectaron colifagos, la concordancia fue del 42%, la ausencia de coliformes fecales solo predice en un 33% la ausencia de colifagos. Se presentaron 29 casos de ausencia de coliformes fecales en presencia de fagos, causando una baja sensibilidad.

El par estreptococos fecales-colifagos (Tabla 4) presenta una especificidad del 100%, con un valor predictivo del 100%, lo que nos indica que siempre que hubo estreptococos fecales se observaron colifagos, la ausencia de estreptococos fecales solo predice la ausencia de colifagos en un 39% este par tuvo una concordancia de 56%. Se presentaron 22 casos de falsos negativos, ausencia de estreptococos fecales en presencia de fagos.

La ausencia de falsos positivos es decir que no existió presencia de CF y EF en ausencia de fagos, es lo que causa que en estos casos la especificidad y el valor predictivo sean del 100%. En el caso específico de CT se puede observar su presencia en ausencia de colifagos, lo cual se explica por la existencia de bacterias de origen ambiental y no indicadoras de contaminación fecal. El alto número de falsos negativos en las tablas de contingencia (presencia de fagos, ausencia de CT, CF y EF), se traduce en una baja especificidad, lo que en este caso se explica por que los colifagos tienen mayor supervivencia que los otros tres parámetros.

Tabla 4. Tabla de contingencia entre coliformes totales-colifagos

		COLIFAGOS					
		P	A				
COLIFORMES TOTALES	P	19	5	Sensibilidad= Especificidad=	53% 64%	valor predictivo(+)	79%
	A	17	9			valor predictivo(-) concordancia=	35% 56%
		COLIFAGOS					
		P	A				
COLIFORMES FECALES	P	7	0	Sensibilidad= Especificidad=	19% 100%	valor predictivo(+)	100%
	A	29	14			valor predictivo(-) concordancia=	33% 42%
		COLIFAGOS					
		P	A				
ESTREPTOCOCOS FECALES	P	14	0	Exactitud= Sensibilidad= Especificidad=	19% 39% 100%	valor predictivo(+)	100%
	A	22	14			valor predictivo(-) concordancia=	39% 56%

Los resultados de las tablas de contingencia indican que los colifagos son los indicadores más sensibles a la contaminación fecal, ya que fueron los organismos que se encontraron con más frecuencia; con o sin la presencia de otro u otros organismos.

Los tiempos de supervivencia de los indicadores utilizados en este estudio son diferentes, de manera general se puede decir que las bacterias tienen una supervivencia de entre dos a siete días, en tanto que los colifagos pueden sobrevivir más de 30 días (Snowdon y Cliver, 1989), debido a que son menos susceptibles a las mismas condiciones de estrés ambiental, por lo que presentan tiempos de supervivencia mayores. De acuerdo con los experimentos de supervivencia realizados en este trabajo, después de 45 días los colifagos siguen viables con disminución de solo 1 o 2 ordenes de magnitud de su concentración original (Fig 5, 6, y 7). Por tanto, debido a los diferentes tiempos de supervivencia las bacterias dan información de contaminación reciente y los colifagos aportan información de contaminación tanto antigua como reciente.

Los datos en las tablas de contingencia (Tabla 4) de colifagos en combinación con los otros tres indicadores dan información adicional sobre contaminación reciente y antigua. La suma de los datos de las celdas de presencia de colifago-presencia del otro indicador y los datos de la celda ausencia de colifagos-presencia del otro indicador, es el valor que representa la contaminación reciente. La celda de presencia de colifagos y ausencia del otro indicador muestra el número de ensayos con contaminación antigua. Restando estos dos datos se obtiene un valor que da una idea de la contaminación antigua (Tabla 5).

Tabla 5 Porcentajes correspondientes a contaminación antigua o reciente

Organismos Indicadores	Tipo de contaminación	Muestras (+) %
FA	antigua y reciente	72%
CT ó CF ó EF	reciente	58%
FA-(CT ó CF ó EF)	antigua	14%

En la Tabla 6 se muestran las determinaciones positivas para los cuatro indicadores microbiológicos que se determinaron en los cinco pozos piloto localizados en las tres zonas geológicas.

Tabla 6. Resultados microbiológicos positivos en 5 pozos piloto de la ZMCM (10 muestras por pozo, n= 50)

Pozo/Parámetro	Zona	Número de muestras positivas			
		CT	CF	EF	FA
UNIVERSIDAD	montaña	5	0	3	9
XOCHIMILCO	transición	8	1	3	7
IZTAPALAPA	transición	5	6	6	9
PERIFERICO	lacustre	4	0	2	5
XOTEPINGO	lacustre	2	0	0	6
Total		24	7	14	37

Para determinar si existía diferencia en el grado de contaminación fecal entre las tres zonas geológicas, los valores de la zona de transición y la zona de montaña no presentan diferencias por lo que se realizó una prueba de Ji cuadrada (χ^2). En la Tabla 7 se muestran los datos divididos en positivos y negativos de los colifagos, agrupando los valores de zona de transición y montaña y comparándolos con lo de zona lacustre. Según los análisis anteriores el grupo de los colifagos resultó ser el indicador más sensible de contaminación fecal. El valor de χ^2 fue de 14.4 que es $> \chi^2_{.95} = 3.84$ por lo que se observa que si existe diferencia entre los datos de estos dos grupos.

Tabla 7. Número de muestras positivas y negativas de colifagos en las tres zonas geológicas

Zona	Muestras (+)	%
Lacustre	11/20	55%
Transición y Montaña	25/30	83%

Estos resultados muestran la importancia de la ubicación de los pozos, los dos más contaminados se localizan en zona de transición, misma que se ha sugerido como la zona más vulnerable, éstos

resultados confirman la hipótesis. Los dos pozos menos contaminados corresponden a la zona lacustre en la que el acuitardo de arcilla ha sido considerado como una barrera de protección para el paso de contaminantes y microorganismos debido a la baja conductividad hidráulica. El pozo en la zona montañosa se localiza en una zona de basaltos fracturados que subyace una capa de tepetate y es relativamente impermeable.

Los resultados de los 10 muestreos se dividieron en datos de época de lluvias y época de secas y se muestran en la Tabla 8. Los muestreos 1,2 y 10 corresponden a lluvias (representando el 30% de las muestras) y 3,4,5,6,7,8 y 9 corresponden a secas (representando el 70% de las muestras). Se realizó una prueba de χ^2 para determinar si existía diferencia entre épocas. El valor de χ^2 fue de 0.45 que es $< \chi^2_{.95} = 3.84$ por lo que se observa que no existe diferencia significativa entre los datos de estos dos grupos.

Tabla 8. Número de muestras positivas por época del año

	Muestras (+)	%
Lluvias	14/20	70
Secas	15/20	75

Con el objetivo de evaluar la supervivencia de colifagos en las condiciones del sistema de acuíferos de la Ciudad de México se realizaron experimentos en microcosmos. Se utilizaron dos colifagos ATCC MS-2 y el PRD-1. Se evaluó la supervivencia de MS-2 durante 21 días en un microcosmos simulando las condiciones del acuífero: obscuridad, 14 °C de temperatura y agua subterránea de los 5 sitios de muestreo, los resultados de los promedios de tres experimentos se muestran en la Figura.5. Se graficó el logaritmo de UFP/mL (unidades formadoras de placa por mililitro) contra el tiempo en días que duraron los experimentos. La cuenta inicial fue de 9 Log UFP/mL para los cinco pozos, se observa que en el primer día cae la población en aproximadamente dos y tres grados logarítmicos, es decir de 6 a 7 Log UFP/mL para los 5 pozos, posteriormente la supervivencia del bacteriófago en el tiempo disminuyó lentamente, llegando al día 20 con diferencias de aproximadamente 1 grado logarítmico, entre 6 y 6.5 Log UFP/mL, siendo Iztapalapa el pozo que presentó la mayor disminución en la supervivencia, llegando hasta 4.5 Log UFP/mL.

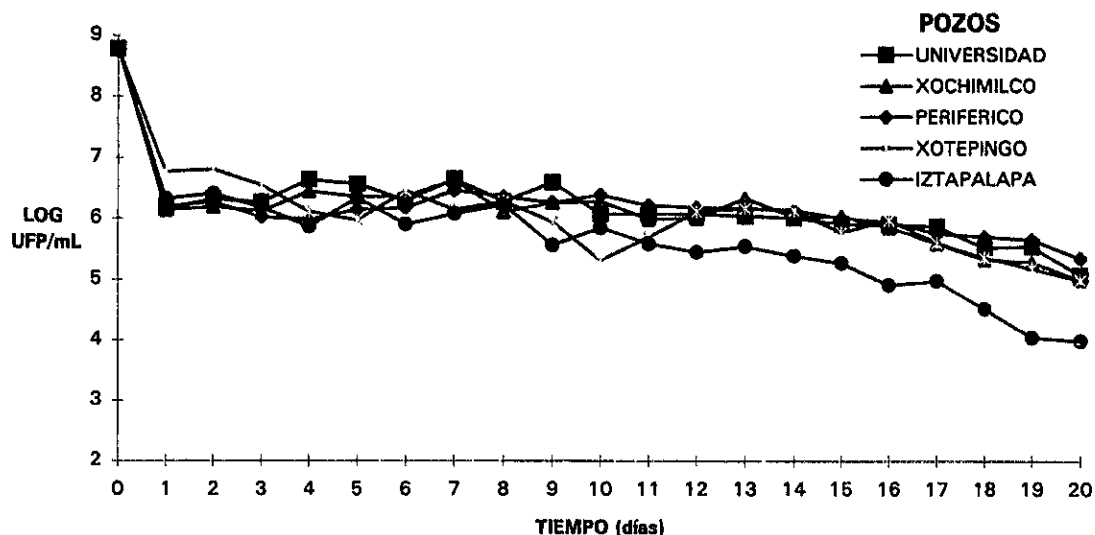


Figura 5. Curva de supervivencia del bacteriófago MS-2 en agua subterránea, promedio de 3 experimentos independientes.

En las figuras 6 y 7 se muestran las gráficas de dos experimentos de supervivencia de dos bacteriófagos MS-2 y PRD-1, en los que también se simularon las condiciones del acuífero con el agua de los cinco pozos piloto. En este caso se observó el comportamiento de los bacteriófagos por 45 días. La concentración inicial para ambos experimentos fue de 11 UFP/mL, se hicieron cuantificaciones diarias los primeros 5 días, posteriormente se tomaron muestras cada 5 días.

En la figura 6 se observa que entre los primeros dos días la población de MS-2 cae a 10 Log UFP/mL, para el quinto día la población disminuye un poco hasta 9.5 Log UFP/mL. El comportamiento de este bacteriófago en el tiempo (45 días) en los 5 pozos es con una tendencia descendente, con algunos incrementos parciales en ciertas cuantificaciones llegando a 9 Log UFP/mL.

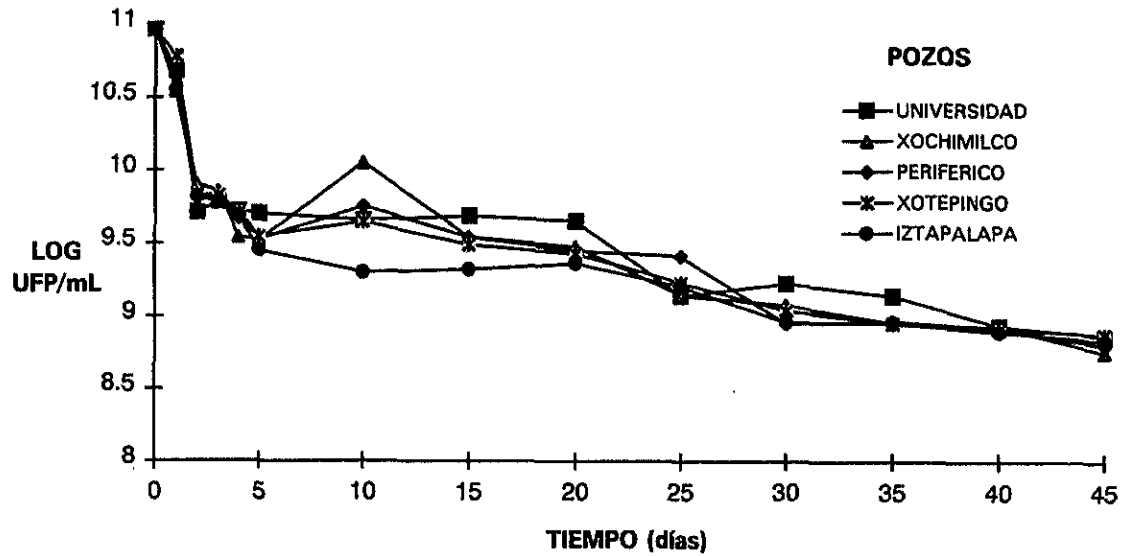


Figura 6. Curva de supervivencia del bacteriófago MS-2 en agua subterránea.

En la figura 7 se observa que entre los primeros dos días la población de PRD-1 cae a 9.8 Log UFP/mL, para el quinto día la población disminuye un poco hasta 9.5 Log UFP/mL. Este bacteriófago se comporta durante los 45 días de duración del experimento de manera similar con el agua de los 5 diferentes pozos, y casi sin variación en la supervivencia hasta el día 35, cayendo a 9 Log UFP/mL.

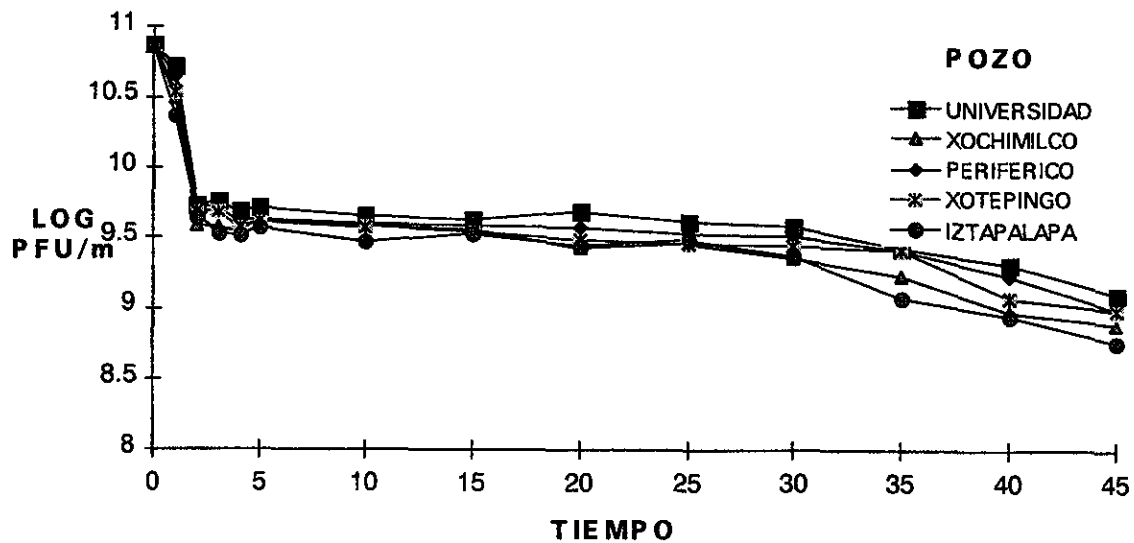


Figura 7. Curva de supervivencia del bacteriófago PRD-1 en agua subterránea.

CONCLUSIONES

La presencia de colifagos en agua muestra una buena correlación con la calidad del agua. Los colifagos cumplen con los criterios de un buen indicador de contaminación, están presentes cuando otro microorganismo está presente, incluyendo bacterias y virus, son más resistentes a condiciones ambientales adversas y a tratamientos de desinfección del agua. Además por sus períodos largos de supervivencia en el acuífero dan un margen de seguridad con respecto a la posible existencia de enterovirus.

La ausencia de enterovirus en las muestras de agua subterránea analizadas es insuficiente para generalizar que los enterovirus no llegan a contaminar el acuífero. La presencia de otros indicadores de contaminación fecal en agua subterránea, es una indicación de la vulnerabilidad de este recurso. La baja ocurrencia de los enterovirus en agua potable, y los altos costos del material y equipo para realizar detecciones de enterovirus, ha hecho difícil hacer una evaluación de su presencia y el riesgo que representan para la salud pública.

Las diferencias entre la calidad del agua proveniente de las diferentes zonas geológicas fue evidente. Los pozos de la zona lacustre fueron los menos contaminados y la zona de transición fue la que presentó el mayor grado de contaminación, en especial el pozo de Iztapalapa resultó ser el tuvo el mayor número de muestras positivas. Se presentó una diferencia significativa de la calidad del agua subterránea, entre la zona lacustre y el área que abarca la zona de transición y la montañosa.

No se observó en este estudio diferencia significativa entre la calidad del agua dependiendo de la época del año (lluvias y secas), quizás se tendría que hacer un monitoreo más intensivo para detectar la existencia de este patrón.

La detección de colifagos es un método sencillo y accesible desde el punto de vista técnico y económico, por lo que se recomienda como un parámetro básico para la determinación de calidad de agua. Este indicador debería incluirse en la norma oficial mexicana donde sólo se establecen límites permisibles para coliformes totales (2 UFC/100mL) que es un indicador poco específico de contaminación fecal y para coliformes fecales (0 UFC/100 mL), que resultó ser el parámetro con menor rendimiento en este estudio; sin que aparezca ningún tipo de indicador de presencia de enterovirus. Los colifagos resultan ser especialmente aplicables como indicadores de calidad de agua para el consumo doméstico por su alta sensibilidad y especificidad.

A pesar de que los colifagos han sido utilizados como indicadores de contaminación fecal y son propuestos como buenos indicadores de enterovirus resultando ser un método muy sensible, el uso de bacteriófagos como indicadores de calidad del agua para consumo humano tiene ciertas implicaciones. Los colifagos somáticos son los colifagos menos específicos llegando a infectar tanto bacterias de origen entéricos como de origen ambiental, lo que sería el caso también de las coliformes totales, llegando a sobrestimar la contaminación fecal. En el caso de los colifagos F+ uno de los principales puntos a resolver es el tipo de cepa bacteriana que se utiliza como hospedera y la estandarización del análisis en lo que se refiere a medios de cultivo y métodos para su concentración y detección. La investigación en la búsqueda del “indicador ideal” parece dirigirse al uso de bacteriófagos de *Bacteroides fragillis* como indicador específico de contaminación fecal humana prometiendo ser uno de los mejores indicadores para aseguramiento de la calidad de agua para consumo humano, sin embargo todavía no hay un consenso y permanece abierta la investigación y discusión en esta área.

El agua potable debe de estar libre de organismos patógenos, incluyendo los bacterias, virus y parásitos. Para realizar una evaluación de la calidad microbiológica del agua dentro de un programa de monitoreo continuo para consumo humano deben de realizarse los análisis de indicadores tradicionales de contaminación fecal en conjunto con la evaluación de colifagos. El uso de colifagos con uno o varios parámetros tradicionales, ofrecen en conjunto una evaluación práctica , confiable y accesible económicamente de la calidad tanto bacteriológica como virológica del agua.

Bibliografía

American Public Health Association, American Water Works, Water Pollution Control Federation. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, D.C. 18th Ed.

Araujo, R., J. Lasobras., A. Puig, F. Lucena y J. Jofre, 1996. Abundance of Bacteriophages of enteric bacteria in different freshwater environments. En: *Health-Related water Microbiology 1996*. IAWQ Specialist Group. Mallorca, Spain. pp 189.

Bitton, G. 1987. Fate of bacteriophages in water and wastewater treatment plants, p. 181-195. In S.M. Goyal, C.P. Gerba and G. Bitton (ed.), *Phage Ecology*. Wiley & Sons, New York.

Bosh, A., F. Lucena., J.M., Diez, R. Gajardo, M. Blasi y J. Jofre 1991. Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *Res. Technol. Manag.* 3:80-83.

Cabelli, V.J., R. Armon., y R. Duncanson, 1996. Comparison of survival of F male-specific bacteriophages and three bacterial indicators during wastewater chlorination and transport in estuarine waters. En: *Health-Related water Microbiology 1996*. IAWQ Specialist Group. Mallorca, Spain. pp 189.

Dan, F.S., Y.F. Ngeow., y C.W. Wang, 1996. Coliphage Field Kit. Malaysian Centre File: (3p-90-0026) *Technical Final Report*. University of Malaya, Department of Environment, Ministry of Health, Faculty of Medicine, University of Malaya

Debartolomeis, J., y Cabelli, V. J., 1991. Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol* 57:1301-1305

Donia, M.D. y Pana, A. 1996. *Analysis of concentration methods for bacteriophages*. En: *Health-Related water Microbiology 1996*. IAWQ Specialist Group. Mallorca, Spain. pp 189.

Dowd, S.E. and S.D. Pillai. 1997. Survival and transport of selected bacterial pathogens and indicators viruses under sandy aquifer conditions. *J. Environ. Sci. Health Part A* 32:2245-2258.

Dowd, S.E., S.D. Pillai, and K.W. Widmer. 1995. Adsorption, survival, and transport of selected microbial pathogens and indicators in aquifer material, poster 919. 87th Annual Meeting of the Soil Science Society of America. Soil Science Society of America, Madison Wis.

Dowd, S.E., M. Y. Corapcioglu, C. Munster, y S.D. Pillai. 1996. Laboratory studies and mathematical modeling of virus transport in groundwater. *General Meetin of the American Society for Microbiology 1996*. American Society for Microbiology, Washington, D.,C.

Ezcurra, E. y Mazari M. 1996. Are Mega-Cities Viable? A Cautionary Tale from Mexico City. *Environment*, 5. 38(1) January-February.

Evans, A.S., 1991. *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*. Third Edition. Plenum Medical Book Company.

Food & Drug Administration, 1997. *U.S. Center for Food Safety & Applied Nutrition Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*, Washington, D.C.

Funderberg, S.W. y C.A. Sorber 1985. Coliphages as indicators of enteric viruses in activated sludge. *Water Res* 19:547.

Furuse, K, 1987. Distribution of coliphages in the environment: general considerations . 87-124 En: S.M. Goyal, C.P. Gerba and G. Bitton (ed.), Phage Ecology. Wiley & Sons, New York.

Geldenhuis, J.C y P.D. Pretorius 1989. The occurrence of enteric viruses in polluted water, correlation to indicator organisms and factors influencing their numbers. *Water Sci. Technol.* 21:105-109.

Gerba, C. y G. Bitton, 1984. Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater En: G. Bitton, and C. P. Gerba (ed), Groundwater pollution microbiology. Wiley, New York, N.Y.

Gerba, C.P., y S.M. Goyal (ed.)1982. Methods in environmental virology. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

Gerba, C.P. 1987. Phages as indicators of fecal pollution. 197-209. En S.M. Goyal, C.P. Gerba and Bitton (ed), Phage Ecology. John Wiley & Sons. New York.

Godfre A.F., D. Kay, y M.D. Wyer 1997. Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *J. Appl. Microbiology Symposium Supplement.* 83:110s-119S

Grabow, W.O.K, C.S. Holtzhausen y C.J. De Villiers, 1993. Research on Bacteriophages as Indicators of Water Quality. WRC Report No 321/1/93. Water Research Commission, Pretoria. 147pp.

Grabow, W.O.K., T.E. Neubrech, C.S. Holtzhausen, y J. Jofre, 1995. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages: excretion by humans and animals. *Wat.Sci Tech.* 31(5-6):23-230.

Guy, M.D., J.D. McIver y M.J. Lewis, 1977. The removal of viruses by a pilot treatment plant. *Water Res.* 11:421-428.

Handzel, T.R., R.M.Green, C. Sanchez, H. Chung, y M.D. Sobsey, 1993. Improved specificity in detecting F-specific coliphages in environmental samples by suppression of somatic phages. *Wat.Sci.Tech.* 27(3-4):123-131.

Havelaar, A.H., y W.H. Hogeboom, 1984. A method for the detection of male specific bacteriophages in sewage. *J. Appl. Bacteriol.* 56:439-447.

Havelaar, A.H., K. Furuse,., y W.H. Hogeboom, 1986. Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. *J. Appl. Bact* 60:255-262

Havelaar, A.H. 1987. Bacteriophages as model organisms in water treatment. *Microbiol. Sci.* 4:362-364.

Heritage, J., Evans, E.G.V. y Killington, R.A. 1996. Introductory Microbiology. Cambridge University Press.

Hilton, M.C., y G. Stotzky, 1973. Use of coliphages as indicators of water pollution. *Can. J. Microbiol.* 19:747-751.

Hurst, C.J., C.P.Gerba y I. Cech.1980. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:1067-1079.

IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology. 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25:529-545.

ISO, 1993. Water quality - Detection and enumeration of F-specific RNA bacteriophages. ISO/DIS 10705-1. International Organization for Standardization, Geneva.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1990. *XI Censo General de Población y Vivienda*, 1990. Estado de México. Resultados Definitivos.

Jofre, J., A. Bosch, F. Lucena, R. Girones, y C. Tartera. 1986. Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. *Water Sci. Technol.* 18:167-173.

Kamiko, N., y Ohgaki, S., 1993. Multiplication characteristics of FRNA phage and its utility as an indicator for pathogenic viruses. *Wat. Sci. Tech.* 27(3-4):133-136.

Kasperson, J.X., R.W. Kasperson y B.L. Turner II 1995. Regions at Risk. Comparisons of Threatened Environments. Studies on Critical Environmental Regions. United Nations University Press. Tokyo, Japan.

Keswick, B.H. y C.P. Gerba. 1980. Viruses in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 14:1290-1297.

Keswick, B. H., C.P. Gerba, H.L. Dupont and J.B. Rose. 1984. Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1290-1294.

Ketratanakul, A., y S. Ohgaki, 1989. Indigenous coliphages and RNA-F specific coliphages associated with suspended solids in the activated sludge process. *Water Sci. Technol.* 21:73-78.

Kopecka, H., S. Dubrou, J. Prevot, J. Marechal, y J.M. Lopez-Pila. 1993. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription-polymerase chain reaction and hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1213-1219

Kott Y., N. Roze, S. Sperber, y N. Betzer 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Res.* 8:165-177

Kramer, M.S. y Feinstein, A. R., 1981. *Clinical biostatistics*. Clin. Pharmacol. Ther. January, 1981. Vol 29, No. 1 pp 111-123.

Lesser, J.M., Diaz, S.F y Posadas, G.D, 1990. Aspectos Geohidrológicos de la Ciudad de México. Ingeniería Hidráulica en México. Enero-Abril. 189 Pp.

Lesser y Asociados, S. A. de C. V. 1993. Perfiles de suelo para determinar el movimiento de contaminantes al agua subterránea. México, D.F. Dirección General de Construcción y Operación. Departamento del Distrito Federal.

Mara, D.D., y Oragui, J.I. 1983. Sorbitol fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bact* 55:349-353.

Marsal, R.J. y Mazari, M. 1969. El Subsuelo de la Ciudad de México- 2nd Ed., Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Mazari, M., y Mackay, M.D. 1993. Potential groundwater contamination by organic compounds in the Mexico City Metropolitan Area. *Environ. Sci. Technol.* 27(5):794-802.

- McJunkin, F.E. 1988. Agua y Salud Humana. Organización Panamericana de la Salud. Ed. Limusa. México, D.F.
- Morinigo, M.A., D. Wheeler, C. Berry, C. Jones, M.A. Muñoz, R. Cornax, y J.J. Borrego. 1992. Evaluation of different bacteriophage groups as faecal indicators in contaminated natural waters in southern England. *Water Res.* 26:267-271.
- Nasser, A.M., Y. Tehorech y B.B. Fattal. 1993. Comparative survival of *E. coli*, F+, HAV, and poliovirus 1 in wastewater and groundwater. *Water Sci. Technol.* 27:401-407.
- Nasser, A.M., y Blanc, R., 1996. Comparative survival of bacteriophages and model enteric viruses in saturated and unsaturated soils. En: Health-Related Water Microbiology 1996. IAWQ Specialist Group. Mallorca, Spain. pp 189.
- National Research Council. 1995. México City's Water Supply. National Academy Press, Washington, D.C.
- Payment, P., M. Trudel, y R. Plante 1985. Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1418-1428.
- Payment, P., E. Franco y J. Siemiatycki. 1993. Absence of relationship between health effects due to tap water consumption and drinking water quality parameters. *Water Sci. Technol.* 27:137-143
- Pontius, F.W. 1990. Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies. 4th Edition. American Water Works Association.
- Rao, V.C. y Melnick, J.L., 1986. Environmental Virology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Secretaría de Desarrollo Social e Instituto Nacional de Ecología. 1994. México. Informe de la Situación General en Materia de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente 1993-1994.
- Siegel S. y N.J. Castellan 1995. Estadística no Paramétrica. Ed. Trillas.
- Singh, A., A. Gordon, y McFeters 1992. Detection Methods for Waterborne Pathogens En: Environmental Microbiology. Mitchell, R. Division of applied Sciences, Harvard University, Cambridge, Massachusetts. WILEY-LISS.
- Skilton, H., y Wheeler D. 1988. Bacteriophage tracer experiments in groundwater. *J. Appl. Bacteriol.* 65:387-395.
- Snowdon, J. A. y Cliver D.O.. 1989. Coliphages as indicators of human enteric viruses in groundwater. *Crit. Rev. Environ. Control* 19:231-249.
- Sobsey, M.D., C.H. Dean, M.E. Knuckles y R.A. Wagner. 1980. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:92-101.
- Stetler R.E., 1984. Coliphages as indicators of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:668-670.

Tartera, C. y J. Jofre, 1987. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted water. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1632-1637.

Tree, J.S., Adams, M.R., y Lees, D.N. 1996. Virus inactivation during disinfection of sewage effluents by chlorination and ultraviolet irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a "viral indicator". En: *Health-Related water Microbiology 1996. IAWQ Specialist Group. Mallorca, Spain.* pp 189

van Olphen, M., de Bruin, H.A.M., Havelaar, A.H. y Schijven, J.F., 1991. The virological quality of recreational water in The Netherlands. *Wat. Sci. Tech.* 24(2):209-212.

Yates, M.V., C.P. Gerba, y L.M. Kelley. 1985 Virus persistence in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:778-781

Zohar, D., Z. Steinhauer, E. Artzi, and I. Ben Harim. 1984. Enteroviruses, coliphages, and indicator bacteria in various water systems. *Monogr. Virol.* 15:202-206.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Instituto de Ecología

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
Director General de
Administración Escolar
Presente.

Por la presente me permito informar a usted que en reunión ordinaria de Consejo Interno, celebrada el 11 de septiembre de 1998, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de Maestro en Ecología de la alumna: **BEATRIZ TORRES BERISTAIN** con No. de Cta. 9580011-4 y Exp. 30951050, con la tesis titulada: "Uso de indicadores biológicos de calidad de agua subterránea en una zona de la Ciudad de México", bajo la dirección de la: **DRA. MARISA MAZARI HIRIART**.

PRESIDENTE:	DR. JUAN JOSE CALVA MERCADO
SECRETARIO:	DRA. MARISA MAZARI HIRIART
VOCAL:	DRA. VALERIA SOUZA SALDIVAR
SUPLENTE:	DR. CARLOS A. ESLAVA CAMPOS
SUPLENTE:	DRA. SUSANA SAVAL BOHORQUEZ

Sin otro particular quedo de usted.

Atentamente.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., 27 de octubre de 1999

DRA. ANA BARAHONA ECHEVERRÍA
Coordinadora

c.c.p. Biol. Francisco Incera Ugalde.- Secretario de Asuntos Escolares. Presente.
c.c.p. Expediente del interesado

Health-Related Water Microbiology 1996

**Program,
Abstracts
and Authors**

**Organized by the
IAWQ Specialist Group
on Health-Related Water
Microbiology.**

6th - 10th October 1996. Mallorca, Spain

- A48: SIMULTANEOUS DETECTION OF TOTAL COLIFORMS AND *E.coli* WITH CHROMOCULT® COLIFORM AGAR - R Ossmer (Germany).
- A49: THE EFFECT OF CONSUMER WATER-USE PATTERNS ON THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF STORED DAILY DOMESTIC WATER VOLUMES - P Jagals*, WOK Grabow & E Williams (South Africa).
- A50: CALORIMETRIC EVALUATION OF ANTIMICROBIAL EFFICACY OF SILVER - S Okouchi*, R Murata, Y Ishihara, A Ikeda & N Maeda (Japan).
- A51: APPLICATION OF MICROBIOLOGICAL (CERTIFIED) REFERENCE MATERIALS - KA Mooijman*, JA van Dommelen & AH Havelaar (The Netherlands).
- A52: FROM DEVELOPMENT TO PRODUCTION OF MICROBIOLOGICAL REFERENCE MATERIALS - KA Mooijmann*, PH 't Veld & AH Havelaar (The Netherlands).
- A53: EVALUATION OF FLOW CYTOMETRY FOR THE MONITORING OF INFECTIOUS HUMAN ROTAVIRUS IN WATER - FX Abad*, A Bosch, J Comas & RM Pintó (Spain).
- A54: DO INDICATOR ORGANISMS PREDICT THE PRESENCE OF *Salmonella*? - F Polo, MJ Figueras*, I Inza, J Salas & J Guarro (Spain)
- A55: METABOLIC ACTIVITY IN *Yersinia enterocolitica* AFTER DISINFECTION WITH ULTRAVIOLET LIGHT - V Lund* & KS Ormerod (Norway).
- A56: EFFECTS OF WATER QUALITY ON CONCENTRATION OF HEPATITIS A VIRUS BY FILTER ADSORPTION-ELUTION METHODS - MD Sobsey* & SE Oglesbee (USA).
- A57: PRIVATE WATER SUPPLIES AND THE LOCAL AUTHORITY ROLE: RESULTS OF A UK NATIONAL SURVEY - KM Shepherd* & AP Wyn-Jones (UK).
- ➔ A58: DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ENTERIC VIRUS DETECTION IN HARDSHELL CLAMS (*Mercenaria mercenaria*) BY RT-PCR - E Sunén* & MD Sobsey (USA).
- A59: POTENTIAL FATE OF VIRUSES IN THE AQUIFER UNDERLYING MEXICO CITY - M Mazari-Hiriart*, B Torres-Beristain & SD Pillai (USA).
- A60: BACTERIOPHAGES AS INDICATORS OF ENTEROVIRUS OCCURRENCE IN GROUNDWATER - M Yates*, R Citek, M Abbaszadegan, O Bakhtari & R Wright (USA).

POTENTIAL FATE OF VIRUSES IN THE AQUIFER UNDERLYING MEXICO CITY

Marisa Mazari-Hiriart*, Beatriz Torres-Beristain* and Suresh D. Pillai **

* Centro de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-275, 04510 México, D.F., México

** Texas A&M University Research Center, 1380 A&M Circle, El Paso, Texas
79927, USA

ABSTRACT

Mexico City with a population over 18 million relies on an aquifer that underlies the metropolitan area for 70% of its water supply. A laboratory study was undertaken to evaluate the fate of viruses in this aquifer using the male specific coliphage (MS-2) as an indicator virus. Groundwater samples were obtained from five different locations of the metropolitan area and used in microcosms inoculated with the test phage. The results suggest that viruses could be expected to survive for long periods of time in the aquifer underlying Mexico City and theoretically pose a serious public health threat.

KEYWORDS

Phage, survival, groundwater, Mexico City

INTRODUCTION

Traditional methods using total coliform and fecal coliform, have indicated the presence of bacterial pathogens in the Mexico City aquifer (NRC-AIC, 1995). There is however a significant lack of information on the presence and fate of pathogenic viruses in water. Male specific bacteriophages can serve as indicators for the presence and survival of enteric viruses in source water (Yahya *et al.*, 1993). This approach can be extremely useful in developing countries where the technology for detecting enteric viruses may be lacking. In this study, the male specific coliphage MS-2, was used in laboratory microcosms to determine the potential fate of viruses in the aquifer underlying Mexico City.

MATERIALS AND METHODS

Groundwater samples were obtained between November 1995 and March 1996 from five different locations within the metropolitan area of Mexico City using 150-180 m pumping wells. Physico-chemical characterization was performed using APHA methods (APHA, 1992). 50 ml of sample were placed in polypropylene tubes (Falcon 2098) and inoculated with the test phage at 10^6 - 10^8 PFU/ml. The tubes were incubated in the dark for 20 days at 15°C (the aquifer temperature). At periodic intervals, aliquots were removed, and the phages enumerated using the host bacterium *E. coli* ATCC 15597. A total of three independent survival studies were performed and the survival patterns in the five different samples were compared.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 represents the survival of bacteriophage in groundwater from the five different locations. The values represent the average of the three independent studies. Even though there was a general decline of about 2 log units in all the samples, what is significant is that virus populations averaging approximately 10^6 PFU/ml were still viable even after 20 days. In only two samples (sites 4 and 5) did the virus exhibit a different survival pattern, probably as a result

of the unique chemical composition of the groundwater at this location (Table 1), which had significantly higher concentrations of Mg, Fe and Cl. Previous studies (Alvarez *et al.*, 1995) have shown that increasing cation concentrations can have a detrimental effect of virus survival and viability. The Mexican regulations concerning water quality are based on physico-chemical parameters and indicator bacteria (total and fecal coliforms). According to this study, the samples collected from the five different locations exceeded the regulatory limits in at least one parameter. The presence of specific chemical components and bacterial indicators above the permissible limits suggests the presence of aquifer contamination.

Overall, the results suggest that there is a strong potential for viruses to survive for extended periods of time within the aquifer thus increasing the public health risk. Due to public health importance of gastroenteritis and other infectious diseases it is strongly recommended that comprehensive bacterial and viral monitoring to identify the sources of aquifer contamination be initiated. This study emphasizes the need for public health agencies throughout Mexico to employ viral indicators in addition to the bacterial indicators to assess the health risks arising from microbial pathogens in water supplies.

REFERENCES

Alvarez, M., Aguilar, M., Macías, R., and Rodríguez, R. (1995). Abstract Q304. Ann. Meeting American Society for Microbiology. Washington, D.C.

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association. Washington, D.C. 18 th ed.: 1-44.

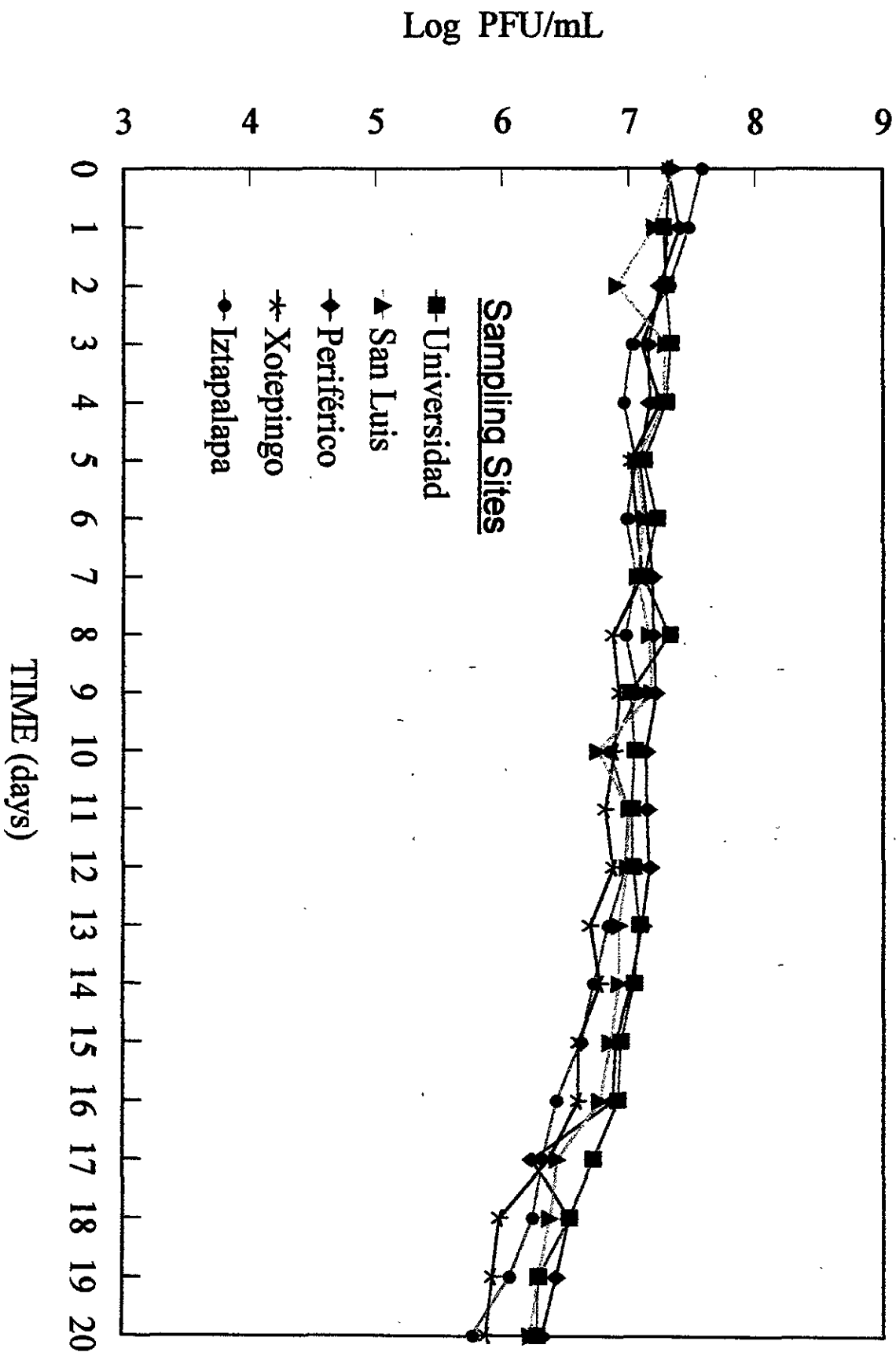
Diario Oficial de la Federación (1990). *Criterios Ecológicos de Calidad del Agua CE-CCA-001/89*. México: 26-36.

Diario Oficial de la Federación (1996). *Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización*. México 41-46.

National Research Council-Academia de la Investigación Científica (1995). *Mexico City's Water Supply*. National Academy Press. Washington, D.C.: 39-52.

Yahya, M.T., Galsomies, L., Gerba, C.P., and Bales, R.C. (1993). Survival of Bacteriophages MS-2 and PRD-1 in Ground Water. *Wat. Sci. Tech.* 27 (3-4): 409-412.

SURVIVAL OF MS-2 IN GROUNDWATER



This results are the average of three independent experiments

Table 1. Average physico-chemical (mg/l) and bacteriological (CFU/100 ml) characteristics of groundwater

PARAMETER/SITE	1	2	3	4	5
pH	6.82	7.17	7.51	7.13	7.10
T °C	13.75	10.25	15.95	15.50	19.0
N-NH ₃	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
N-NO ₂	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.002
N-NO ₃	1.231	1.359	0.441	0.957	0.019
P-PO ₄	0.134*	0.375*	0.074	0.147*	0.336*
Cl ⁻	26.5	12.0	27.5	82.5	209.5
Fe	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.288*
Mg	11.94	17.52	8.20	34.15	54.19
OCAM	3.5	4.5	2.3	10.3	11.9
Total coliforms	18*	60*	9*	41*	33*
Fecal coliforms	1*	2*	ND	2*	1*
Fecal streptococci	2	49	2	29	3

* parameters above permissible limits (DOF 1990, 1996)
 OCAM oxygen consumed in acid media
 ND not detected

Journal of Environmental Science and Health - Part A
TOXIC / HAZARDOUS SUBSTANCES & ENVIRONMENTAL ENGINEERING

Editor: **SHAHAMAT U. KHAN**
Department of Chemistry, MSN 3E2
George Mason University
4400 University Drive
Fairfax, Virginia 22030-4444
U.S.A.

Tel: (703) 993-1070
Fax: (703) 993-1055
e-mail: khansu@aol.com

May 12, 1999

Dr. Marisa Mazari-Hiriart
Instituto de Ecología
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-275, Ciudad Universitaria
Delegación Coyoacán
04510 México, D.F.
MEXICO

Dear Dr. Mazari-Hiriart:

RE: Bacterial and viral indicators of fecal pollution in Mexico city's southern aquifer
Ms.# A-250

We are pleased to advice you that the above noted manuscript has been accepted for publication in the *J. Environ. Sci. Health, Part A*. Please fill out the enclosed reprint order form and return it to the publisher as soon as possible. Thanking you.

Sincerely yours,



Shahamat U. Khan

BACTERIAL AND VIRAL INDICATORS OF FECAL POLLUTION IN MEXICO CITY'S SOUTHERN AQUIFER

Key Words: bacteria, virus, indicators, fecal pollution, Mexico City

M. Mazari-Hiriart¹, B. Torres-Beristain¹, E. Velázquez¹, J.J. Calva², and S.D. Pillai³

¹Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-275. Ciudad Universitaria. 04510 México, D.F. México.

²Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán. Vasco de Quiroga 15. Tlalpan. 14000 México, D.F. México.

³Environmental Science Program, Texas A&M University Research Center, El Paso, Texas 79927, USA.

ABSTRACT

Mexico City with a population of about 18 million people relies on groundwater to supply about 70% of its water needs. In order to understand the extent of microbial pathogen contamination of these reserves, a 10 month long monitoring study of the southern aquifer was undertaken. Groundwater samples were collected from five different locations and analyzed (100 mL) for total coliforms, fecal coliforms, and fecal streptococci. Larger volume samples (5 L) were collected and concentrated for quantitative and qualitative (presence/absence) determination of microorganisms including bacteriophages. Gene amplification (PCR) approaches were employed to screen for *Escherichia coli*/*Shigella* specific (*uid*) sequences. Laboratory microcosms were conducted to evaluate the potential survival of pathogenic viruses in the

groundwater using MS-2 and PRD-1 as model viruses. Coliphage as a single indicator, or in conjunction with fecal coliforms and fecal streptococci were found to have value as an indicator of fecal pollution in this geographical region. The results indicate that the southern aquifer underlying metropolitan Mexico City can pose a significant risk to public health when water is distributed and used without adequate disinfection. The pumping wells located in the transition and mountain areas indicated the presence of extensive microbial pathogen contamination. There was surprisingly, no difference between the dry and rainy seasons in terms of the presence of fecal pollution microbial indicators.

INTRODUCTION

Mexico City with a population of over 18 million documented inhabitants is located in what is referred to as the Basin of Mexico (Valverde and Aguilar, 1987). The Mexico City Metropolitan Area (MCMA) is considered to be one of the world's largest settlements occupying what was essentially a closed hydrological basin (Turner et al., 1995). The region, with its extensive urbanization and industrialization already faces a number of ecological problems, most important of which is the availability of drinking water (Aguilar et al., 1995; Turner et al., 1995). Water consumption in Mexico City is currently around 63 m³/s (GAVM, 1995), with about 70% of it being mined from groundwater reserves and around 30% from external surface water sources. Water is considered fundamental

resource challenge to this region which is expected to exceed 20 million inhabitants by the turn of the century (Ezcurra and Mazari-Hiriart, 1996).

The Basin of Mexico can be defined by three major geologic zones, the Lacustrine Zone, created by clay deposition of the old lake system, the Piedmont or Transition Zone, and the surrounding Mountain Area. The MCMA receives groundwater from four different aquifer systems, of which the southern aquifer represents the most important, based on extraction volumes (Mazari and Mackay, 1993).

Even though the surficial clay aquitard has been presumed to prevent downward migration of chemical and microbiological contaminants, conventional microbiological analyses (for total and fecal coliforms) performed in 1993 by governmental agencies, have indicated the presence of contamination in the eastern and northern aquifer (NRC, 1995). The National Research Council report is rather cryptic with no specific information about the total number of samples, and whether the samples were obtained from wells undergoing chlorine disinfection or not.

Drinking water quality in Mexico has been based, as in other regions of the world, for the most part on indicator organisms such as total coliforms and fecal coliforms since the 1950's (DOF, 1953; DOF, 1988; Urroz, 1973). Current regulations are still based on threshold limits of 2 CFU/100 mL of total coliforms and 0 CFU/100 mL of fecal coliforms (DOF, 1996). Only under emergency

situations such as during disease outbreaks, are specific pathogens investigated, under the joint directive of the Secretaría de Salud (SS) (Ministry of Health), the Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP) (Ministry of the Environment, Natural Resources and Fisheries), and the Comisión Nacional del Agua (CNA) (National Commission of Water).

The use of traditional indicator organisms such as total and fecal coliforms to set standards and regulations in a tropical region such as Mexico City can be problematic since they do not cover the large spectrum of infectious organisms that could potentially be present within such an environment, and moreover, because indicator organisms such as *E. coli* have been shown to occur indigenously in tropical waters (Hazen and Toranzos, 1990).

The overall objective of this study was to identify the microbiological quality of the groundwater in specific regions of the aquifer system underlying Mexico City. A 10 month monitoring study of the southern aquifer system was conducted during 1996 and 1997. The objectives of this study included an evaluation of the microbiological quality of the groundwater by employing contemporary screening methods including gene amplifications for bacterial pathogens, and the occurrence of male specific coliphages, along with traditional methods such as total and fecal coliform enumerations. The objective was to identify reliable and cost-effective methodologies that could be employed in developing countries. The project objectives were addressed by sampling five wells located within the southern

aquifer and which were located in different geologic zones. Additionally, laboratory microcosm studies using model viruses (MS-2 and PRD-1) were performed to determine the potential fate of enteric viruses in the groundwater of this region.

MATERIALS AND METHODS

Sampling Sites

Five extraction wells (sampling sites) were chosen within the MCMA which is located in the southwestern zone of the Basin of Mexico. The sampling sites were termed, *Xochimilco*, *Periférico*, *Xotepingo*, *Iztapalapa*, and *Universidad*. These wells were located in geologically distinct areas. *Periférico* and *Xotepingo* were in the lacustrine clay zone (characterized by low hydraulic conductivity, between 10^{-8} and 10^{-10} cm/s) (Marsal and Mazari, 1969), *Xochimilco* and *Iztapalapa* were in the transition zone (which is the primary recharge zone of the aquifer) (Mazari and Mackay, 1993), and *Universidad* located on the mountain area (Figure 1). All the sampling wells ranged between 100 and 180 m in depth.

Sampling

Ten monthly samplings were performed in each of the five wells between August 1996 and August 1997 (August, September, November (2), December (2), February, March, April and May). Five hundred mL samples were collected for the bacterial indicators (total coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci), while 1

L samples were collected for the bacteriophage analyses. Gene amplifications for the *uid* sequences were performed on separate 500 mL samples. During the course of the samplings, separate 5 L samples were collected (during three sampling events) to identify whether concentration protocols would enhance bacterial detection. All samplings were performed as per standard methods (APHA, 1992) using pre-existing sampling ports. Triplicate analyses were performed in all cases, except for PCR analyses. Samples were collected in sterilized plastic flasks. To prevent collecting water contained within the well tubing, the water was allowed to flow for up to 5 minutes prior to collecting the samples. All samples were collected prior to the chlorine disinfection point and care was taken to prevent splashing while collection. The water samples were placed on ice and transported to the laboratory where they were processed immediately.

Bacterial Enumeration

Standard membrane filtration procedures were employed for enumerating total and fecal coliforms, placing the membrane filter in a pad with liquid media (APHA, 1992). In order to improve the recovery of potentially non-culturable bacterial populations, the membrane filtration procedure was modified. We felt that collecting 5 L of groundwater for microbiological analyses was desirable in that it was theoretically more sensitive than using conventional 100 mL samples. Also since we employed a membrane filter to concentrate the sample our protocol has a greater probability of concentrating the targeted organisms (Mroz and Pillai,

1994). Moreover, after the resuspension of the filter, the sample was serially diluted and aliquots plated on media so as to obtain quantitative determination. Five liters of sample were filtered through a 0.45µm cellulose acetate membrane (Millipore MF type HA), and the filter resuspended for 10 min in a 10 mL of phosphate buffer (pH 8.6). A 1:1 dilution from this concentrate was prepared in 0.2% peptone broth (pH 7.2) and incubated at 37°C for 10 min prior to the analyses. A qualitative analyses was also performed, except that the concentrate was incubated at 37°C for 24 hours. M-Endo medium, M-FC Agar, and K-FS Agar were employed for detecting the presence of total coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci respectively. All media were purchased in a dehydrated form from Becton Dickinson de México (Estado de México, México). The plates were incubated as per standard protocols and enumerated after the recommended time frames (APHA, 1992). All the samples for the bacterial analyses were run by triplicate.

Coliphage Analysis

The membrane filtration method was an adaptation of a method originally recommended by Sobsey et al. (1990) (D. Battigelli, personal communication). Independent studies conducted in our laboratories verified the sensitivity for the approach (data not included). Briefly, 1 L of the groundwater was collected in a sterilized container and enough MgCl₂ was added to achieve a final concentration of 0.05 M. The sample was then filtered through a 0.45 µm porosity, 47 mm

cellulose acetate membrane (Millipore MF type HA). The filtration rate was in the range of 100 mL in 5 to 7 min. The coliphages if any were eluted off the membranes using 10 mL of 1.5% beef extract containing 0.05 M glycine (pH 9.0). The pH was adjusted to neutrality and aliquots of this concentrate was used in conventional double agar overlay method. The host bacterium employed in the screening for male specific bacteriophages was *E. coli* ATCC 15597. The plates were incubated at 37°C for 24 hours prior to the enumeration of the plaques.

PCR Amplifications

Aliquots of the groundwater samples were also tested using gene amplification methodologies for the presence/absence of specific gene sequences indicative for the presence of *E. coli/Shigella* spp. For the detection of *E. coli/Shigella* spp., specific sequences, primers which target the *uid* gene sequences (Bej et al., 1991a) were employed.

Sample preparation: In order to obtain a starting template suitable for gene amplifications for the screening for the presence of *uid* gene sequences, 50 mL of the groundwater sample was filtered through Durapore membranes (Millipore 0.45 µm) (Bej et al., 1991b). The membranes were resuspended in 600 µL of sterilized distilled water, heated in a 65°C water bath for 1 h, centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and 20 µL sample was placed in reaction tube containing the other reaction components. Sterile distilled water was used as a negative control during the

filtration process. Groundwater samples spiked with *E. coli* K12 was used as a positive control.

Amplification conditions: PCR amplification was performed in a MJ Research thermal cycler (model INC PTC - 100), and using the Gene Amp kit containing native Taq polymerase (Gibco, BRL). The PCR components included 1X PCR amplification buffer (10X contained 500mM KCl, 200mM Tris hydrochloride (pH 8.4, 1.5mM MgCl₂), 10mM of deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) mix (final concentration ratio of 200 mM each dNTP), 0.5μM of each of the primers, and 2.5 units of Tag DNA polymerase 5 U/μL was added to each tube, sterile mineral oil was added at the top of the sample. The template nucleic acids were initially denatured at 95°C for 5 min. Then a total of 30 PCR cycles were run under the following conditions: denaturation at 94°C for 1.5 min, primer annealing at 55°C for 1 min and DNA extension at 72°C for 1.5 min followed by a 5 min incubation at 72°C (Bej et al., 1990). The primers were designed to amplify a 147 bp fragment of the *uid* gene locus located between positions 754 and 900. The oligonucleotide sequence of the primers were as follows: Primer # 1: 5'AAA ACG GCA AGA AAA AGC AG, and Primer # 2: 5'ACG CGT GGT TAC AGT CTT GCG (Bej et al., 1991a).

The PCR products were detected by horizontal agarose (2%) gel electrophoresis run at 3.2 V/cm for approximately an hour. The gels were stained

in 0.5 mg/mL ethidium bromide solution, and photographed using a Fotodyne transilluminator and Polaroid film.

Prior to performing the gene amplifications on the groundwater samples, sensitivity trials were performed to delineate the detection sensitivity of the primers that were employing. For this purpose, a serial dilution of *E. coli* (K12) cells in 0.85% saline solution was performed. Aliquots of the various dilutions were employed in gene amplification reactions as mentioned above. Single water samples were run for the PCR analyses.

Chemical Analyses

The groundwater samples were characterized for various physico-chemical parameters. These included, temperature, pH, Cl, N-NO₃, Fe, Mn, total alkalinity, conductivity, SO₄, and Na. The specific analysis that was employed was based on standard methodologies (APHA, 1992).

Data Analysis

Both quantitative and qualitative non parametric methods were employed (Kramer and Feinstein, 1981; Siegel and Castellan, 1995). A single measurement of the number of CFU/mL for each sample was analyzed and consisted in the median number of the three values, from triplicates of a single sample. Correlation between the different microbiological indicators was assessed by the Spearman's rank correlation (r_s). Yield of each of the microbiological indicators was expressed as the proportion of positive samples. In the qualitative approach samples were dichotomously classified as with

(positive samples) or without (negative sample) the presence of the microbiological indicator, based on the presence of at least one CFU/mL (in at least one triplicate), or the absence of any CFU/mL in all triplicates. 2X2 contingency tables were performed to obtain information about the precision, sensitivity, specificity for each pair of microbiological indicators, as well as generate predictive values. Chi square tests were performed to compare the relationships existing between the occurrence data, the aquifer hydrogeology and the season (dry versus rainy). Computer software such as Microsoft Excel 4.0 and the SPSS 5.0 were employed for these analyses.

RESULTS AND DISCUSSION

The levels of total coliforms, fecal coliforms, fecal streptococci, *E. coli/Shigella*, and F⁺ coliphages in the periodic sampling are shown in Table 1. The correlation among four indicators when considering the number of CFU/mL obtained through two different methods in the same sample, in fifty different samples was tested. According to the values suggested by Kramer and Feinstein (1981) a significant correlation $r_s = .74$, $P < .001$ between fecal coliforms and fecal streptococci was observed. There was a moderate correlation between the other indicators (R_s values between .42 and .58, $P < .001$).

As part of a qualitative analysis, the yield of the identification of fecal pollution by individual indicator (Figure 2) was calculated based on data from 50 samples. Yield defined as the percentage of positive samples according to each

TABLE 1

Mean values and standard deviation of total coliforms, fecal coliforms, *F. streptococci*, PCR *E. coli*/*Shigella*, and F^r coliphages for 10 sampling events of groundwater (100 mL) in Mexico City.

SITE	Total coliforms	Fecal coliforms	<i>F. streptococci</i>	PCR <i>E. coli</i> / <i>Shigella</i>	F ^r coliphages
	Mean (SD)	Mean (SD)	Mean (SD)		Mean (SD)
<i>Universidad</i>	0.7 (1.2)	0	0	0	0.3 (0.6)
	0	0	0.3 (0.6)	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0.3 (0.6)
	4.7 (2.1)	0	0.3 (0.6)	-	3.3 (1.5)
	0.3 (0.6)	0	0	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	-	0.3 (0.6)
	0.3 (0.6)	0	0	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0
	0.3 (0.6)	0	0	0	0.3 (0.6)
	0	0	1.0 (0)	0	1.3 (1.2)
<i>Xotepingo</i>	1.0 (2.0)	0	0	0	0
	0	0	0	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0
	0	0	0	-	0
	2.0 (2.0)	0	0	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	-	0.3 (0.6)
	0	0	0	+	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0.3 (0.6)
0	0	0	0	0	
<i>Xochimilco</i>	3.0 (5.1)	2.6 (1.2)	4.3 (2.5)	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0.3 (0.6)
	0.3 (0.6)	0	0	-	6.3 (2.1)
	24.6 (12.5)	0	0	0	0.3 (0.6)
	22.3 (15.0)	0	0	-	0
	0.7 (1.2)	0	1.6 (0.6)	+	0.7(0.6)
	9.0 (3.0)	0	0	+	0
	0.3 (0.6)	0	0	0	0
4.3 (0.6)	0	1.6 (1.2)	+	2.3 (0.6)	
<i>Iztapalapa</i>	7.7 (1.2)	3.7 (1.5)	2.3 (0.6)	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0.3 (0.6)
	16.0 (3.6)	7.0 (2.7)	2.0 (1.0)	-	14.3 (4.9)
	0	2.0 (3.5)	2.3 (0.6)	0	0.3 (0.6)
	38.3 (17.9)	0.7 (0.6)	0	-	0.3 (0.6)
	4.3(1.5)	0.6 (1.2)	2.0 (1.0)	0	3.3 (0.6)
	27.0 (21.0)	2.7 (1.2)	3.3 (1.2)	0	5.3 (3.5)
	0	0	0	0	0
0	0	2.3 (0.6)	0	3.3 (3.5)	
<i>Periférico</i>	1.3 (0.6)	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0.3 (0.6)	0	0	-	1.7 (1.5)
	1.0 (1.0)	0	1.0 (0)	0	0.3 (0.6)
	2.0 (1.0)	0	0	-	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0
	0	0	2.0 (1.0)	0	0.3 (0.6)
	0	0	0	0	0.3 (0.6)
0	0	0	+	0	

indicator. In the case of individual indicators, male specific coliphages had the highest yield (72%), followed by total coliforms (48%), fecal streptococci (28%), and fecal coliforms (14%). It is possible that the host bacterial strain (*E. coli* ATCC 15597) used in these studies detected a certain number of somatic bacteriophages in addition to male specific bacteriophages (Havelaar and Hogeboom, 1984). A significant difference ($P=0.00001$) between the four indicators was found. These results are in agreement with recent reports suggesting that male specific coliphages have certain characteristics that make them suitable as fecal pollution indicators (Havelaar et al., 1993; Sobsey et al., 1990).

It is interesting that fecal coliforms yield reached only 14%, yet, their levels in those positive samples were directly correlated with the male specific coliphages (Figure 2). These results suggest that just the presence of male specific bacteriophages is more sensitive than fecal coliforms as an indicator of fecal pollution, yet in situations where fecal coliforms were present, their levels may strongly correlate with that of bacteriophages.

Coliphage represents one of the more sensitive indicators of fecal contamination. Since the total coliform group includes organisms naturally occurring in the environment, this group could be overestimating the fecal contamination level. On the other hand, fecal coliforms are more specific of intestinal tract of warm blooded animals, although some cases of the presence of *E. coli* have been reported in water in tropical areas without apparent fecal pollution

(Hazen and Toranzos, 1990). Fecal streptococci is of both human and animal origin, this indicator shows longer survival periods in tropical areas (Hazen and Toranzos, 1990), and under natural conditions there is bacterial regrowth, characteristic that complicate the use of this group as an indicator (McJunkin, 1988).

Since the occurrence of the various groups of indicator and their respective levels did not show any strong relationships, we compared the applicability of using a pair of indicator groups to determine water quality based on their occurrence (positive/negative) (Figure 3). The coliphage-total coliforms represented the best pair (82%), followed by the coliphage-fecal streptococci (72%), and coliphage-fecal coliforms (72%). The fecal coliform-fecal streptococci accounted for only 30% of the samples. Since coliphages are becoming recognized as valuable water quality indicators, any pair that includes the male specific coliphages appears to show promise as a suitable water quality index. The coliphages and fecal streptococci showed a significant difference when compared with the other microbial indicators. According to our results gene amplifications did not appear to improve the sensitivity of detection of *E.coli/Shigella*. This supports our previous statement that in situations where culturable fecal coliforms were present, the numbers detectable on media are representative of the actual numbers being present in that sample. This further suggests that in the groundwater system in our study, the occurrence of non-culturable *E. coli* is low.

The comparisons of microbial indicators were further investigated to determine whether the indicators could be organized in 2X2 contingency tables (Table 2) so that their predictive values could be ascertained. i.e. determine how much a parameter could be predictor of the other (Siegel and Castellan, 1995). Fecal coliforms showed the best accuracy to predict fecal streptococci, which is consistent with the Spearman's rank correlation test. The rate Fecal coliforms/*Fecal streptococci* has been widely used with the idea of distinguishing human contamination when the rate is >4, and animal contamination when <1. Nevertheless its use has been questioned (APHA, 1992; Howell et al., 1995).

TABLE 2
Contingency Table for the Microbiological Indicators.

PREDICTOR	PREDICTED VARIABLE	SENSITIVITY	SPECIFICITY	PREDICTIVE VALUE +	PREDICTIVE VALUE -	ACCURACY
Fecal coliforms	<i>F. streptococci</i>	43	97	86	81	82
F ⁺ coliphage	Fecal coliforms	100	33	19	100	42
F ⁺ coliphage	<i>F. streptococci</i>	100	39	39	100	56
F ⁺ coliphage	Total coliforms	79	35	53	6	56

In contrast with these results, the correlation between the presence of bacteriophage and the traditional indicators (total coliforms and fecal coliforms) was regular. Although the absence of bacteriophage in all the samples predicted the absence of fecal coliforms and fecal streptococci (Predictive Value -), there were various samples in which bacteriophage were found and yet no fecal coliforms and/or fecal streptococci were detected, meaning false positive results or

a low specificity. A possible explanation of these results is that bacteriophage may represent an accurate indicator of fecal contamination and there are instances in which due to their liability bacteria are not found.

The additional samples in which 5 liter samples were concentrated showed no improvement on the recovery of potentially non-culturable bacterial populations.

The contingency table results demonstrate that the coliphages are the most sensitive indicators of fecal contamination based on the monitoring that was performed in groundwater in this study. A number of studies have shown that viruses generally tend to persist for longer periods of time than bacterial pathogens and exhibit significant differences in persistence in soils and groundwater as compared to bacterial cells (Dowd and Pillai, 1997; Snowdon and Cliver, 1989; Yahya et al., 1993).

Of the five wells that were intensively monitored as part of this study, the *Iztapalapa* well had the highest number of positive (indicator) samples followed by *Xochimilco*, *Universidad*, *Periférico* and *Xotepingo* (Table 1). It is noteworthy that the wells located in the transition zone had the largest number of positive samples, where most of the recharge to the aquifer system occurs. These results support the hypothesis that the transition zone, with hydraulic conductivities between 10^{-4} and 10^{-6} cm/s (Marsal and Mazari, 1969), is the most vulnerable to groundwater contamination. The least contaminated sites (*Periférico* and

Xotepingo) are located on lacustrine zones, which have been characterized as with lower hydraulic conductivity, between 10^{-8} and 10^{-10} cm/s (Marsal and Mazari, 1969).

When the microbial indicator data were analyzed by Chi-squared test, to identify any differences in the contamination levels based on the three different geologic zones, there was no difference between the transition and the mountain zones ($P=0.22$), however, there was a significant difference ($P<.00005$) between these zones and the lacustrine area. These results suggest that based on the microbiological analyses, a clear difference can be observed in the vulnerability of groundwater based on the geologic zone where contamination sources exist. When a U-Mann-Whitney test was performed to identify any differences in indicator levels in the aquifer between the rainy and dry season, there did not appear to be any significant difference ($P=0.73$). These results do not agree with the epidemiological studies which show a markedly seasonal diarrheal disease trend in the Mexican population. Bacterial diseases have been reported between April and July specifically associated to enterotoxigenic *E. coli* (López-Vidal et al., 1990), *Shigella* infections between May and September (Guerrero et al., 1994), both during the rainy season. Viral diarrheal diseases specifically caused by rotavirus have been reported with a peak that began each fall in Mexico, from September to December at the end of the rainy season and beginning of the dry season, with few cases during May and June (LeBaron et al., 1990). This

difference could be attributed to the higher incidences of surface water associated disease outbreaks rather than groundwater associated disease incidents.

Based on the average numbers of total coliforms and fecal coliforms, which are the two parameters considered in the Mexican drinking water standards (DOF, 1996) obtained during the ten sampling events, the water quality at these major pumping wells exceeded these limits several times (from 3 to 7 times) in all locations. It thus appears that whenever groundwater is pumped and distributed from the southern aquifer without adequate chlorination, there is a strong likelihood of microbial pathogens being present in the distribution water.

Enteric viruses appear to have the potential to persist for extended periods of time in groundwater in this region. These conclusions are based on the survival patterns of two indicator coliphage MS-2 and PRD-1, which exhibited survival at the levels of approximately 10^6 - 10^7 PFU/mL (Figure 4) and 10^9 - 10^{10} PFU/mL (Figures 5 and 6). There did not appear to be any significant difference in the survival of these coliphage in laboratory studies conducted with groundwater collected from the five different sampling locations. The persistence of these viruses could be attributed to the groundwater chemistry (Table 3). Studies performed using a high cation content groundwater from a transboundary aquifer along the US-Mexico border showed that both MS-2 and PRD-1 were extremely short-lived (Dowd and Pillai, 1997). These results suggest that viral pathogens do have the potential to persist for long periods of time in groundwater in this region. These speculations are supported by the monitoring

study which showed that male specific coliphages were present in almost 72% of the samples. The laboratory microcosm studies suggest that viruses tend to persist for extended periods of time in the groundwater. This ability to persist could be responsible for the detection of male specific coliphages in the environmental samples. It could also account for the results which demonstrate that the use of male specific coliphages as one of the indicators in a dual-indicator system would be ideal for screening groundwater for microbial pathogen contamination in these geographical regions.

TABLE 3
Physicochemical characteristics (mg/L) of groundwater from the Mexico City Metropolitan Area.

Parameter/Well	Universidad		Xochimilco		Periférico		Xotepingo		Iztapalapa		DOF 1996
	R	D	R	D	R	D	R	D	R	D	
Temperature (°C)	13.40	13.50	10.40	10.50	16.90	16.90	16.40	15.40	18.10	17.30	-
pH (units)	7.50	7.30	6.86	7.30	8.00	8.00	7.90	7.65	7.35	8.00	6.5-8.5
Cl ⁻	33.00	27.00	12.00	10.00	32.00	29.00	104.00	94.00	215.00	219.00	250.00
N-NO ₃	0.248	2.916	0.187	6.715	0.017	0.444	0.032	2.284	0.002	0.049	10.00
Fe ⁺²	< 0.02	< 0.05	< 0.02	< 0.05	< 0.02	< 0.05	< 0.02	0.08	0.354	0.379	0.30
Mn ⁺²	< 0.01	0.020	< 0.01	< 0.10	< 0.01	< 0.10	< 0.01	< 0.10	0.845	0.555	0.15
Total Alkalinity	101.00	100.00	87.00	77.00	154.00	149.00	352.00	299.00	619.00	641.00	-
Conductivity	371	357	307	252	393	456	1018	960	1675	1596	-
SO ₄ ⁻²	33.00	27.00	51.00	21.00	37.00	12.00	56.00	59.00	5.00	15.00	400.00
Na ⁺	28.37	-	19.14	-	39.37	-	116.00	-	217.00	-	200.00

R = August, 1996

D = March, 1997

CONCLUSIONS

The results suggest that the major aquifer underlying Mexico City and which supplies a large percentage of drinking water shows the presence of viral pathogen indicators as well as the presence of fecal associated bacterial populations. The regulatory agencies might be well advised to incorporate male specific coliphage analyses into the set of tests they conduct to screen for pathogen contaminated water resources. Our results suggest that male specific coliphages along with fecal streptococci can serve as a good pair of fecal contamination indicators that are relatively inexpensive to analyze. The ability of developing countries to implement cost-effective, but reliable water quality monitoring methods is paramount to preventing waterborne disease outbreaks.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Jasminka Milcic, Sophia Martínez, Kenneth Widmer, Lourdes Lloret, and Rosario Ruiz Esparza for their help in different phases of the lab work. Dr. Elena Alvarez-Bullya is acknowledged for providing the facilities to perform the molecular determinations at the Molecular Genetics and Evolution Laboratory at the Institute of Ecology, Universidad Nacional Autónoma de México (IEUNAM). Marisa Mazari-Hiriart acknowledges the generous financial support to the Mexican Council for Science and Technology (CONACYT), and the Programa Universitario de

Medio Ambiente, UNAM. Beatriz Torres-Beristain acknowledges CONACYT for the graduate student scholarship.

REFERENCES

- Aguilar, G.A., Ezcurra, E., García, T., Mazari-Hiriart, M. and Pisanty, I. Regions at Risk. Comparisons of threatened environments. Ed. J.X. Kasperson, R.E. Kasperson, and B.L. Turner, United Nations University Press, Tokyo, Japan (1995), pp. 304-366.
- American Public Health Association, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 18th Edn. Washington, D.C. (1992).
- Bej, A.K., DiCesare, J.L., Haff, L. and Atlas, R.M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1013-1017 (1991a).
- Bej, A.K., Mahbubani, M.H., DiCesare, J.L. and Atlas, R.M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3529-3534 (1991b).
- Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L. and Atlas, R.M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 307-314 (1990).
- Diario Oficial de la Federación. Julio 2, 1953, 6-8 (1953).
- Diario Oficial de la Federación. Enero 18, 1988, 26-28 (1988).
- Diario Oficial de la Federación. Enero 18, 1996, 41-46 (1996).
- Dowd, S.E. and Pillai, S.D., *J. Env. Sci. Health*, 32, 2245-2258 (1997).
- Ezcurra, E. and Mazari-Hiriart, M., *Environment*, 38, 5-35 (1996).
- Gerencia de Aguas del Valle de México. Unpublished Internal Report. México, D.F. (1995).
- Guerrero, L., Calva, J.J., Morrow, A.L., Velázquez, R., Tuz-Dzib, F., López-Vidal, Y., Ortega, H., Arroyo, H., Cleary, T.G., Pickering, L.K.J. and Ruiz-Palacios, G., *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 13, 597-602 (1994).
- Havelaar, A.H. and Hogeboom, W.M., *J. Appl. Bacteriology*, 56, 439-447 (1984).

- Havelaar, A.H., Van Olphen, M. and Drost, Y.C., *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2956-2962 (1993).
- Hazen, T.C. and Toranzos, G.A. "Drinking Water Microbiology" Ed. G.A. McFeters Springer Verlag, New York (1990), pp. 32-53.
- Howell, J.M., Coyne, M.S. and Cornelius, P., *J. Environ. Quality*, 24, 411-419 (1995).
- Kramer, M.S. and Feinstein, A.R., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 29, 111-123 (1981).
- LeBaron, C.W., Lew, J., Glass, R.I., Weber, J.M. and Ruiz Palacio, G., *JAMA*, 264, 983-988 (1990).
- López-Vidal, Y., Calva, J.J., Trujillo, A., Ponce de León, A., Ramos, A., Svennerholm, A.M. and Ruiz-Palacios, G., *J. Infectious Diseases*, 162, 442-447 (1990).
- Marsal, R.J. and Mazari, M. "El Subsuelo de la Ciudad de México". 2nd Edn., Universidad Nacional Autónoma de México, México (1969), pp. 116-147.
- Mazari, M. and Mackay, D.M., *Environ. Sci. Technol.*, 27, 794-802 (1993).
- McJunkin, F.E. "Agua y Salud Humana". Ed. Limusa (1988), 231 pp.
- Mroz, R.C. and Pillai, S.D., *J. Southern Medical Assoc.*, 87, 1214-1217 (1994).
- National Research Council "Mexico City's Water Supply", National Academy Press, Washington, D.C. (1995), 107 pp.
- Siegel, S. and Castellan, N.J. "Estadística no Paramétrica. Aplicada a las Ciencias de la Conducta" 2nd Edn., Ed. Trillas, México (1995): 437 pp.
- Snowdon, J.A. and Cliver, O.D., *Critical Reviews in Environmental Control*, 19, 231-248 (1989).
- Sobsey, M.D., Schwab, K.J. and Handzel, R.T., *Res. & Tech.*, 9, 52-59 (1990).
- Turner, B.L., Kasperson, J.X., Kasperson, R.E., Dow, K. and Meyer, W.B. "Regions at Risk. Comparisons of threatened environments", Ed. J.X. Kasperson, R.E., Kasperson and B.L. Turner, United Nations University Press, Tokyo, Japan (1995), pp. 519-586.
- Urroz, J.E., Secretaría de Recursos Hídricos, México (1973), 28 pp.

Valverde, C. and Aguilar, A.G., Atlas de la Ciudad de México, Ed. El Colegio de México-Departamento del Distrito Federal, México (1987), pp. 19-22.

Yahya, M.T., Galsomies, L., Gerba, C.P. and Bales, R.C., Wat. Sci. Tech, 27, 409-412 (1993).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

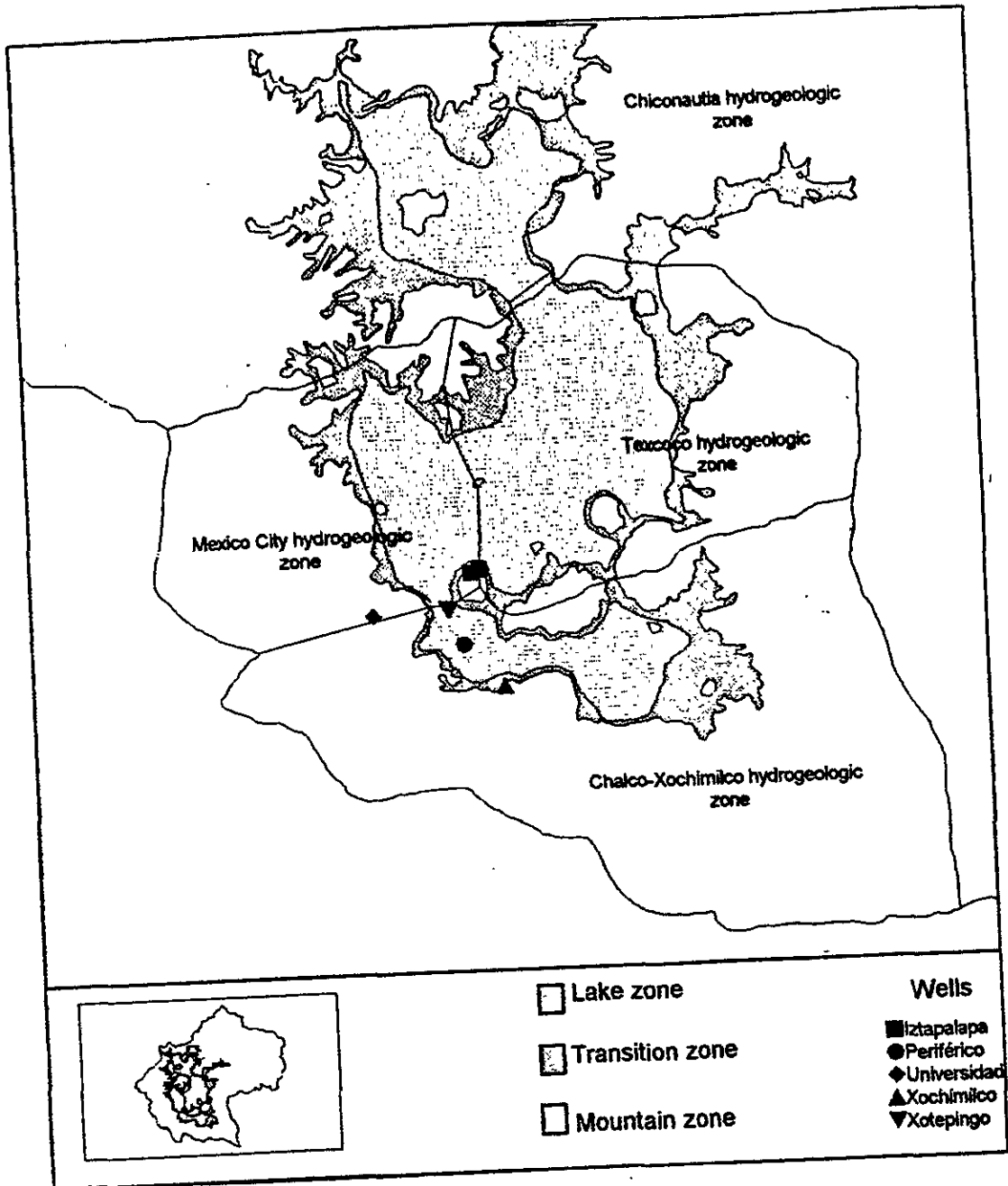


FIGURE 1 Sampling wells in the hydrogeologic zones of the Mexico City Metropolitan Area.

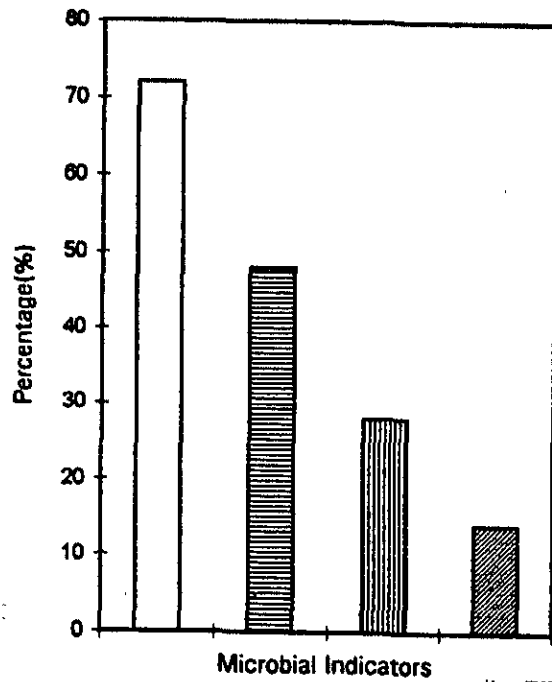






FIGURE 2 Comparative yield of four microbiological indicators of fecal contamination of water in fifty samples. F⁺ coliphages , Total coliforms , *F. streptococci* , and Fecal coliforms .

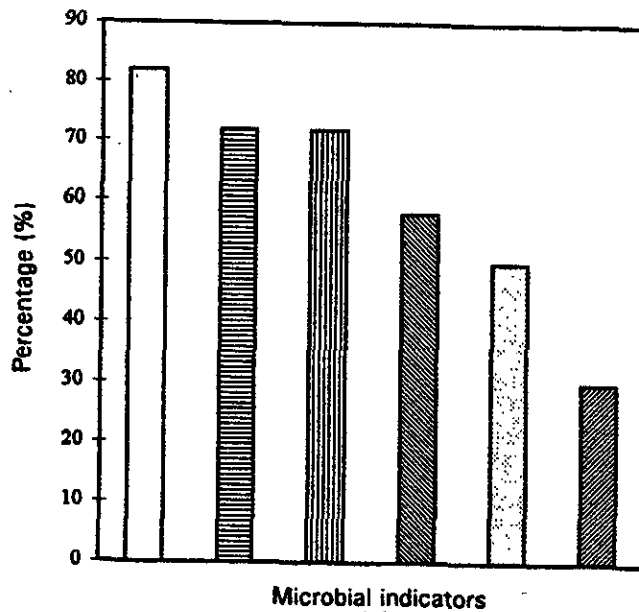








FIGURE 3 Comparative yield of pairs of microbiological indicators of fecal contamination in fifty samples. F⁺ coliphages/Total coliforms , F⁺ coliphages/Fecal coliforms , Fecal coliforms/Total coliforms , F⁺ coliphages/*F. streptococci* , Total coliforms/*F. streptococci* , and Fecal coliforms/*F. streptococci* .

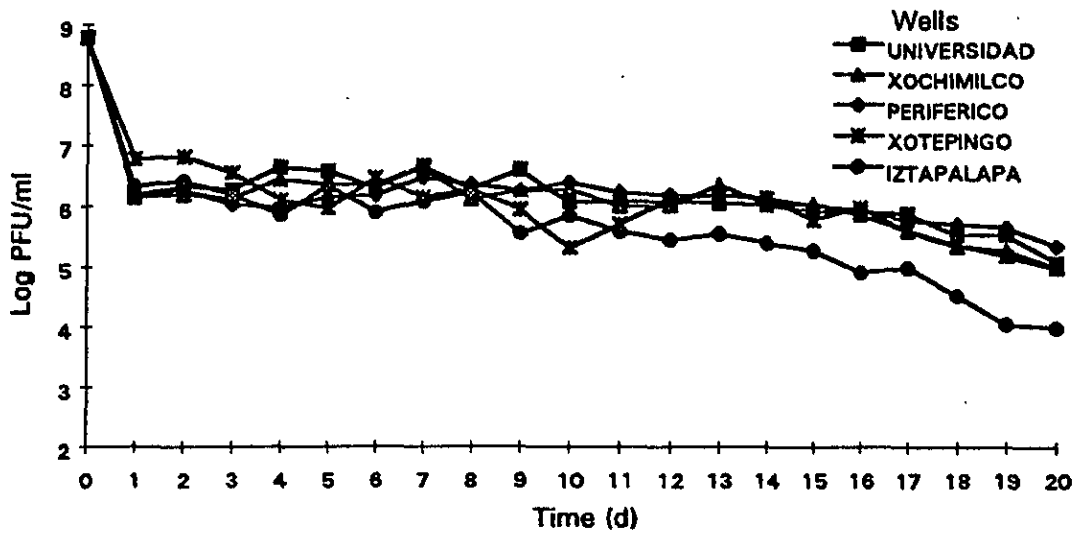


FIGURE 4 MS-survival curve in Mexico City's groundwater (average of 3 independent experiments).

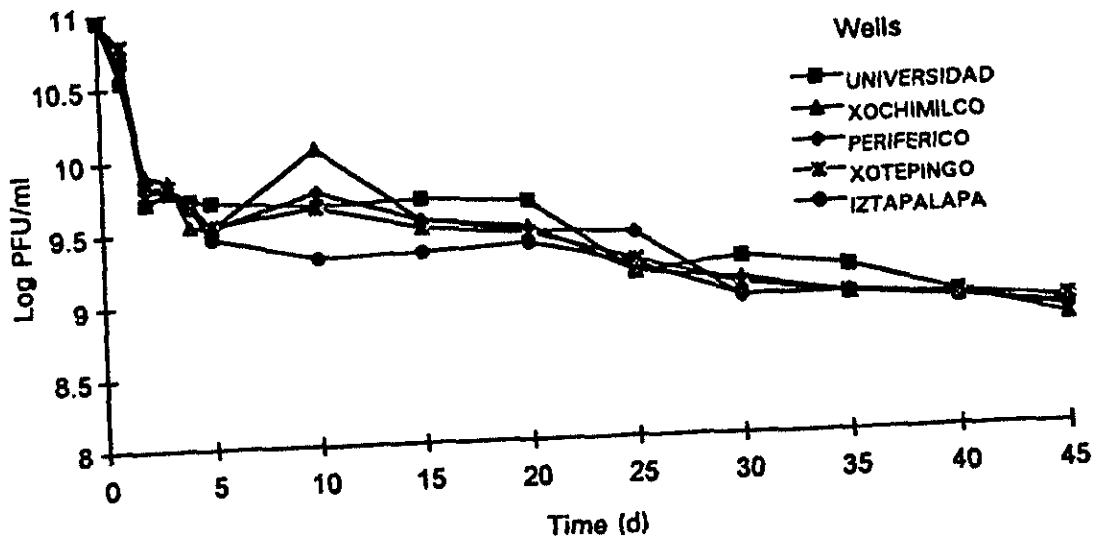


FIGURE 5 MS-2 survival curve in Mexico City groundwater.

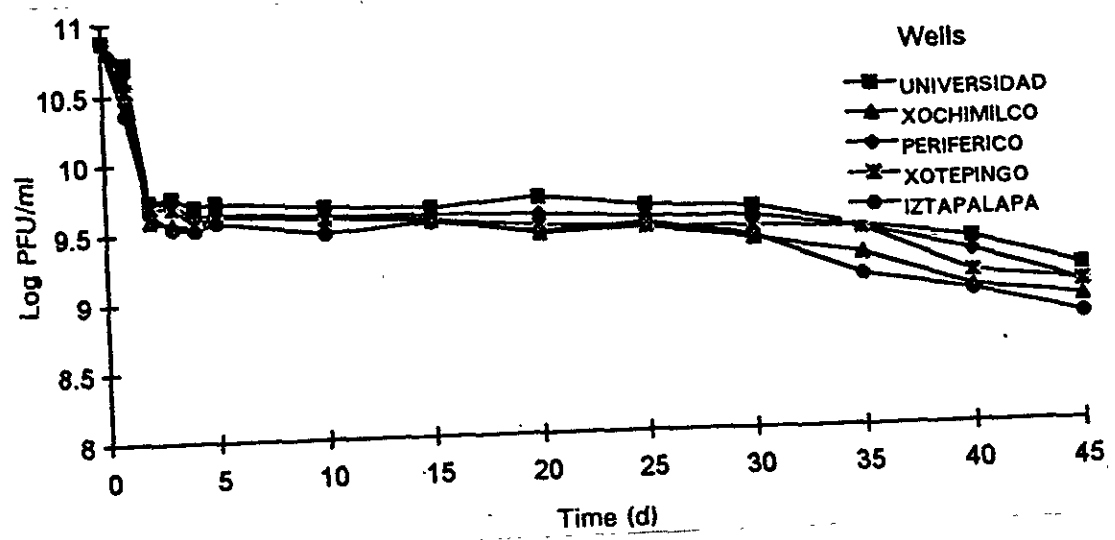


FIGURE 6 PRD-1 survival curve in Mexico City groundwater.