



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Detección de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*  
en agua del río Cuitzmala, Jalisco

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO TAPIA PALACIOS



DIRECTOR DE TESIS

DRA. ANA CECILIA ESPINOSA GARCÍA

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Tapia  
Palacios  
Marco Antonio  
55 16519134  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
3000197-6

### 2. Datos del Tutor

Dra.  
Ana Cecilia  
Espinosa  
García  
Instituto de Ecología, UNAM

### 3. Datos de sinodal 1

Dr.  
Javier  
Jiménez  
Carmona  
Facultad de Ciencias, UNAM

### 4. Datos de sinodal 2

Dr. José Pablo  
Maravilla  
Campillo  
Hospital General Dr. Manuel Gea González

### 5. Datos de sinodal 3

Dr.  
Gerardo  
Suzán  
Azpiri  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

### 6. Datos de sinodal 4

Dra.  
Marisa  
Mazari  
Hiriart  
Instituto de Ecología, UNAM

### 7. Datos del trabajo escrito

Detección de *Cryptosporidium Parvum* y *Giardia lamblia* en agua del río Cuitzmala, Jalisco  
64 pág.  
2012

## **AGRADECIMENTOS ESPECIALES**

Primeramente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada en el proyecto: CONACYT 2005-50955. Desarrollo Interdisciplinario de Modelos Conceptuales y Herramientas Metodológicas para el estudio de los Servicios Ecosistémicos. En el periodo marzo-agosto de 2009 y septiembre-diciembre de 2010.

Al apoyo brindado al Instituto de Ingeniería-Instituto-Ecología, estrategias para la eficiencia de desinfección del agua para consumo humano (con02007821).

A los miembros del jurado para la revisión del manuscrito: Dr. Javier Jiménez Carmona, Dr. José Pablo Maravilla Campillo, Dra. Ana Cecilia Espinoza García, Dr. Gerardo Suzán Azpiri y Dra. Marisa Mazari Hiriart

## **AGRADEZCO A:**

La Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme en sus instalaciones, y brindarme las herramientas necesarias para mejor profesional y personalmente.

El Instituto de Ecología de la UNAM, por convertirse en mí segunda casa.

El Hospital General Dr. Manuel Gea González por permitirme utilizar sus instalaciones para aprender las técnicas y realizar los análisis.

La Estación de Biología Chamela del IBUNAM, por brindarnos el placer absoluto de trabajar dentro de sus instalaciones.

Dra. Marisa Mazari Hiriart por permitirme entrar al laboratorio y apoyarme siempre en todo lo que se necesitaba.

Mi asesora y madre académica la Dra. Ana Cecilia Espinoza García, porque sin su guía estaría perdido.

La Bióloga Cecilia Rangel Martínez por enseñarme las técnicas y por todos los momentos de risa que pasamos juntos.

Dr. José Pablo Maravilla Campillo por abrirme las puertas de su laboratorio, por su preocupación cuando las técnicas no funcionaban y por revisar mi trabajo.

Dr. Javier Jiménez Carmona por sus valiosísimas aportaciones para la revisión de éste trabajo.

Dr. Gerardo Suzán Azpiri por sus comentarios en la revisión de éste trabajo.

M. en C. Joel Martínez Ocaña por su valioso apoyo y enseñanzas para la realización de éste trabajo.

M. en C. Gustavo Pérez Ortiz por su apoyo en el campo, comentarios, críticas, sugerencias, enseñanzas, y risas.

Mi hermano del alma Miguel Atl por su apoyo en campo, sus valiosas críticas, enseñanzas, vivencias, risas, travesuras y demás.

Abel Verduzco por brindarme su incondicional e incansable apoyo en los muestreos, y por enseñarme que la humildad no está peleada con el conocimiento.

Facultad de Ciencias que me transformo completamente en una mejor persona

Mis maestros de la carrera que con sus enseñanzas sembraron la inquietud por aprender más sobre la ciencia y la vida.

Mis amigos del laboratorio de Ecología Química: Alejandra, Dafne, Emilio, Erick, Gustavo, Jaqueline, Juan, Marisol, Nallely, Omar, Rosa, Sacbel, Stephanie y Yoli, por todos los momentos agradables que he vivido a su lado y por esos instantes de reflexión científica y humana.

Mis compañeros del laboratorio de Ecología de Agentes Patógenos: Aroni, Diego, Iris y Ceci, por sus enseñanzas y paciencia.

Mis amigos Andres, Angel Alejandro, Bere, Betzy, Chepe, Cisteil, Claudia, Daniel, Gonzalo, Graciela, Laura, Lirio, Luis, Luis Alberto, Maria, Miguel, Ricardo, Romano, Tania, Vania, y Zenyese, por todos los momentos memorables que hemos vivido, por su más sincera amistad y por siempre estar ahí cuando los necesito.

Mi madre hermosa Maria Palacios, porque sin ti no sería nada.

Mi padre Marco Antonio Tapia, ya que con su apoyo, amor, confianza y esfuerzo me impulsaron a estudiar una carrera y a superarme cada día.

Mis hermanos Juvenal y Arturo por siempre confiar en mí y apoyarme en todo momento. Los amo hermanos.

Mi primo-hermano Alberto Paz, porque siempre me ha apoyado y confiado en mí, en las buenas y en las malas, por ser mi compañero de travesuras, y por brindarme el placer de trabajar con él.

Mi tía Ana María Tapia porque siempre se sintió orgullosa de mi.

Ti mi hermosísima princesa, porque contigo he pasado los momentos más felices de mi vida.  
¡Gracias por existir!

## DEDICATORIA

A **mí**, porque el esfuerzo y la dedicación apremian.

A mi **padre y madre** por todo su amor,  
cariño y confianza.

A **Betzy** porque sin tu cariño y  
apoyo me encuentro perdido.

A mis hermanos **Beto, Arturo y Juve**  
por confiar en mí y por ser  
siempre como son.

A mi tía **Anita** por que  
Siempre estuvo orgullosa  
de que estudiara una carrera.

A la **UNAM** por haber  
sido la mejor decisión de mi vida.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 El agua como recurso.....	1
1.2 Indicadores de calidad del agua.....	2
1.3 Protozoarios patógenos transmitidos por agua.....	3
1.4 Descripción de la especie.....	11
1.4.1 <i>Cryptosporidium parvum</i> .....	11
1.4.2 <i>Giardia lamblia</i> .....	12
<b>2 ANTECEDENTES.....</b>	<b>13</b>
2.1 Estudios en México.....	13
<b>3 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos particulares.....	16
<b>5 SITIO DE ESTUDIO.....</b>	<b>17</b>
<b>6 MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
6.1 Métodos de campo.....	19
6.2 Métodos de laboratorio.....	20
6.2.1 Análisis bacteriológico.....	20
6.2.2 Concentración de muestras de agua.....	20
6.2.2.1 Ultrafiltración.....	20
6.2.2.2 Centrifugación.....	21
6.2.2.3 Detección y cuantificación de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i> por Inmunofluorescencia.....	22
6.3 Criterios de Inclusión.....	23
6.4 Conteo de la muestra de parásitos.....	23
6.5 Análisis estadístico.....	24
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>



7.1	Parámetros fisicoquímicos.....	25
7.2	Parámetros biológicos.....	28
7.2.1	Bacterias .....	28
7.2.2	Protozoarios .....	32
7.3	Análisis estadísticos .....	34
7.3.1	Comparación de medias (Prueba de t de Student) .....	34
7.3.2	Análisis de correlación (Análisis multivariado) .....	37
7.4	Relación entre indicadores y patógenos.....	40
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
8.1	Parámetros fisicoquímicos.....	41
8.2	Parámetros Biológicos.....	44
8.2.1	Bacterias .....	44
8.2.2	Protozoarios .....	46
8.3	Relaciones entre indicadores y patógenos.....	49
8.4	Riesgo potencial en agua del río Cuitzmala.....	50
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

La calidad del agua es un factor determinante para la salud pública, está asociada con la transmisión de enfermedades que afectan tanto la salud humana como animal, y también interviene en el funcionamiento de los ecosistemas. El agua contaminada con heces es un medio efectivo para la transmisión e infección con *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*, los cuales son difíciles de eliminar ya que poseen estructuras de resistencia a condiciones ambientales desfavorables y causan enfermedades intestinales en todo el mundo.

En Jalisco, las Enfermedades Infecciosas Intestinales son la segunda causa de enfermedad con más casos reportados. La cuenca del río Cuitzmala es una zona rural en la cual las actividades productivas (ganadería y agricultura principalmente) y los desechos de los poblados están empezando a tener efecto sobre la calidad del agua, y por ende en la salud de animales y humanos. El objetivo de esta investigación fue detectar en dos épocas (lluvias 2009 y secas 2010) quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en agua del río Cuitzmala, Jalisco, a fin de analizar el uso del agua y el riesgo potencial que esto representa para la salud de los habitantes de la región, así como también identificar sitios clave en el aporte de contaminantes.

Se realizó un muestreo en 12 sitios del río Cuitzmala, las muestras se concentraron por el método de ultrafiltración-centrifugación (el porcentaje de recuperación para ambas especies fue mayor a 55%). *Cryptosporidium parvum* y *G. lamblia* se detectaron y cuantificaron por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales específicos para cada especie. De manera paralela se midieron características fisicoquímicas y bacteriológicas del agua con el fin de evaluar el estado de contaminación actual del río Cuitzmala y también las posibles relaciones con *C. parvum* y *G. lamblia*.

Se encontró que no existen diferencias significativas entre épocas para los parámetros analizados con excepción de los Coliformes Fecales (CF) y Enterococos Fecales (EF). Se determinó que la conductividad, oxígeno disuelto (OD), CF, *C. parvum* y *G. lamblia* presentaron diferencias significativas entre el agua del río (agua superficial) y los sitios que tienen aportes residuales. Se encontró que los sitios estudiados presentaron un cierto grado de contaminación por CF y EF primordialmente en la clase II y III (moderado-crítico), y que la fuente potencial de contaminación con base en el cociente CF/EF es primordialmente animal en la época de lluvias y humano en la época secas. Se determinó que las relaciones de los parámetros medidos varían dependiendo del tipo de agua, es decir, no se logró detectar una relación constante entre los distintos parámetros. Se determinó que existe un mayor peligro de exposición con *C. parvum* y *G. lamblia* durante la época seca. La relación entre indicadores fecales (CF y EF) no representan confiablemente la presencia de *C. parvum* y *G. lamblia*, por lo que se recomienda que se consideren dentro de las regulaciones en materia de agua en México. San Miguel es un sitio clave en el aporte de contaminación fecal en el río Cuitzmala, debido a que posee un deficiente sistema de drenaje. Por lo

anterior concluimos que las actividades humanas pueden estar modificando la calidad del agua del río Cuitzmala, y además pueden incrementar el riesgo potencial de infección para las poblaciones humanas y animales.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 El agua como recurso

El agua es la característica principal que distingue a nuestro planeta, ya que gracias a ella se desarrolló la vida y sin ella la vida no sería posible tal como la conocemos (Clarke y Bartolow, 2004).

La cantidad y la calidad del agua varían tanto espacial como temporalmente y de ellas depende la disponibilidad del recurso, lo que es uno de los factores más importante para el crecimiento y desarrollo de las sociedades, así como para la conservación de los ecosistemas (Mazari-Hiriart *et al.*, 2005).

El agua es un tema de interés global debido a la demanda que tiene (Carabias y Landa, 2005), ya que cada vez son más personas las que la necesitan y en mayor cantidad. Sin embargo, aún cuando el acceso a agua de calidad adecuada es un derecho humano básico, existen muchos países que desafortunadamente no cumplen con esta premisa (Mazari-Hiriart *et al.*, 2005). Aunado a esto, la alteración de la calidad del agua reduce el volumen disponible para uso y consumo humano, así como también para el buen funcionamiento de diversos ecosistemas (Mazari-Hiriart *et al.*, 2005; Carabias y Landa, 2005).

El 70% de la superficie de la tierra está ocupado por agua. El volumen total del agua en el planeta es de 1,400 millones km<sup>3</sup>, y solo el 2.5% de ésta, es dulce (35 millones km<sup>3</sup>), por lo que el abastecimiento de agua a nivel mundial está en crisis (Carabias y Landa, 2005). El problema básico de acuerdo con Carabias y Landa (2005), es que la cantidad de agua dulce disponible es menos del 1% (cerca 200,000 km<sup>3</sup>), y por lo tanto es un recurso limitado. Con el incremento de la población y la contaminación de los cuerpos de agua, este recurso cada día es más limitado.

El agua como elemento fundamental puede ser utilizada varias veces, para consumo humano, riego, producción industrial, generación de energía eléctrica, remoción de desechos y a la vez ser el soporte de los ecosistemas naturales. Estimaciones en México muestran que el agua se consume en un 77% para la agricultura, en un 10% para uso en la industria, y un 13% para abastecimiento público (Carabias y Landa, 2005). Debido a los múltiples usos debe de hacerse un manejo integral del recurso tomando en cuenta los aspectos de calidad del agua.

## 1.2 Indicadores de calidad del agua

La calidad del agua es un factor determinante para la salud pública. El agua está asociada con la transmisión de enfermedades (Carabias y Landa, 2005; WHO, 2006; Moe, 2007) que afectan a la salud humana, por lo que tiene un efecto sobre la calidad de vida de la población (Carabias y Landa, 2005).

Los parámetros de calidad del agua se clasifican en la mayoría de los casos como características físicas, químicas y biológicas. Entre las características físicas se determina: la turbidez, la cantidad de sólidos, olor, la temperatura y el color. Las características químicas incluyen: la presencia de iones específicos (nitratos, nitritos, amonio, fosfatos, cloruros), pH, alcalinidad, conductividad eléctrica y dureza; también compuestos orgánicos naturales (proteínas, carbohidratos y lípidos), así como compuestos sintéticos orgánicos y los gases disueltos en el agua (nitrógeno, oxígeno, bióxido de carbono, amoníaco y metano). Las características biológicas del agua se relacionan, principalmente, con las poblaciones de microorganismos patógenos o potencialmente patógenos, asociados con heces de animales y humanos, que son vertidos en las aguas superficiales o subterráneas sin un adecuado tratamiento (Carabias y Landa, 2005).

Un organismo indicador es aquel que, cuya presencia muestra que potenciales microorganismos patógenos pueden estar también presentes. Los organismos indicadores de la calidad del agua se han utilizado como una herramienta para la evaluación de contaminación fecal desde el siglo pasado. El concepto de indicador depende del hecho de que ciertas bacterias no patógenas se encuentran en las heces de los animales de sangre caliente, son fáciles de aislar y cuantificar por métodos bacteriológicos simples y son indicativos de la eficiencia de los procesos de tratamiento, sin embargo, en la actualidad se reconoce que muy pocas veces se ha podido establecer una relación entre bacterias indicadoras y microorganismos patógenos, además los organismos indicadores no siempre cumplen con todas las características de un indicador ideal (Gerba y Pepper 2009):

- Deben de ser útiles para todo tipo de agua.
- Deben estar presentes cuando los patógenos entéricos estén presentes.
- Deben de permanecer en el ambiente por periodos de tiempo más largos que los patógenos entéricos.
- No deben de multiplicarse en el agua.
- Deben de ser fáciles de detectar.
- La densidad de los indicadores debe de tener alguna relación directa con el grado de contaminación fecal.
- Deben de ser miembros de la microflora intestinal de los animales de sangre caliente.

En la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 (DOF, 1997) se establecen los límites máximos permisibles de contaminantes en agua y bienes nacionales, dándole mayor importancia a los parámetros químicos en especial elementos inorgánicos y muy poco a los parámetros biológicos. El grupo de los coliformes totales y fecales, así como los huevos de helminto son los únicos indicadores de contaminación biológica, aunque de acuerdo con Gerba y Pepper (2009) el grupo de las coliformes presentan deficiencias como indicadores de la calidad del agua, entre ellas tenemos que crecen en ambientes acuáticos, en sistemas de distribución de agua potable, no indican riesgos a la salud y no indican la presencia o ausencia de otros patógenos como protozoarios y virus.

### **1.3 Protozoarios patógenos transmitidos por agua**

El transporte de microorganismos patógenos a través del agua es un medio efectivo para la propagación de diversas enfermedades a una gran proporción de la población humana y en países en desarrollo alrededor de 10 millones de personas mueren cada año como consecuencia directa del consumo de agua contaminada. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que un 24% de las enfermedades que ocurren en el mundo están asociadas con factores ambientales, entre ellos, el agua sin un adecuado tratamiento y con condiciones precarias de higiene (WHO, 2006). Dentro de las enfermedades transmitidas por agua se incluyen gastroenteritis, infecciones en la piel, hepatitis, conjuntivitis, infecciones respiratorias, síndrome urémico-hemolítico (SUH), miocarditis, diabetes, cáncer estomacal, úlceras en el duodeno, artritis, entre otras (Moe, 2007).

Toranzos *et al* (2007) menciona que la gastroenteritis es la enfermedad más común asociada con patógenos transmitidos por agua. De acuerdo con la OMS el 94% de los casos de diarrea reportados están asociados principalmente al consumo agua contaminada y a una mala higiene (WHO, 2006).

Los cuerpos de agua que reciben desechos fecales de animales y humanos contienen numerosos microorganismos patógenos capaces de sobrevivir fuera de su hospedero. Estos microorganismos son transmitidos indirecta mente a otros individuos a través del consumo de agua, en la que se han descargado heces de individuos infectados. Dicha transmisión puede darse a través del sistema de distribución de agua para consumo con una inadecuada desinfección, o a través del contacto directo con aguas de uso recreativo que han sido contaminadas (Betacourt y Querales, 2008; Moe, 2007).

La dispersión por agua de los agentes patógenos depende de varios factores tales como: 1) la fuente del agente infeccioso, 2) los patrones específicos de transmisión, uno de los cuales está directamente relacionado con el agua, 3) los atributos de los organismos que le dan la

posibilidad para sobrevivir y/o moverse en el ambiente, 4) la dosis infecciosa y los factores de virulencia de los organismos, 5) los factores de susceptibilidad del huésped (Moe, 2007) Existe una gran variedad de microorganismos patógenos (Tabla 1) presentes en la materia fecal, por lo cual su caracterización y cuantificación en agua es de gran importancia para la salud pública.

De acuerdo con Moe (2007) las rutas de infección transmitidas por agua pueden dividirse en cuatro categorías principales: ingestión de agua contaminada, infecciones relacionadas con una pobre higiene doméstica y personal, infecciones basadas en agua, en la cual existe una ingestión de agua donde los patógenos llevan a cabo parte de su ciclo de vida, y finalmente insectos vectores relacionados con el agua.

Tabla 1. Principales microorganismos patógenos transmitidos por agua y sus efectos en la salud.

Agente Patógeno	Persistencia en el agua	Efectos en la salud	Rutas de trasmisión
<b>Virus</b>			
Astrovirus	Corto- Moderado	Gastroenteritis aguda	Fecal-oral, agua
Hepatitis A	Moderado	Hepatitis	Fecal-oral, agua, moluscos
Hepatitis E	Moderado	Hepatitis	Agua, fecal-oral
Norovirus (Norwalk)	Corto	Diarrea y vómito	Agua, alimentos (moluscos mal preparados , ensaladas)
Rotavirus A	Corto	Diarrea y vómito particularmente severo en los niños	Agua
Rotavirus B	Corto	Gastroenteritis aguda	Fecal-oral, agua
Enterovirus (Poliovirus, coxsakievirus, echovirus)	Corto- moderado	Enfermedad febril, enfermedades respiratorias, meningitis, pleurodinia, parálisis, conjuntivitis, miocarditis, diarrea, diabetes, ataxia, encefalitis	Fecal-oral, agua
<b>Bacteria</b>			
<i>Aeromonas hydrophila</i> (Chester Stanier, 1943)	Se puede multiplicar	Diarrea acuosa	Agua
<i>Campilobacter jejuni</i> (Jones et al.) Veron y Chatelain, 1973	Corto- Moderado	Diarrea y dolor abdominal	Fecal-oral, agua, alimentos y aves de corral



Tabla 1. Continuación.

Agente Patógeno	Persistencia en el agua	Efectos en la salud	Rutas de transmisión
<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica O157:H7	Moderado	Síndrome Urémico Hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés), vómito, diarrea extremadamente sangrante y acuosa.	Agua, alimentos
<i>E. coli</i> Enteroinvasiva	Moderado- Largo	Posible disentería con fiebre	Agua, alimentos
<i>E. coli</i> Enteropatogénica	Largo	Diarrea acuosa que puede intensificarse	Agua, alimentos
<i>E. coli</i> Enterotoxigénica	Moderado	Diarrea líquida	Agua, alimentos
<i>Helicobacter pylori</i> (Marshall <i>et al.</i> ) Goodwin <i>et al.</i> 1989	Desconocido	Gastritis, úlcera péptica y probable cáncer	Posiblemente oral-oral, agua iatrogénica (hospitales)
<i>Salmonella typhi</i> (Schroeter ) Warren and Scott, 1930	Moderado	Fiebre, malestar general, dolor abdominal	Fecal-oral, agua, alimentos (productos de pollo)
<i>Salmonella</i> spp.	Largo	Diarrea, dolor abdominal y fiebre	Fecal-oral, agua, alimentos (productos de pollo)
<i>Shigella</i> spp.	Corto	Diarrea que puede ser líquida hemorrágica y puede causar la muerte	Fecal-oral, agua y alimentos
<i>Vibrio cholerae</i> O1	Corto	Diarrea severa líquida, vómito y rápida deshidratación	Moluscos, fuentes de agua
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Schleifstein y Coleman) Frederiksen, 1964	Largo	Fiebre, diarrea y dolor abdominal	Agua, alimentos, orina

Tabla 1. Continuación.

Agente Patógeno	Persistencia en el agua	Efectos en la salud	Rutas de transmisión
<b>Protozoarios</b>			
<i>Balantidium coli</i> (Malmsten, 1857)	Desconocido	Dolor abdominal, ocasionalmente diarrea con sangre o moco	Agua
<i>Cryptosporidium parvum</i> (Tyzzer, 1912)	Largo	Diarrea líquida cólico estomacal y fiebre	Agua para beber, recreativa, alimentos
<i>Entamoeba histolytica</i> (Schaudinn, 1903)	Moderado	Los síntomas incluyen diarrea, ocasionalmente hemorrágica, y fiebre de absceso hepático	Fecal-oral, alimentos y quizás agua para beber
<i>Giardia lamblia</i> (Lambl) Kofoid y Christiansen, 1915	Moderado	Diarrea, dolor abdominal y nauseas	Fecal-oral, agua para beber, albercas, alimentos
<i>Cyclospora</i> spp	?	Diarrea y vómito, nausea, pérdida del apetito	Agua, verduras y frutas frescas
<b>Algas</b>			
Cyanobacteria ( <i>Anabaena</i> sp; <i>Aphanizomenon</i> sp; <i>Microcystis</i> )	Moderado-largo	Envenenamiento por toxinas	Tapetes algales en agua

Nota: corto: 1-4 días; moderado: 1-2 semanas; largo: más de tres semanas. Fecal-oral: las partículas fecales de un hospedero se introducen en la boca de un huésped potencial; oral-oral: la infección puede darse por el contacto de fluidos bucales del hospedero con la boca de un huésped potencial; agua: ingestión directa o accidental de agua contaminada; alimentos: ingestión de alimentos que estuvieron en contacto con agua contaminada. Modificada de Moe (2007); Romieu y López (2002).

Los protozoarios patógenos están ampliamente distribuidos en los suministros de agua en todo en el mundo, son muy resistentes a los desinfectantes químicos y son causantes de numerosos brotes epidémicos. Estos microorganismos son causantes principalmente de enfermedades gastrointestinales, provocando desde una diarrea simple, hasta una gastroenteritis, y en casos más serios la muerte (Betancourt y Querales, 2008).

Dentro de los géneros de protozoarios que han sido asociados con infecciones transmitidas por el agua encontramos: *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Cyclospora*, *Entamoeba*, *Acanthamoeba*, y los microsporidios, *Enterocytozoon* y *Encephalitozoon*. Todos estos organismos producen quistes, ooquistes o esporas resistentes a diversas condiciones ambientales, y que se propagan en las heces de los individuos infectados, excepto por *Acanthamoeba* que es de vida libre (APHA, 2005).

Los protozoarios de los géneros *Giardia* y *Cryptosporidium* se reportan como el principal agente etiológico en brotes epidémicos en el agua potable en Estados Unidos durante los 1980s y principios de los 1990s y continúan siendo la principal causa de brotes por exposición a agua de uso recreativo (Moe, 2007).

Las estadísticas de epidemias transmitidas por agua en Estados Unidos de 1991-2000 muestra que el 21% de las epidemias se debe principalmente a protozoarios parásitos (Figura 1), de los cuales *Cryptosporidium* y *Giardia* son los patógenos con más casos reportados, 408,259 y 2,256 respectivamente, lo que los coloca entre patógenos prioritarios en la salud mundial (Water Quality and Health, <http://www.waterandhealth.org>)

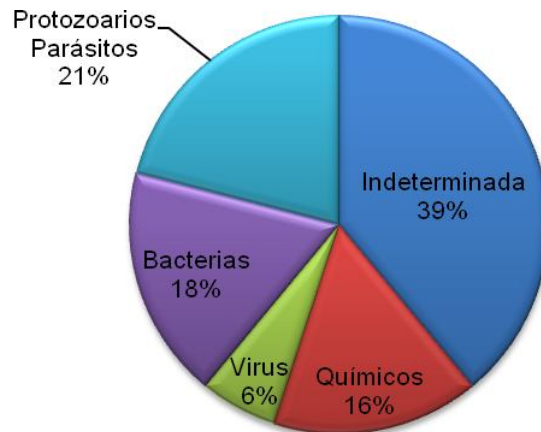


Figura 1. Causas de epidemias transmitidas por agua en Estados Unidos 1991-2000.

Modificada de <http://www.waterandhealth.org>

En 1992 la OMS y la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) publicaron una consulta informal de expertos en epidemiología, biología, genética molecular, sobre el tratamiento y las implicaciones en salud pública de los parásitos intestinales. *Cryptosporidium parvum* y *G. lamblia* han sido incluidos recientemente (2004) en ésta iniciativa como enfermedades descuidadas (Savioli *et al.*, 2006), es decir, que no se les ha dado la importancia y seguimiento requerido. En países en desarrollo éstos y otros parásitos constituyen un grupo de microorganismos que afectan la capacidad de lograr un desarrollo potencial completo y afectan el desarrollo socioeconómico (Betancour y Querales, 2008), ya que poseen características (Tabla 2) que aumentan su sobrevivencia en el ambiente y facilitan la transmisión por agua.

Por otro lado Okhuysen (2001) y Al-Abri *et al.* (2005) los han descrito como causantes de diarrea “del viajero” afectando a un 50% de turistas, que aproximadamente son 11 millones en todo el mundo. Las zonas de riesgo para adquirir una infección gastrointestinal, se han identificado de la siguiente manera: bajo riesgo (5%) centro y norte de Europa, Estados Unidos, Canadá, Japón y Australia; riesgo intermedio (15-20%), este y sur de Europa, Rusia, China, Israel, Islas del Caribe así como Sudáfrica; y alto riesgo (10-60% o más), este, sur y sureste de Asia, centro y sur de América así como países de bajos ingresos de África (Al-Abri *et al.*, 2005).

Otro aspecto interesante es que *Cryptosporidium* y *Giardia* son causantes de infecciones zoonóticas, es decir, que pueden transmitirse entre animales y humanos, principalmente al ganado así como también a mamíferos silvestres (Appelbee *et al.*, 2005).

Tabla 2. Algunas características de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* que aumentan la sobrevivencia en el ambiente y facilitan la transmisión por agua. Modificado de Smith *et al.*, (1995).

<b>Característica</b>	<b><i>Cryptosporidium</i></b>	<b><i>Giardia</i></b>
Gran cantidad de (oo)quistes (quistes y ooquistes) excretados	~10 <sup>10</sup> ooquistes	~1.44x10 <sup>9</sup> quistes
Gran variedad de huéspedes	Humanos, ganado, mascotas, mamíferos silvestres	Humanos, ganado, mascotas, mamíferos silvestres
Largos periodos de sobrevivencia en el agua	~6 meses suspendidos en el agua	~2 meses suspendidos en el agua
Tamaño pequeño	4-6 µm	8-12 µm
Bajas dosis infecciosas	DI <sub>50</sub> en humanos es de 9-1042 ooquistes	DI <sub>50</sub> en humanos es de 25-100 quistes

Dosis Infecciosa Media (DI<sub>50</sub>): cantidad de microorganismos necesarios para enfermar al 50% de la población expuesta.

## 1.4 Descripción de la especie.

### 1.4.1 *Cryptosporidium parvum*

En 1910 Tyzzer propuso el nombre del genero *Cryptosporidium* para parásitos protozoarios encontrados frecuentemente en las glándulas gástricas de ratones de laboratorio. En 1912 él sugiere una nueva especie, *C. parvum* para un pequeño organismo que solo se desarrolla en el intestino delgado de ratón. En 1976 dos grupos independientes de investigación reportaron los primeros casos de Cryptosporidiosis en humanos (Marshall *et al.*, 1997). Existen 19 especies de *Cryptosporidium* de la cuales *C. parvum* y *C. hominis* se han reportado como la principal causa de epidemias en humanos alrededor del mundo (Smith y Nichols, 2007); su clasificación actual es la siguiente:

- Phylum Apicomplexa
  - Clase Sporozoasida
    - Orden Eucoccidiorida
      - Familia Cryptosporidiidae
        - Género *Cryptosporidium*

El ciclo de vida está compuesto de varios estadios: esporozoítos, trofozoítos, merozoítos de tipo I y II, así como cigotos. Cuando los ooquistes de pared gruesa (producto de la reproducción sexual del parásito) maduran en el agua o los alimentos y son ingeridos, comienza la infección; de los ooquistes eclosionan esporozoítos que penetran a las células epiteliales del tracto gastrointestinal; posteriormente se desarrollan en trofozoítos, los cuales desarrollan por multiplicación asexual de 6-8 núcleos (esta fase se conoce como esquizogonia), cuando madura cada núcleo forma un merozoítos de tipo I. Este merozoíto puede desarrollarse en el merozoíto de tipo II e iniciar la multiplicación sexual y el desarrollo del ooquiste, o puede reinfectar e iniciar la multiplicación asexual. El cigoto formado después de la fertilización madura y se convierte en un ooquiste de pared gruesa resistente al ambiente, y el hospedero lo libera en las heces propiciando la transmisión de la infección de un huésped a otro; o puede formar un quistes de pared delgada promoviendo la autoinfección y de esta manera mantener al parásito en el huésped, este tipo de ooquistes representan hasta un 20% del total de ooquistes expulsados (Marshall *et al.*, 1997).

La prevalencia de infecciones con *Cryptosporidium* es entre 1 y 3% en Europa y Norte América, y es considerablemente mayor en Asia (5%) y África (10%). Las personas con VIH/SIDA son especialmente susceptibles a las Cryptosporidiosis causándoles cuadros diarreicos muy severos (Marshall *et al.* 1997).

Un estudio realizado en México reportó una prevalencia de 6.4% de Cryptosporidiosis en 403 niños menores de 5 años con diarrea aguda en la Ciudad de México (Enriquez *et al.*, 1997).

En el ambiente, los ooquistes están ampliamente distribuidos en el agua; se han encontrado ooquistes en el 87% de las muestras de agua superficial de 14 estados en Canadá (Le Chevallier *et al.*, 1991a) y 27% en muestras de agua para consumo humano (Le Chevallier *et al.* 1991b).

#### 1.4.2 *Giardia lamblia*

Leeuwenhoek describió un parásito similar a *Giardia lamblia* (sinónimo *G. duodenalis*, *G. intestinalis*) en sus propias heces en 1681, pero el primer reporte se le fue acreditado a Lambl en 1859 (Marshall *et al.* 1997). De acuerdo con los nuevos datos sistemáticos basados en genética, estructura y bioquímica *Giardia* se encuentra dentro de la siguiente clasificación (Plutzer *et al.* 2010):

- Phylum: Metamonada
  - Clase: Treponadea
    - Orden: Giardiida
      - Familia: Giardiidae
        - Género: *Giardia*

El ciclo está compuesto de 2 estadios: un trofozoíto y un quiste resistente. Cuando los quistes son ingeridos, pasan a través del estómago donde los ácidos favorecen el desenquistamiento, el cual generalmente ocurre en el duodeno, liberando dos trofozoítos que son móviles y se adhieren al epitelio usando su disco ventral, posteriormente los trofozoítos se replican por fisión binaria. La formación de los quistes tiene lugar cuando los parásitos llegan al colon y salen al exterior a través de las heces. Los quistes pueden sobrevivir en el agua e infectar tanto humanos (de manera directa e indirecta) y animales, estos últimos funcionan como reservorios de la infección (Marshall *et al.* 1997; Appelbee *et al.*, 2005).

*Giardia lamblia* es el parásito intestinal más comúnmente detectado en el mundo y es especialmente prevalente en niños de países en desarrollo y más frecuente en áreas urbanas que rurales (Fraser, 1994; Marshall *et al.*, 1997). *Giardia lamblia* es el protozoario causante de Giardiasis, con más de 200 millones de casos al año en todo el mundo; y está actualmente categorizado dentro de siete genotipos/ensambles: A, B, C, D, E, F y G; siendo solo los genotipos A y B detectados en humanos (Smith y Paget, 2007).

En México se reporta que de 3,461 muestras de suero el 55.3% contiene anticuerpos IgG contra *G. lamblia* (Cedillo-Rivera *et al.*, 2009).

Los quistes de *Giardia* se han detectado en 81% de muestras de agua superficial en Canadá (Le Chevallier *et al.*, 1991a) y en 17% en agua para consumo humano (Le Chevallier *et al.*, 1991b).

## 2 ANTECEDENTES

Los primeros trabajos realizados en torno a la detección de protozoarios patógenos existen desde 1920, pero su relación con el agua como vía de infección empieza a ser documentada en 1985 en Texas. Esto sucede cuando aguas residuales contaminaron el sistema de agua subterránea (D'Antonio *et al.*, 1985). El mayor incidente conocido en el cual interviene una infección transmitida por agua es el brote de Milwaukee en 1993, en el que se estimaron 403,246 casos de diarrea producida por microorganismos patógenos en un periodo de 2 meses (Mac-Kenzie *et al.*, 1994).

Un estudio pionero sobre la detección de protozoarios patógenos en agua a través de tinción con antisueros conjugados con fluoresceína, fue publicado por Sauch (1985) y posteriormente otros trabajos han utilizado esta estrategia.

En el mundo se han realizado numerosos trabajos en la detección de ooquistes de *C. parvum* y quistes de *G. lamblia* en fuentes de agua superficiales de ríos, lagos, agua potable, agua para uso recreativo y agua tratada (Ongerth y Stibbs, 1987; Franco *et al.*, 2001; Le Chevallier *et al.*, 1991; Briancesco and Bonadonna, 2005; Karanis *et al.*, 2006; Schets *et al.*, 2008; Wicki *et al.*, 2009) y en sistemas de tratamiento (Hsu *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2006).

### 2.1 Estudios en México

En México los trabajos sobre la detección de protozoarios patógenos son escasos (Sánchez-Vega *et al.*, 2000; Flisser *et al.*, 2002; Tay-Zavala y Sánchez, 2002; Guerrero *et al.*, 2007) y la mayoría se centran en la detección en heces. Cifuentes *et al.* (2000) realizaron un trabajo en el cual evaluó el riesgo de infección con *G. lamblia* por el uso de agua residual para riego en el valle de Mezquital. Posteriormente Díaz-Cinco *et al.* (2003) evaluó la incidencia de *C. parvum* por fluorescencia en agua de abastecimiento urbano en Ciudad Obregón, Sonora, así como también el porcentaje de ooquistes viables en la muestra. En otro trabajo Cifuentes *et al.* (2004) utilizan la microscopia de epifluorescencia para analizar el riesgo de infección con *G. lamblia* en niños en una área de recarga subterránea artificial en Xochimilco.

Uno de los pocos trabajos hechos en México sobre la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* en muestras de agua es el trabajo realizado por Chaidez *et al.* (2005), donde se documentó la presencia de estos microorganismos en agua de riego, utilizando una técnica de inmunofluorescencia.



Otro trabajo importante es el de Magaña *et al.* (2006), en el cual detectan ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y quistes de *Giardia* spp. en agua de mar en las playas del estado de Sinaloa.

Finalmente se tiene el trabajo de Rangel-Martínez (2010) en el cual se estudia la presencia de *C. parvum* y *G. lamblia* en agua residual, residual tratada y pozos de Ciudad Universitaria (UNAM); su trabajo es muy importante porque brinda las herramientas metodológicas para la realización de este trabajo.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Las Enfermedades Infecciosas Intestinales (EII) son poco más del 10% del total de enfermedades presentes en todo el país, con más de cinco millones de casos para el 2000 y cuatro millones en el 2009 de acuerdo con el censo de morbilidad de la Dirección General de Epidemiología (DGEPI). En 1991 se reportó que las EII eran la segunda causa de muerte infantil en todo el país con una tasa de mortalidad de 278 por cada 100,000 habitantes, la tercera en el estado de México con 450 por cada 100,000 y la cuarta en el Distrito Federal con 157 por cada 100,000 (National Research Council *et al.*, 1995).

En cuanto a las giardiasis, en el año 2000 existían más de 60,000 casos, mientras que para el 2009 fueron poco más de 20,000. La Criptosporidiosis no se encuentra reportada dentro de los censos de la DGEPI, pero debido a los síntomas que presenta puede ser confundido con otras infecciones o no ser diagnosticado (Marshall *et al.*, 1997) y por lo tanto puede formar parte de las estadísticas de las Infecciones Intestinales debidas a Protozoarios del Sistema de Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE 10) A07.2 y A09 con mas 119,000 casos en 2000 y más de 79,000 en 2009.

Como se mencionó anteriormente *Cryptosporidium* y *Giardia* son parásitos que pueden no solo ser depositados en una matriz ambiental por animales y seres humanos (Appelbee *et al.*, 2005; Castro-Hermida *et al.*, 2009; Feng, 2009), sino que también, pueden infectar a ambos, es decir son zoonóticos. Por lo tanto su estudio se vuelve necesario para conocer su prevalencia tanto en el ambiente como en los hospederos, y tratar de entender cuál es su papel en ecosistemas que muestran diversos grados de influencia por actividades humanas como la cuenca del río Cuitzmala.

Debido a lo anterior y a los problemas de salud que desencadenan estos microorganismos es importante realizar estudios centrados en la detección de los protozoarios patógenos *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en ambientes acuáticos, como sistemas importantes para su dispersión y mejorar las técnicas para su detección. Éste es el primer trabajo que se realiza en el río Cuitzmala, Jalisco para evaluar la calidad del agua a partir de la presencia de protozoarios que tienen como hospederos a animales y a humanos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Detección de quistes de *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en agua del río Cuitzmala, Jalisco analizando el uso de agua y el riesgo potencial que esto representa para la salud de los habitantes.

### 4.2 Objetivos particulares

- Llevar a cabo la detección de quistes *Giardia lamblia* y ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en muestras concentradas de agua, por medio de técnicas de microscopía de inmunofluorescencia,
- Evaluar la utilidad de la técnica de concentración por ultrafiltración-centrifugación en la detección de quistes y ooquistes a partir de muestras de agua de gran volumen.
- Evaluar las posibles relaciones entre bacterias indicadoras y protozoarios, con la finalidad de entender su utilidad para el monitoreo de la calidad del agua.
- Identificar sitios claves en el aporte de contaminantes para el río Cuitzmala, con el propósito de proponer alternativas de manejo.

## 5 SITIO DE ESTUDIO

La cuenca del río Cuitzmala se localiza en la zona occidental del país en la vertiente del Océano Pacífico (Figura 2). Geográficamente se ubica al noroeste de la sierra Madre del Sur y las subprovincias de la sierra de la Costa de Jalisco y Colima (López-Tapia, 2008). Es un área importante desde la perspectiva biológica, debido a que representa diferentes tipos de ambientes, desde secos como la Selva Baja Caducifolia o Bosque Tropical Seco, hasta ambientes como los humedales, los cuales son hábitat para aves migratorias de importancia internacional debido a su patrón de migración (Ceballos *et al.*, 1999).

Es una cuenca exorreica de aproximadamente 1,080 km<sup>2</sup> su principal río es el Cuitzmala. Políticamente se localiza en los municipios de Villa Purificación y La Huerta (es un municipio costero que limita con el Océano Pacífico), con 62 y 32 localidades respectivamente (Ceballos *et al.*, 1999)

Según el Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud se reportaron para la semana 52 del 2010, poco más de 335,000 casos de EII en Jalisco, lo que la convierte en la segunda enfermedad más importante en éste Estado, y a Jalisco en el tercer estado con mayor número de casos de EII (DGEPI, 2010).

López-Tapia en 2008 realizó un estudio de la calidad del agua en la cuenca del río Cuitzmala, y concluyó que en la cuenca están empezando a tener efecto las actividades productivas, las cuales son principalmente la ganadería y la agricultura. Reporta que el origen probable de contaminación fecal es de tipo animal tendiendo hacia contaminación humana en la parte alta de la cuenca, por lo cual resulta relevante detectar patógenos que pueden tener una afectación tanto en el estado de conservación del ecosistema como en la salud de la población humana y animal que vive en los alrededores, en las partes baja y media de la cuenca.

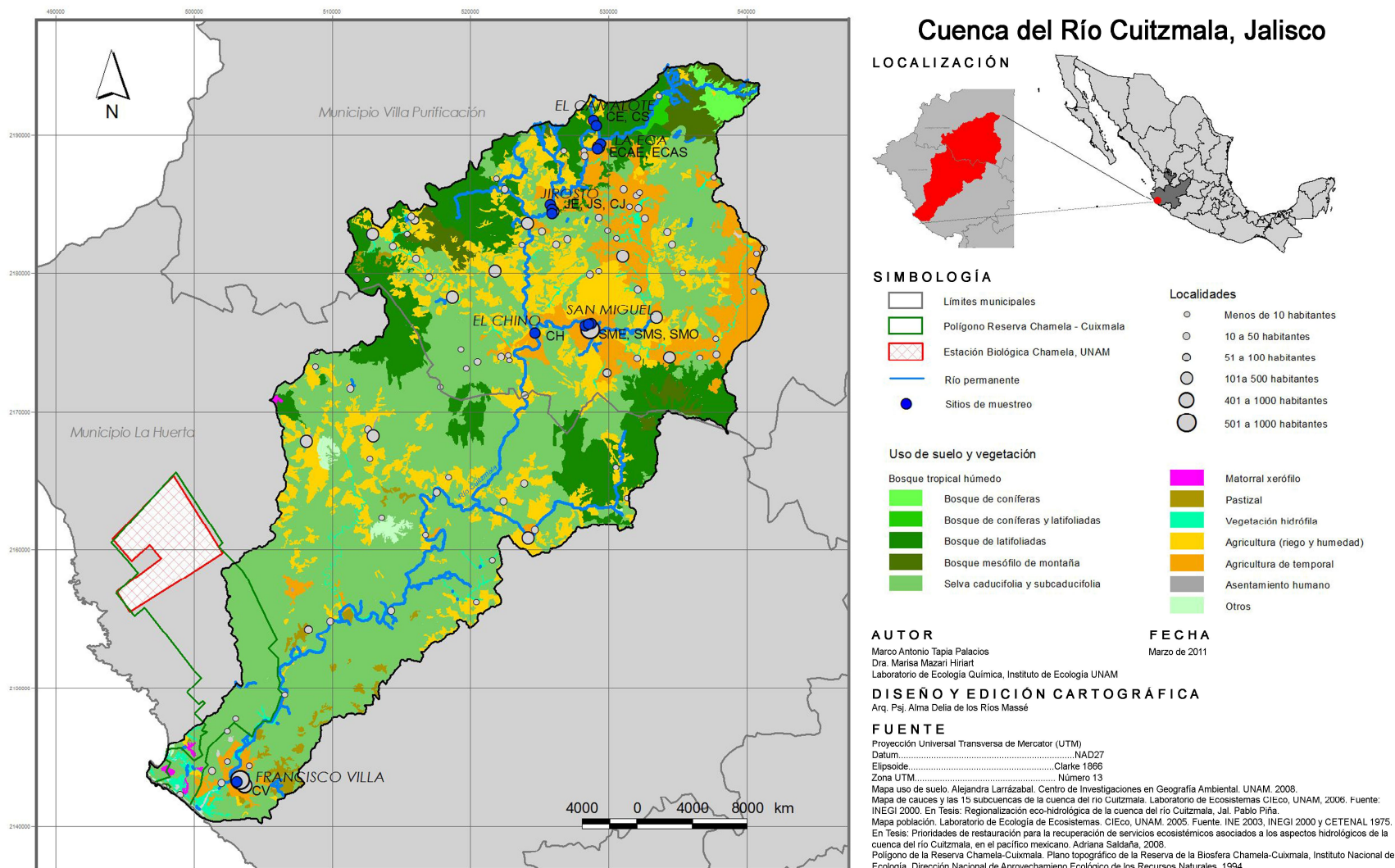


Figura 2. Uso de suelo y vegetación en la cuenca del río Cuitzmala, y sitios de muestreo.

## 6 MÉTODOS

### 6.1 Métodos de campo

La definición del sitio de estudio se realizó considerando los antecedentes del trabajo de López-Tapia (2008). Por ello se llevó a cabo un muestreo en un ciclo anual tomando en cuenta los principales cambios de temperatura y precipitación; lluvias (octubre 2009) y secas (mayo 2010). Se seleccionaron 12 sitios bajo criterios como: poblados que se asientan a las orillas del río y que por lo tanto podrían tener una aporte y exposición a la contaminación del mismo, el tamaño poblacional, agua residual de los poblados y sitios de aporte de agua por efluentes de los asentamientos humanos (Tabla 3). En los sitios con agua residual y con aporte de los asentamientos humanos se tomaron 2 L en frascos de polipropileno (Nalgene) estériles bajo condiciones estándar (autoclave 120°C/15-20 min), en los demás sitios se tomaron 10 ó 20 L de agua del río Cuitzmala en bidones de polipropileno (Nalgene) esterilizados con 5 mL/L de hipoclorito de sodio (Hycel al 6%), se dejó actuar por una hora con la finalidad de inactivar cualquier microorganismo y el cloro se inactivó con 1 g/L de Tiosulfato de sodio (J. T. Baker) durante toda la noche. Las muestras colectadas se transportaron al laboratorio para su concentración, entre 3 y 8 horas después de la toma de muestra (APHA, 2005).

Utilizando una sonda multiparámetros marca YSI (Modelo: 6600-M), en cada sitio se midieron parámetros fisicoquímicos complementarios como temperatura (T°C), pH, conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), oxígeno disuelto (mg/L) y sólidos disueltos totales (SDT mg/L). Adicionalmente en cada sitio se colectaron 250 mL de agua por triplicado en frascos de polipropileno (Nalgene) estériles bajo condiciones estándar para el análisis bacteriológico de coliformes fecales (CF) y enterococos fecales (EF).

El tipo de agua fue categorizado como agua superficial para todos aquellos sitios que tenían agua del río Cuitzmala, y agua con aportes residuales a los sitios que poseen agua residual o canales de desagüe.

Tabla 3. Sitios de muestreo en la cuenca del río Cuitzmala, Jalisco

<b>Nombre del sitio</b>	<b>Clave</b>	<b>Volumen. Total (L)</b>
<b>Agua del Río Cuitzmala</b>		
Camalote entrada	CE	10
Camalote salida	CS	10
La Eca entrada	ECAE	10
La Eca salida	ECAS	20
Jirosto entrada	JE	10
Jirosto salida	JS	10
San Miguel entrada	SME	10
San Miguel salida	SMS	10
El Chino	CH	10
<b>Agua con aportes residuales</b>		
Canal Jirosto	CJ	2
Canal Francisco Villa	CV	2
Laguna de oxidación San Miguel	SMO	2

Nota: el volumen total tomado dependió de la turbidez del agua.

## **6.2 Métodos de laboratorio**

### **6.2.1 Análisis bacteriológico**

El método estándar utilizado para llevar a cabo el análisis bacteriológico fue filtración a través de membrana y cultivo en medios selectivos para cada grupo bacteriano (APHA, 2005). Para su cuantificación se seleccionaron aquellas cajas que presentaran colonias visibles y de coloración correspondiente para cada grupo bacteriano (CF color azul oscuro, EF color rojo metálico). Los conteos se reportaron como unidades formadoras de colonia por cada 100 mL (UFC/100mL).

### **6.2.2 Concentración de muestras de agua**

#### **6.2.2.1 Ultrafiltración.**

Las muestras de 2, 10 y 20 L fueron concentradas por medio de la técnica de ultrafiltración modificada de Polaczyk y colaboradores (2008). Se utilizaron filtros de polisulfona F80A (Fresenius, Medical Care, Lexington, MA), con los cuales se montó un sistema de filtración de flujo continuo (Figura 3) utilizando una bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer Instrument Company), para obtener un flujo de 1700 mL/min.

Previamente, el cartucho fue bloqueado al promover una carga electronegativa en las fibras de polisulfona por medio de la recirculación de una solución de polifosfato de sodio (1g de NaPP/L) por 30 minutos; con esto se evita la adsorción de partículas de las muestras de agua en las fibras de polisulfona. A cada muestra se le agregó directamente 1g de NaPP por cada litro de agua como desagregante. El volumen final de cada muestra concentrada fue aproximadamente 100 mL y separada en tubos de centrifuga de 50 mL.

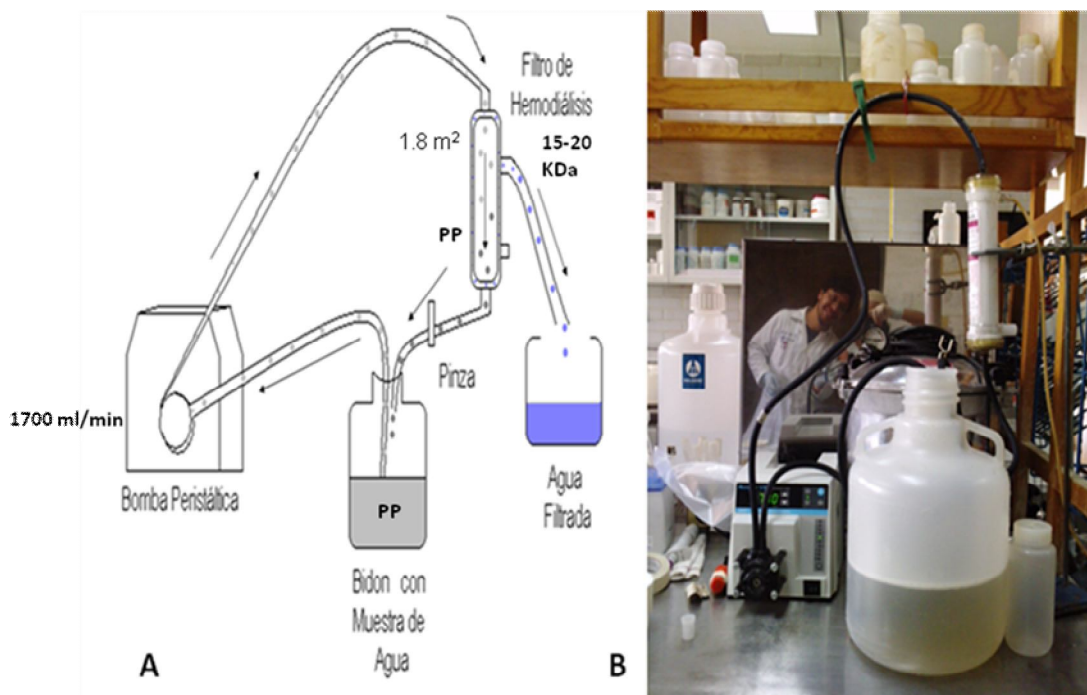


Figura 3. A: esquema del sistema de ultrafiltración de flujo continuo (modificado de Rangel-Martínez 2010); B: foto del sistema montado.

### 6.2.2.2 Centrifugación

Se tomaron 50 mL de los concentrados obtenidos por ultrafiltración y se centrifugaron a 3,000 rpm (Centra CL3R, Thermo IEC) por 15 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió con 3 mL de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) estéril al 1% y se separó en tres partes iguales (1 ml) en tubos tipo eppendorf 1.5 mL, para la posterior identificación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*. Las muestras se almacenaron a -20°C con glicerol al 1% hasta su análisis.



### 6.2.2.3 Detección y cuantificación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* por Inmunofluorescencia

Las muestras concentradas se analizaron con la técnica de inmunofluorescencia indirecta en fase líquida, modificada del trabajo de Rangel-Martínez (2010). El protocolo se describe a continuación:

1. Se descongela la muestra (1 mL) concentrada a temperatura ambiente.
2. Se preparan controles positivo y negativo con 15  $\mu$ L de los controles incluidos en el kit comercial (Merifluor *Cryptosporidium/Giardia*. Meridiam Bioscience, Inc.) en tubos tipo eppendorf de 1.5 mL.
3. Se centrifuga durante 2 minutos a 3,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
4. Se bloquea el concentrado con 500  $\mu$ L albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) (Amresco) al 1% en PBS, se homogeniza y se incuba por 1.5 horas a temperatura ambiente.
5. Se centrifuga durante 2 minutos a 3,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
6. Se agregan 500  $\mu$ L del primer anticuerpo (mouse monoclonal IgG Anti-*Cryptosporidium parvum* 7631, mouse monoclonal IgG<sub>3</sub> Anti-*Giardia lamblia* BDI27; Santa Cruz Biotechnology) en una concentración de 1:100 en PBS 1%, se homogeniza y se incuba a 4°C durante toda la noche.
7. Se centrifuga durante 2 minutos a 3,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
8. Se agregan 500  $\mu$ L de buffer de lavado 1x (Merifluor *Cryptosporidium/Giardia*. Meridiam Bioscience, Inc.), se homogeniza, y se centrifuga durante 2 minutos a 3,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
9. Se agregan 500  $\mu$ L del segundo anticuerpo (anticuerpo conjugado con fluoresceína, AffiniPuse Rabbit Anti-mouse IgG, Jacobson Inmuno Research) en una concentración de 1:200 en PBS 1%, se homogeniza y se incuba a 37°C por 1.5 horas en obscuridad. Todos los siguientes pasos se hacen en obscuridad o lo más protegido de la luz que se pueda.
10. Se centrifuga en durante 2 minutos a 3,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
11. Se agregan 500  $\mu$ L de buffer de lavado, se homogeniza, y se centrifuga durante 2 minutos a 3,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
12. Se agregan 500  $\mu$ L de Ioduro de Propidio (10/ml; Santa Cruz Biotechnology) en una concentración de 1:100 en PBS 1%, 500  $\mu$ L de DAPI (BioGenex, San Ramon, California) en una concentración de 1:100 en PBS 1%, se homogeniza e incuba a 37°C por 30 minutos.
13. Se centrifuga durante 2 minutos a 3,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
14. Se hacen tres lavados con 500  $\mu$ L de buffer de lavado, se homogeniza, y se centrifuga durante 2 minutos a 3,000 rpm y se elimina el sobrenadante.

15. Se agregan 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1%, se homogeniza y se centrifuga 3 minutos a 3000 rpm y se decanta dejando el doble de PBS con respecto al tamaño de la pastilla
16. Protegido de la luz se ponen en un portaobjetos 15  $\mu\text{L}$  de la muestra, 15  $\mu\text{L}$  del control positivo y 15  $\mu\text{L}$  del control negativo por separado. Se dejan secar a temperatura ambiente, se agrega una gota de medio de montaje (40% Tris Buffer Saline más 60% Glicerol) y se sella el cubreobjetos con barniz transparente. Esto se repite con toda la muestra hasta que se termine.
17. Se observan y cuantifican las formas esféricas de los ooquistes con una coloración verde manzana de *Cryptosporidium parvum* (4-6  $\mu\text{m}$ ) y los quistes ovalados con una coloración verde manzana de *Giardia lamblia* (8-12  $\mu\text{m}$ ).

### 6.3 Criterios de Inclusión

En el trabajo de Smith y Rose (1990) recomiendan cuatro criterios para la identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras ambientales con anticuerpos fluorescentes, esos mismos criterios se consideraron en este trabajo, y se aplicaron a ambas especies:

1. Pared bien definida del (oo)quiste de cada especie.
2. Forma: *C. parvum* esférica; *G. lamblia* ovalada.
3. Tamaño: *C. parvum* 4-6  $\mu\text{m}$ ; *G. lamblia* 8-12  $\mu\text{m}$ .
4. En el caso de *C. parvum* existe un plegamiento en la pared del ooquiste que puede verse en algunos casos

### 6.4 conteo de la muestra de parásitos

Para el conteo de la cantidad de (oo)quistes en las muestras se utilizó un microscopio de fluorescencia E600 Eclipse, Nikon. Se hizo un barrido total de cada placa (portaobjetos) empezando de derecha a izquierda (Figura 4), con un aumento de 20X y 40X, en algunos casos donde la nitidez era baja se utilizó el aumento de 100X para la confirmación. El número de (oo)quistes por litro fue calculado de la siguiente manera: [No. de (oo)quistes \* No. de tubos de centrifuga] / [vol. original de la muestra]

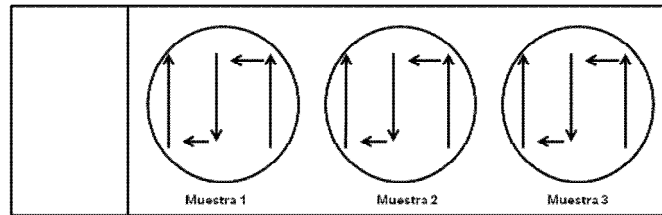


Figura 4. Esquema del barrido de las muestras.

## 6.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa Statgraphics Centurion XV.I 2006. Fue necesario transformar los datos microbiológicos a logaritmos base 10 para poder compararlos, debido a que existe mucha variación en los datos, es decir los conteos pueden variar desde 0 hasta varias unidades logarítmicas, dificultando el análisis de los datos crudos. Los datos por debajo del límite de detección fueron reemplazados con 0.1 en vez de cero. Se realizaron pruebas de t de Student para comparar los datos entre temporadas y entre tipos de agua. Se realizó un análisis de correlación multivariado para establecer las posibles relaciones entre los diferentes parámetros medidos en el agua del río Cuitzmala. El límite de detección para CF y EF es de 1 UFC/100 mL, mientras que el límite de detección para *C. parvum* y *G. lamblia* fue de 1 ooquistes/mL.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Parámetros fisicoquímicos

El pH (Figura 5) mostró una ligera variación a lo largo del río durante la época de lluvias, pero en un intervalo neutro (cercano a 7), teniendo su punto más bajo en ECAE (6.9) y su punto máximo en CH (7.8). En la época de secas los valores de pH fueron ligeramente mayores en la mayoría de los sitios, excepto en CH (7.9) y CJ (7.2).

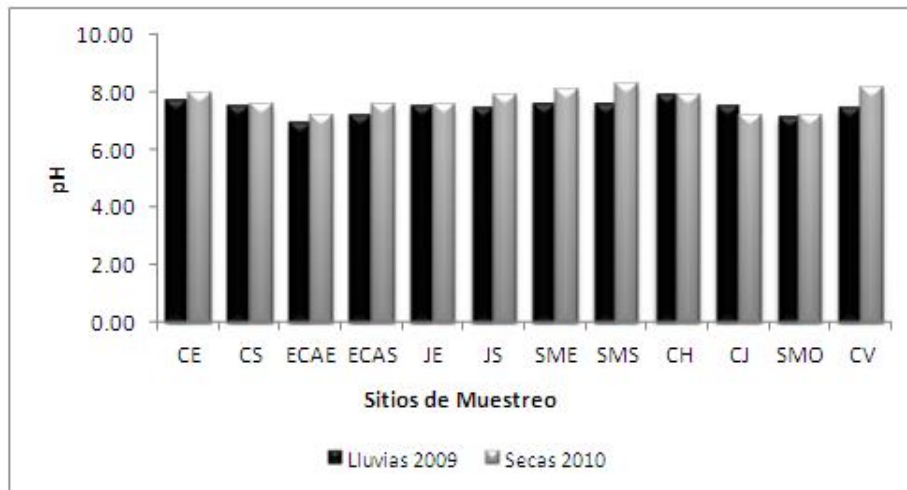


Figura 5. Variación temporal del pH a lo largo del río Cuitzmala, Jalisco.

Ambas temporadas presentan aguas cálidas (Figura 6), durante la época de lluvias el valor mínimo se presentó en ECAE (22.9°C) y el máximo en CV (29.8°C), el cual presento la temperatura más alta de todos los sitios. La variación para la temporada de secas a lo largo del río, fue de 21.4°C para CE y JE hasta temperaturas de 29.3°C y 29.4°C en SME y SMS respectivamente. La temperatura máxima registrada en los sitios de muestreo se presentó en CV (31.7°C).

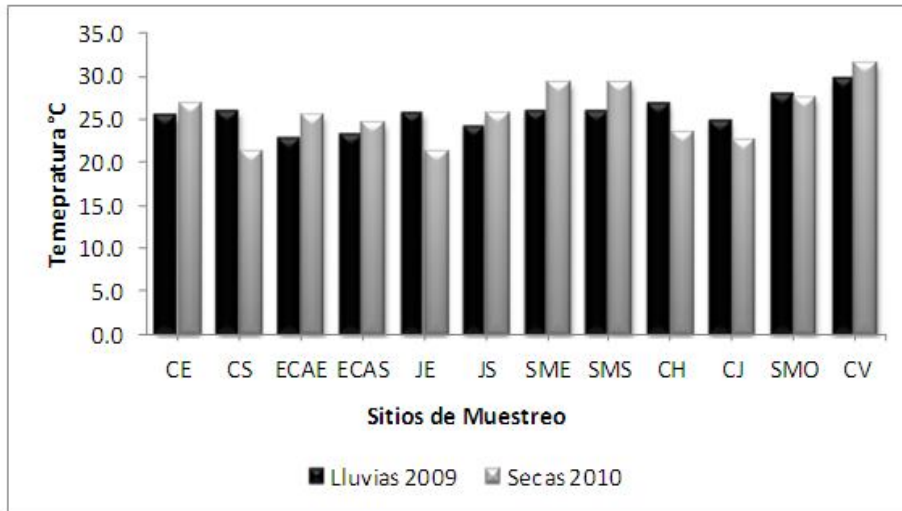


Figura 6. Variación temporal de la temperatura (°C) a lo largo del río Cuitzmala, Jalisco.

Los valores de conductividad muestran un agua mineralizada en ciertos puntos del río, la variación durante la época de lluvias fue mínima (Figura 7) a excepción de valores de 761 a 1743  $\mu\text{S/cm}$  registrados para SMO y CV respectivamente. En la época seca hubo un incremento de la conductividad en casi todos los sitios, los valores más altos los presentaron SMO y CV (1347 y 1208  $\mu\text{S/cm}$  respectivamente). Por el contrario el sitio con el valor menor de conductividad para ambas temporadas fue ECAE.

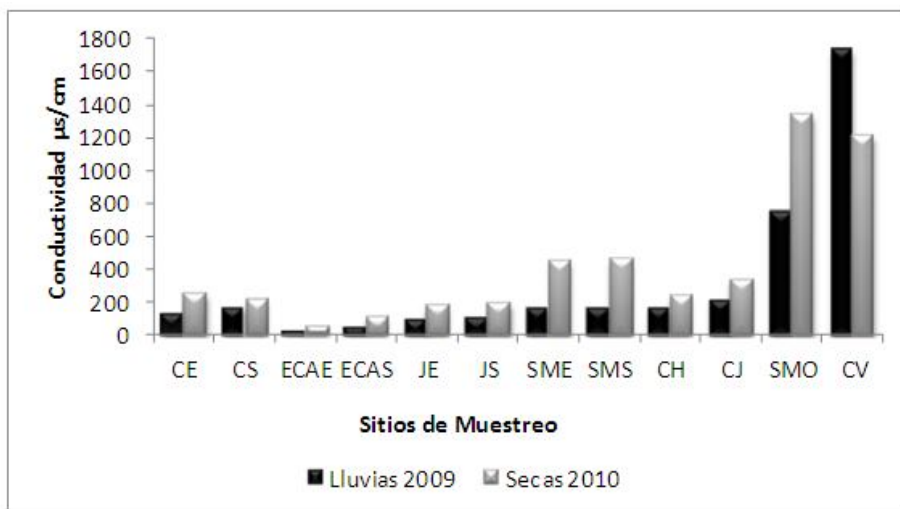


Figura 7. Variación temporal de la conductividad a lo largo del río Cuitzmala, Jalisco

Los valores de oxígeno disuelto (Figura 8) para la época de lluvias mostraron poca variación en los distintos sitios del río, a excepción de SMO y CV que presentaron los valores más bajos para este parámetro (1.32 y 3.30 mg/L respectivamente). En la época seca hubo un

incremento del oxígeno disuelto en todos los sitios, con excepción de CJ (5.44 mg/L); el valor más bajo lo presentó SMO (1.32 mg/L) y el valor más alto fue SMS (14.75 mg/L).

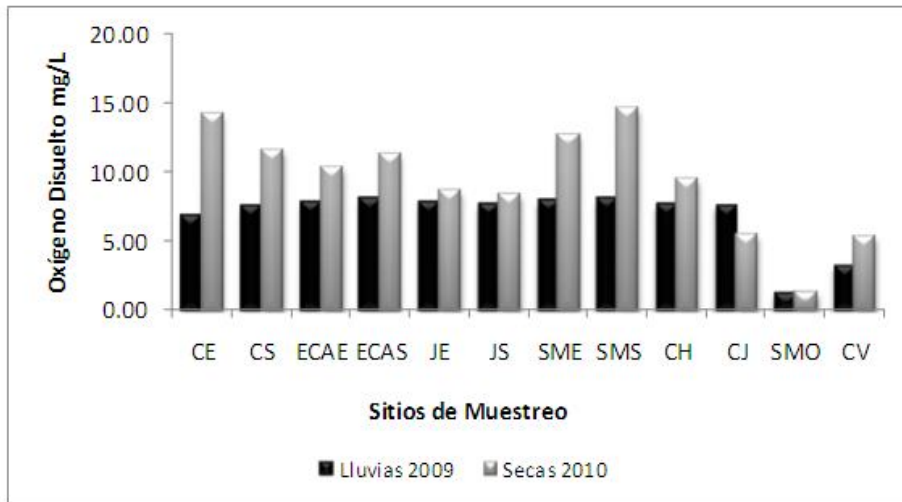


Figura 8. Variación temporal del oxígeno disuelto en el río Cuitzmala, Jalisco.

Los valores de los SDT (Figura 9) en la época de lluvias se mantienen poco variables en la mayoría de los sitios, con excepción de CS (1000 mg/L) que presentó el valor más alto para este parámetro en ambas épocas. En la época seca los SDT se incrementaron en casi todos los sitios con excepción de CS y CH. SMO y CV presentaron los valores más altos de SDT en la época seca. ECAE presentó los valores más bajos de SDT en ambas épocas.

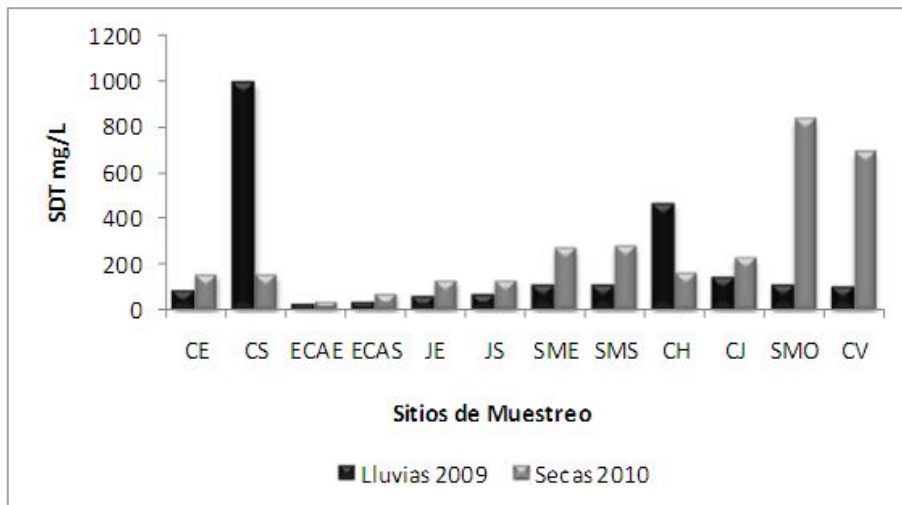


Figura 9. Variación temporal de los sólidos disueltos totales en el río Cuitzmala, Jalisco.

## 7.2 Parámetros biológicos

### 7.2.1 Bacterias

Los conteos de CF en la mayoría de los sitios (con excepción de JS y SMS) sobrepasaron lo sugerido por la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 (DOF, 1997). El sitio del río Cuitzmala que presentó el conteo más alto de CF (Figura 10) en ambas épocas fue SMO ( $5.77 \times 10^5$  UFC/100 mL en lluvias,  $6.85 \times 10^6$  UFC/100 mL en secas), mientras que el conteo más bajo en lluvias fue JS (511 UFC/100mL) y en secas fue SMS (159 UFC/100 mL). En CS no se detectaron CF en la época de lluvias.

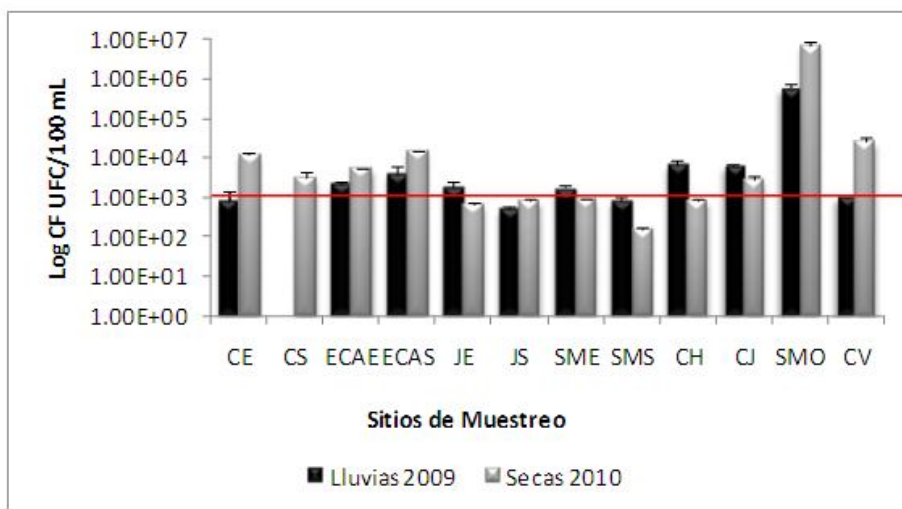


Figura 10. Variación temporal de coliformes totales en el río Cuitzmala, Jalisco. N=72.

Los conteos de EF (Figura 11) en época de lluvias presentaron valores más elevados que en la época seca en casi todos los sitios, a excepción de JS (406 UFC/100 mL). Los sitios con conteos más bajos en época de lluvias fueron CS, ECAE y ECAS (727, 709 y 735 UFC/100 mL, respectivamente), y para la época seca fue SMS (40 UFC/100 mL); por otro lado el sitio con conteos más altos en ambas épocas fue SMO ( $4.59 \times 10^5$  UFC/100 mL en lluvias y  $2.08 \times 10^5$  UFC/100 mL en secas). ECAE, JE, SME, CH y CV no se detectaron EF para la época de secas.



Figura 11. Variación temporal de enterococos fecales en el río Cuitzama, Jalisco.

Con la finalidad de conocer el grado de contaminación fecal (Tabla 4) en el río Cuitzama se utilizó el sistema de clasificación de Kavka *et al.* (2006). Los resultados muestran que los conteos de CF y EF se encuentran primordialmente en la clase II y III (moderado-crítico).



Tabla 4. Sistema de clasificación de calidad de agua, basado en parámetros bacteriológicos según el grado de contaminación fecal en 100 mL.

<b>Clases</b>					
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>
<b>Parámetros</b>	<b>Baja</b>	<b>Moderada</b>	<b>Critica</b>	<b>Fuerte</b>	<b>Excesiva</b>
CF	≤100	>100-999	>1,000-9,999	>10,000-99,999	>100,000
EF	≤40	>40-400	>400-4,000	>4,000-40,000	>40,000
<b>Sitios</b>					
CE		LI <sup>CF</sup>	LI <sup>EF</sup> , S <sup>EF</sup>	S <sup>CF</sup>	
CS	S <sup>EF</sup>		LI <sup>EF</sup> , S <sup>CF</sup>		
ECAE			LI <sup>CF, EF</sup> , S <sup>CF</sup>		
ECAS			LI <sup>CF, EF</sup> , S <sup>EF</sup>	S <sup>CF</sup>	
JE		S <sup>CF</sup>	LI <sup>CF, EF</sup> , S <sup>EF</sup>		
JS		LI <sup>CF</sup> , S <sup>CF</sup>	LI <sup>EF</sup>		
SME		S <sup>CF</sup>	LI <sup>CF, EF</sup>		
SMS	S <sup>EF</sup>	LI <sup>CF</sup> , S <sup>CF</sup>	LI <sup>EF</sup>		
CH		S <sup>CF</sup>	LI <sup>CF, EF</sup>		
CJ	S <sup>EF</sup>		LI <sup>CF</sup> , S <sup>CF</sup>	LI <sup>EF</sup>	
SMO					LI <sup>CF, EF</sup> , S <sup>CF, EF</sup>
CV	LI <sup>CF</sup>		LI <sup>EF</sup>	S <sup>CF</sup>	

LI: época de lluvias; S: época de secas; CF: coliformes fecales; EF: enterococos fecales.  
Modificado de Kavka *et al.* 2006.

Para conocer el posible origen de la fuente de contaminación microbiológica se utilizó el cociente CF/EF (Tabla 5).

Tabla 5. Cociente CF/EF para aproximarse al origen de la contaminación. Geldreich y Kenner, 1969.

<b>Cociente CF/EF</b>	<b>Fuente de contaminación</b>
>4	Fuerte evidencia de que la contaminación es de origen humano
2.0-4.0	Buena evidencia de la predominancia de desechos humanos en mezcla de contaminantes
0.7-2.0	Buena evidencia de la predominancia de desechos de animales domésticos en mezcla de contaminantes
<0.7	Fuerte evidencia de que la contaminación es de origen animal

De manera que los sitios que muestran una posible contaminación principalmente de origen humano son ECAE, ECAS y CH en la época de lluvias. En la época de secas solo JS no tiene un origen completamente humano (Tabla 6).

Tabla 6. Posibles fuentes de contaminación fecal (CF/EF) en sitios de muestreo en el río Cuitzmala, Jalisco.

<b>Sitios de Muestreo</b>	<b>Época de Lluvias</b>	<b>Época de secas</b>
	<b>CF/EF</b>	<b>CF/EF</b>
CE	0.50	11.7
CS	0	117.8
ECAE	3.20	4
ECAS	5.56	11.3
JE	1.82	4
JS	0.21	2.0
SME	1.27	4
SMS	0.66	46.9
CH	6.27	4
CJ	0.62	86.4
SMO	1.26	33.0
CV	0	4

## 7.2.2 Protozoarios

En diversas muestras de agua se observaron las formas quísticas de *G. lamblia* (Figura 12A) y las formas ooquisticas de *C. parvum* (Figura 12B).

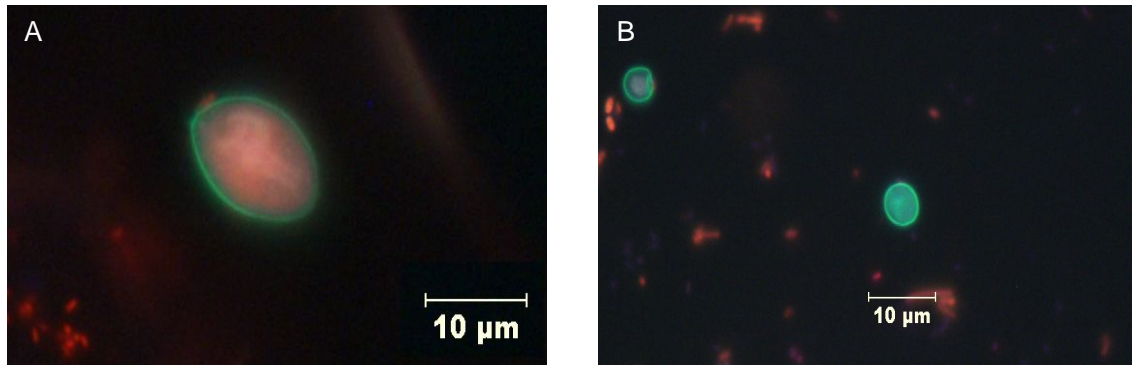


Figura 12. Formas quísticas y ooquisticas detectadas por fluorescencia. A: *Giardia lamblia* 100X. B: *Cryptosporidium parvum* 100X

El sitio con mayor número de ooquistes de *C. parvum* (Figura 13) para las dos épocas fue SMO con 87 ooquistes/L en lluvias y 54 ooquistes/L en secas; en los sitios CE, ECAS, JS Y CH no se detectaron ooquistes de *C. parvum* en la época de lluvias.

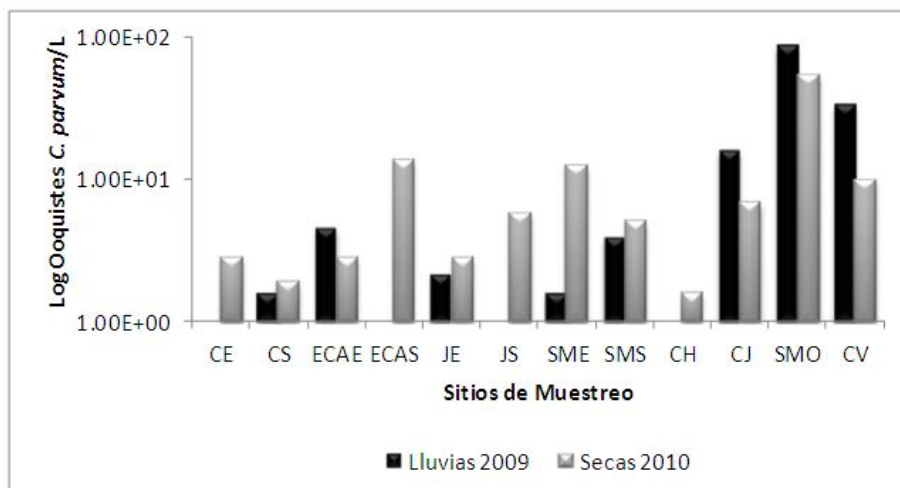


Figura 13. Variación temporal de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en el río Cuitzmala, Jalisco.

En la época de lluvias para los sitios CE, ECAE, JE y CV no se detectaron quistes de *G. lamblia* (Figura 14). SMO fue el sitio con mayor número de quistes en ambas temporadas con 54 quistes/L en lluvias y 2,655 quistes/L en secas. En la época seca hubo un incremento en la cantidad de quistes de *G. lamblia* en la mayoría de los sitios.

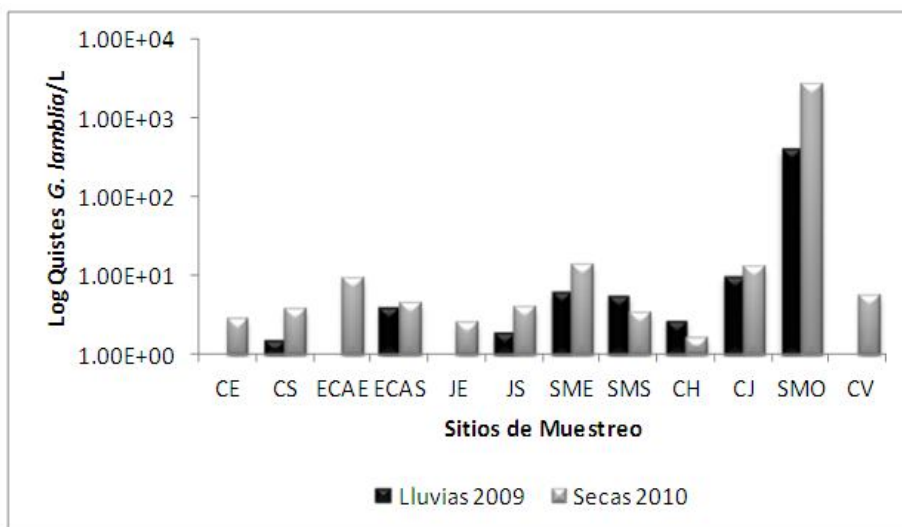


Figura 14. Variación temporal de quistes de *Giardia lamblia* en el río Cuitzmala, Jalisco.

*Cryptosporidium parvum* se encuentra presente en ambas épocas y en los diferentes tipos de agua; en ambas temporadas se presentó en todos los sitios con aportes residuales; en secas *C. parvum* se encontró presente en todos los sitios. *Giardia lamblia* también se identificó en ambas temporadas, en lluvias se presentó en las salidas de los poblados; *G. lamblia* se observó en todos los sitios durante la época seca (Tabla 7).

Tabla 7. Quistes y ooquistes detectados en río Cuitzmala, Jalisco.

Sitios	<i>Cryptosporidium parvum</i>		<i>Giardia lamblia</i>	
	Lluvias 2009	Secas 2010	Lluvias 2009	Secas 2010
Camalote entrada	-	+	-	+
Camalote salida	+	+	+	+
La ECA entrada	+	+	-	+
La ECA salida	-	+	+	+
Jirosto entrada	+	+	-	+
Jirosto salida	-	+	+	+
Canal Jirosto*	+	+	+	+
San Miguel entrada	+	+	+	+
San Miguel salida	+	+	+	+
Laguna de oxidación de San Miguel*	+	+	+	+
El Chino	-	+	+	+
Canal Francisco Villa*	+	+	-	+

El límite de detección en las muestras fue de 0.6 (oo)quistes/L, por lo tanto los valores menores de 0.6 significa que no se lo detectaron (oo)quistes, por lo tanto, se consideran ausentes. Presencia (+), ausencia (-). Sitios con aportes residuales (\*).

### 7.3 Análisis estadísticos

#### 7.3.1 Comparación de medias (Prueba de *t* de Student)

De acuerdo con los resultados obtenidos de la prueba de *t* para la comparación de las dos épocas (Tabla 8), el OD no mostró diferencias significativas entre épocas ( $p < 0.05$ ) aunque el valor fue muy cercano ( $p = 0.053$ ). El comportamiento fue similar para el pH, la temperatura, la conductividad y los sólidos disueltos totales ya que no presentaron diferencias significativas entre épocas. En cuanto a los indicadores microbiológicos, CF y EF mostraron diferencias significativas entre épocas ( $p < 0.05$ ); la prueba de F también mostró diferencias significativas para ambos parámetros ( $p = 0$ ). Aunque *G. lamblia* y *C. parvum* no presentaron diferencias significativas entre épocas; al realizar la prueba de F para *C. parvum* se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.04$ ).

Estos resultados sugieren que los CF, EF y *C. parvum* no presentan una distribución normal, lo cual es comprensible si se toma en cuenta que existen sitios con aportes directos al río de aguas residuales, y por lo tanto en cierto momento si se detectan picos de contaminación..

Tabla 8. Prueba de *t* para la comparación de la época de lluvias 2009 y la época de secas 2010 en el río Cuitzmala, Jalisco.

Parámetro	Media aritmética/geométrica Lluvias	Media aritmética/geométrica Secas	Prueba F Valor p	Prueba de <i>t</i> Valor p
<b>Parámetros Físicoquímicos</b>				
pH	7.49	7.73	0.1726	0.0921
Temperatura (°C)	25.84	25.83	0.0802	0.9880
Conductividad (µS/cm)	322.67	422.17	0.6320	0.5957
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.87	9.49	0.0634	0.0532
Sólidos disueltos totales (mg/L)	195.56	265.91	0.7063	0.5429
<b>Parámetros Biológicos</b>				
Coliformes fecales UFC/100mL	2268.16	4845	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>
Enterococos fecales UFC/100mL	2438.72	11	<b>0.0000000012</b>	<b>0.00000039</b>
<i>Giardia lamblia</i> (quistes/L)	1.31	5.86	0.5946	0.1282
<i>Cryptosporidium</i> <i>parvum</i> (ooquistes/L)	1.28	4.16	<b>0.0461</b>	0.1477

Los datos fueron transformados a logaritmos base 10 para el análisis de los parámetros biológicos. Adicionalmente los valores por debajo del límite de detección fueron sustituidos por 0.1 en lugar de 0. Se resaltan en negro los valores significativos.

Los resultados obtenidos del análisis entre tipo de agua con una prueba de *t* (Tabla 9), mostraron que la conductividad presenta diferencias significativas entre tipos de agua ( $p=0.00$ ), lo cual es consistente con los resultados de la prueba de F para este parámetro ( $p=0.00$ ). El oxígeno disuelto presentó diferencias significativas entre los tipos de agua ( $p=0.00$ ). El pH, la temperatura y los sólidos disueltos totales no presentaron diferencias

significativas entre tipos de agua. Con respecto a los parámetros microbiológicos los CF, *C. parvum* y *G. lamblia* presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tipos de agua, en contraste los resultados de la prueba de F no mostraron diferencias para *C. parvum* ( $p < 0.05$ ). En lo que respecta a EF los análisis mostraron que no hay diferencia significativa entre tipos de agua, lo cual no es sustentado por la prueba de F. Las inconsistencias entre las pruebas para Conductividad, CF, EF y *G. lamblia* sugieren que debe incrementarse la cantidad sitios de muestreo con aportes residuales.

Tabla 9. Prueba de *t* para la comparación entre los diferentes tipos de agua en el río Cuitzmala, Jalisco.

Parámetro	Agua superficial Media aritmética/geométrica	Aportes agua residual Media aritmética/geométrica	Prueba de F Valor p	Prueba de t Valor p
<b>Parámetros Fisicoquímicos</b>				
pH	7.66	7.46	0.5117	0.2449
Temperatura (°C)	25.2	27.45	0.2109	0.0820
Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	184.66	935.66	<b>0.00000038</b>	<b>0.000029</b>
Oxígeno disuelto (mg/L)	9.55	4.06	0.7842	<b>0.000088</b>
Sólidos disueltos totales (mg/L)	187.13	353.55	0.2613	0.1791
<b>Parámetros Biológicos</b>				
Coliformes fecales (UFC/100mL)	1192	19619	<b>0.0128</b>	<b>0.0014</b>
Enterococos fecales (UFC/100mL)	131	2155	<b>0.0468</b>	0.0889
<i>Giardia lamblia</i> (quistes/L)	1.9	26	<b>0.0047</b>	<b>0.0177</b>
<i>Cryptosporidium</i> <i>parvum</i> (ooquistes/L)	1.6	22.3	0.3661	<b>0.0002</b>

Los datos fueron transformados a logaritmos base 10 para el análisis de los parámetros biológicos. Adicionalmente los valores por debajo del límite de detección fueron sustituidos por 0.1 en lugar de 0. Se resaltan en negro los valores significativos.

### 7.3.2 Análisis de correlación (Análisis multivariado)

De acuerdo con el análisis de correlación para agua superficial (Tabla 10) el pH se relacionó significativamente ( $p < 0.05$ ) con la temperatura, la conductividad, el OD y los SDT ( $r = 0.600$ ,  $0.931$ ,  $0.497$  y  $0.693$  respectivamente). La conductividad se relacionó significativamente con el OD, y los SDT ( $r = 0.513$  y  $0.757$ ). Los CF mostraron una relación negativa con los SDT ( $r = -0.611$ ). Los EF no presentaron ninguna relación significativa con los parámetros medidos. *Cryptosporidium parvum* y *G. lamblia* presentaron una relación positiva con el OD ( $r = 0.582$  y  $0.490$  respectivamente).

En el análisis de correlación para aguas con aportes residuales (Tabla 11) se obtuvo la temperatura y el OD fueron los únicos parámetros fisicoquímicos que presentaron una relación entre ellos ( $r = 0.822$ ). Los EF mostraron una relación negativa con el pH ( $-0.838$ ). Los CF presentaron una relación positiva con *G. lamblia* ( $r = 0.921$ ). *Cryptosporidium parvum* presentó una relación negativa con el OD ( $r = -0.878$ ).



Tabla 10. Análisis de correlación para agua superficial.

Parámetros	EF		<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>		pH		Temperatura		Conductividad		OD		SDT	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	P	r	p	r	p	r	p
CF	0.0323	0.898	0.082	0.744	0.207	0.409	-0.104	0.678	-0.150	0.552	-0.256	0.305	0.242	0.332	<b>-0.611</b>	<b>0.007</b>
EF			-0.315	0.202	-0.318	0.198	-0.144	0.566	0.077	0.761	-0.239	0.338	-0.363	0.138	-0.049	0.845
<i>C. parvum</i>					0.335	0.173	0.171	0.496	0.220	0.378	0.250	0.317	<b>0.582</b>	<b>0.011</b>	-0.023	0.926
<i>G. lamblia</i>							0.259	0.299	0.250	0.315	0.345	0.159	<b>0.490</b>	<b>0.039</b>	0.170	0.498
pH									<b>0.600</b>	<b>0.008</b>	<b>0.931</b>	<b>0</b>	<b>0.497</b>	<b>0.035</b>	<b>0.693</b>	<b>0.001</b>
Temperatura											0.467	0.0505	0.306	0.215	0.424	0.079
Conductividad													<b>0.513</b>	<b>0.029</b>	<b>0.757</b>	<b>0</b>
OD															0.159	0.527

Para el análisis todos los datos microbiológicos fueron transformados a unidades logarímicadas base 10. Los valores inferiores al límite de detección se procesaron sustituyendo el valor de 0 por 0.1. Se resaltan en negro los valores significativos.

Tabla 11. Análisis de correlación para agua con aportes directos de aguas residuales.

Parámetros	EF		<i>C. parvum</i>		<i>G. lamblia</i>		pH		Temperatura		Conductividad		OD		SDT	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	P	r	p	r	p	r	p
CF	0.460	0.357	0.638	0.172	<b>0.921</b>	<b>0.003</b>	-0.317	0.540	0.205	0.695	0.295	0.569	-0.794	0.058	0.526	0.282
EF			0.789	0.061	0.507	0.304	<b>-0.838</b>	<b>0.036</b>	-0.265	0.611	-0.064	0.902	-0.652	0.160	-0.383	0.452
<i>C. parvum</i>					0.463	0.355	-0.473	0.342	0.361	0.481	0.457	0.362	<b>-0.878</b>	<b>0.021</b>	-0.191	0.715
<i>G. lamblia</i>							-0.502	0.169	-0.171	0.745	-0.059	0.910	-0.655	0.157	0.435	0.387
pH									0.596	0.211	0.210	0.688	0.548	0.259	0.329	0.523
TemperaturaT											<b>0.822</b>	<b>0.044</b>	-0.292	0.574	0.242	0.644
Conductividad													-0.557	0.250	0.314	0.543
OD															-0.116	0.826

Para el análisis todos los datos microbiológicos fueron transformados a unidades logarímicadas base 10. Los valores inferiores al límite de detección se procesaron sustituyendo el valor de 0 por 0.1. Se resaltan en negro los valores significativos.

## 7.4 Relación entre indicadores y patógenos

Con la finalidad de evaluar las relaciones entre bacterias indicadoras (CF y EF) y patógenos (*C. parvum* y *G. lamblia*) se realizó un análisis de las muestras positivas y las negativas para cada indicador (Tabla 12), con la finalidad de conocer la categoría de la relación de acuerdo con Harwood *et al.* (2005):

- Correcta. Ambos, indicador y patógenos se detectan o no se detectan.
- Falso positivo. Indicador-presente patógeno ausente.
- Falso negativo. Indicador-ausente patógeno presente.

Tabla 12. Categorías de análisis en la relación presencia-ausencia de indicadores fecales y protozoarios patógenos en el río Cuitzmala, Jalisco.

Sitios	Indicador		Patógeno		Categoría de análisis
	CF	EF	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Giardia lamblia</i>	
<b>Lluvias 2009</b>					
CE	+	+	-	-	Falso positivo
CS	-	+	+	+	Correcta
ECAE	+	+	+	-	Correcta
ECAS	+	+	-	+	Correcta
JE	+	+	+	-	Correcta
JS	+	+	-	+	Correcta
SME	+	+	+	+	Correcta
SMS	+	+	+	+	Correcta
CH	+	+	-	+	Correcta
CJ	+	+	+	+	Correcta
SMO	+	+	+	+	Correcta
CV	+	+	+	-	Correcta
<b>Secas 2010</b>					
CE	+	+	+	+	Correcta
CS	+	+	+	+	Correcta
ECAE	+	-	+	+	Correcta
ECAS	+	+	+	+	Correcta
JE	+	-	+	+	Correcta
JS	+	+	+	+	Correcta
SME	+	-	+	+	Correcta
SMS	+	+	+	+	Correcta
CH	+	-	+	+	Correcta
CJ	+	+	+	+	Correcta
SMO	+	+	+	+	Correcta
CV	+	-	+	+	Correcta

## 8 DISCUSIÓN

### 8.1 Parámetros fisicoquímicos

La variación del pH en el agua del río Cuitzmala (octubre 2009 y mayo 2010) fue mínima y siempre en un intervalo cercano a la neutralidad, lo que es importante para el desarrollo de muchos organismos acuáticos (CCREM, 1999).

En este trabajo se encontró que en los sitios que tienen aportes de aguas residuales el pH no se incrementa de manera significativa, a pesar de que se está reportado que en agua residual el pH tiende a ser alcalino ( $>8.5$ ) por el efecto de la fotosíntesis y la alta concentración de nutrientes que posee (Tadesse *et al.* 2004). El aumento ligero en los valores de pH en el río Cuitzmala se debe posiblemente al efecto de concentración de nutrientes en la época de secas.

Ouyang *et al.* (2006) menciona que el pH en agua superficial puede tener relaciones con diferentes parámetros dependiendo de la estacionalidad, en este trabajo no se analizó si existían relaciones entre el pH y otros parámetros dependiendo de la estacionalidad debido a que consideramos que el pH no es un factor que esté influyendo directamente en la calidad del agua del río, debido a que se relaciona con la cantidad de iones y sales disueltos en el agua.

Los variaciones de temperatura reportadas en ésta investigación no presentaron diferencias significativas que hagan evidente que las variaciones meteorológicas (estacionalidad) y aporte de agua residual modifiquen la temperatura media del agua. Meléndez (1999) describe que el comportamiento de la temperatura atmosférica para la cuenca del río Cuitzmala es homogéneo ( $24-28^{\circ}\text{C}$ ) en la mayor parte de la cuenca, por lo que esperábamos que la temperatura promedio del agua superficial también fuera homogénea.

La temperatura presentó una relación con el pH debido quizás a la concentración de iones durante la época seca. En el trabajo de Ouyang y colaboradores (2006), la temperatura tuvo una relación con el OD pero solo durante la temporada de invierno ( $r=0.638$ ); en su trabajo también mostró que existe una relación entre la temperatura y la conductividad en la época de lluvias pero de forma negativa dada principalmente por el efecto de dilución.

Por otro lado la temperatura presentó una correlación con la conductividad en el agua con aportes residuales, debido a que en estos microambientes al existir un mayor aporte de nutrientes la actividad microbiológica aumenta, y por consiguiente también se incrementa la temperatura. Tadesse *et al.* (2004) concluye que la temperatura es uno de los factores con mayor efecto en las variaciones entre el pH y el OD.

Al promediar los valores de conductividad de ambas temporadas encontramos un incremento gradual de manera longitudinal que puede ser explicado por la acumulación de

partículas que arrastra el río, y un efecto puntual propiciado por CE, CS y los sitios con aportes residuales.

El análisis estadístico para la conductividad no mostró diferencias significativas entre épocas, sin embargo, el incremento registrado en la época seca puede deberse al efecto de concentración por evaporación del agua, y además al no haber precipitación, pudo predominar el intercambio superficial (López-Tapia, 2008). Las diferencias significativas de la conductividad entre agua superficial y agua con aportes residuales, pueden deberse a la cantidad de iones y partículas inorgánicas que pueden aportar los desechos domésticos. De acuerdo con lo descrito por APHA (2005) los valores de conductividad mostrados, están por debajo de los valores correspondientes a desechos domésticos (1000-10000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), con excepción de SMO y CV, ambos son sitios que presentan agua con aportes residuales.

Contrario a lo descrito por Ouyang *et al.* (2006), en nuestro trabajo la relación de la conductividad con el OD en agua superficial fue positiva. Estos resultados sugieren que es necesario continuar con el monitoreo de éstos parámetros, con la finalidad de comprender mejor los patrones que rigen cada ambiente.

Al promediar los valores del OD se encontró una ligera disminución de manera longitudinal, siendo los sitios con aportes residuales los que presentaron los valores inferiores. Ésta disminución se debe probablemente a un aumento en la concentración de contaminantes que propicien el consumo de oxígeno, que también es favorecida por una menor pendiente y en consecuencia una menor turbulencia.

La concentración de OD aumentó en la época seca, aunque no mostró diferencias significativas entre épocas. Estos resultados son contrarios a los descritos por López-Tapia (2008), en su trabajo la concentración de OD fue menor en la época seca. La concentración de oxígeno en el agua depende de los factores que modifican su solubilidad, como pueden ser la temperatura y cantidad de materia orgánica, entre otros. Una mayor temperatura disminuye la solubilidad del oxígeno, por otro lado este aumento de temperatura puede crear un efecto de concentración en el agua por evaporación, concentrando la cantidad de materia disponible para los microorganismos fotosintéticos resultando en un aumento en la concentración del OD (CCREM, 1999). En la época de lluvias pudo predominar un efecto de arrastre de materia que favorece el consumo de  $\text{O}_2$  por microorganismos aerobios y por lo tanto disminuye la cantidad de OD.

Las diferencias entre tipos de agua pueden deberse a que en el agua con aportes residuales existe mucha materia que puede ser oxidable (desechos fecales principalmente) y microorganismos aerobios que consumen este oxígeno. Cabe mencionar que la CCREM (1999) menciona que el intervalo óptimos para el desarrollo de la vida acuática están entre los 6-9 mg/L de OD; en la época seca solo JE y JS no sobrepasaron los 9 mg/L.

En cuanto al análisis de correlación para agua superficial nosotros esperábamos que hubiese una relación negativa entre en OD y la temperatura, por lo contrario, ésta relación

fue positiva. Nnane *et al.* (2011) encontró una relación muy fuerte entre el OD y la temperatura (-0.803), y menciona que éstas relaciones son interdependientes. En el agua con aportes residuales esta relación si es negativa pero no significativa, lo que sugiere que en CJ las descargas de agua residual podrían ser intermitentes, y por lo tanto no se comporta como los otros dos sitios en el cual el aporte es más constante.

De la misma manera, si promediamos ambas temporadas los SDT se incrementan ligeramente de manera longitudinal, siendo CS, SMO y CV los que presentaron los valores más altos. El incremento en los valores de los SDT se explica quizás por el acarreamiento y acumulación de materiales propiciado por el gradiente longitudinal y los asentamientos humanos y animales.

Los SDT no mostraron diferencias significativas entre épocas, en secas hubo un incremento de los SDT en casi todos los sitios, debido quizás a un efecto de concentración. CS y CH presentaron valores más altos de SDT en la época de lluvias; estas diferencias pueden ser explicadas por el acarreamiento de sólidos ó material particulado que traen consigo las lluvias, en el caso de CS ese aporte es principalmente ganadero, en el caso de CH es un sitio donde se juntan el río Jirosto y el río San Miguel. En la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 (DOF, 1997) el valor promedio de SDT para la protección de la vida acuática es de 40-60 mg/L, con base a este intervalo solo ECAE y ECAS presentan valores inferiores.

En cuanto al análisis por tipo de agua los SDT no mostraron diferencias significativas. SMO y CV presentaron valores altos de SDT en la época seca debido posiblemente a una acumulación y estancamiento de agua que existía en esos sitios por la evaporación.

De acuerdo con APHA (2005) los SDT presentan una fuerte relación con el pH y la conductividad debido a que están compuestos de la suma de los cationes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ) y aniones principales ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), que pueden concentrarse por la evaporación y/o acarreamiento de los mismos por las lluvias. Este fenómeno puede verse reflejado en el análisis de correlación para agua superficial, en donde los SDT mostraron una relación positiva con el pH y la conductividad. En el agua con aportes residuales no existió una relación entre los SDT y los demás parámetros fisicoquímicos, debido probablemente al tamaño de muestra y como se mencionó con anterioridad a que CJ parece ser un sitio con descargas intermitentes, de tal manera que no se comporta como SMO y CJ.

## 8.2 Parámetros microbiológicos

### 8.2.1 Bacterias

Como resultado del análisis para comparar la cantidad de CF entre épocas, se encontraron diferencias significativas, siendo la época seca la de conteos más altos. López-Tapia (2008) reporta conteos promedio de CF mucho más bajos que los presentados en ésta investigación, sin considerar los sitios con aportes de aguas residuales, es importante aclarar que en éste trabajo los sitios de muestreo se encuentran más cerca de los poblados, por lo que presentan una mayor grado de influencia. Este incremento en los conteos de CF puede estar reflejando que las actividades humanas están teniendo una influencia mayor sobre la calidad microbiológica del agua.

López-Tapia (2008) reporta que la época de lluvias fue la que presentó los mayores conteos de CF debido principalmente al arrastre de material fecal; de manera contraria en ésta investigación la época seca fue la que presentó mayores conteos de CF propiciados probablemente por la concentración por evaporación.

Las diferencias en los conteos de CF entre tipos de agua se corroboraron con el análisis. SMO fue el sitio que presentó un mayor conteo de CF en agua con aportes residuales, debido a que forma parte de una laguna de oxidación en la que descargan desechos los habitantes del pueblo de San Miguel, a diferencia de CJ que es un brazo de agua que cruza por un lado del pueblo en el cual existen algunas descargas de los habitantes del pueblo de Jirosto, y CV es un canal que pasa a través del poblado de Francisco Villa y también en él se vierten algunas descargas domésticas. Gerba y Pepper (2009) muestran que los conteos de CF en agua residual doméstica están en un intervalo de  $10^4$ - $10^5$  UFC/mL, en ésta investigación solo SMO en secas se encuentra dentro de este intervalo ( $10^4$  UFC/mL), y por lo tanto solo en ese sitio tiene un origen casi completamente residual, a diferencia de CJ y CV.

En cuanto al análisis de correlación para agua superficial tenemos que los CF solo mostraron una relación negativa con los SDT. Ferguson *et al.* (1996); Lemarchand y Lebaron (2003), y Wilkes *et al.* (2009) mostraron en sus trabajos que las correlaciones entre CF y SDT en agua de río son positivas, debido a que los SDT son es una medida de la cantidad de materiales disueltos en el agua, los cuales pueden incluir sedimentos y materia fecal, y de esta manera aumentar los conteos de CF, a medida que se incrementan los SDT. Estas diferencias pueden deberse a que la alta cantidad de SDT que quedan en la membrana al filtrar la muestra resultan en interferencia para el crecimiento de los CF en muestras directas (100 mL), mientras que en muestras muy diluidas (0.1 ó 0.01 mL) la cantidad de CF no es detectable, por lo que se sugiere que en muestras con altos valores de SDT hay que considerar el filtrar una cantidad intermedia de muestra (10 mL).

Por otro lado los CF presentaron una correlación significativa en agua con aportes residuales con *G. lamblia*. Le Chevallier *et al.* (1991) muestra en sus análisis un comportamiento muy similar al encontrado en ésta investigación, este investigador mencionan que estas relaciones se deben principalmente al origen fecal de los CF y ambas especies de protozoarios.

Los EF presentaron diferencias significativas entre épocas, siendo la época de lluvias en la que se obtuvieron los mayores conteos. Nuestros resultados son similares a los del trabajo de López-Tapia (2008), aunque en su trabajo no se encontraron diferencias significativas entre épocas, los conteos de EF fueron mayores en la época de lluvias. El mayor conteo de EF se presentó en los sitios del río posteriores a los poblados (ECAS, JS, SMS), lo que nos sugiere una influencia puntual por parte de las comunidades.

La prueba de *t* no mostró diferencias significativas de EF entre tipos de agua, esto debido posiblemente a que existió una baja densidad de EF en los sitios con aportes residuales en la época seca. Solo SMO en secas entra en el rango ( $10^3$ - $10^4$  UFC/mL) de EF típicamente encontrados en agua residual doméstica sin tratamiento de acuerdo con lo que refieren Pepper *et al.* (2006). A diferencia de los CF los EF es raro que se repliquen en el ambiente, por lo que los conteos de EF pueden ser menores con respecto a los conteos de CF, los cuales en ambientes tropicales se replican de manera natural, resultando en una mayor diferencia en los sitios que tienen aportes residuales (Toranzos *et al.*, 2007 y Gerba y Pepper 2009).

De acuerdo con los resultados del análisis de correlación para agua superficial y agua con aportes residuales encontramos que los EF no mostraron una relación con ninguno de los parámetros analizados; estos resultados nos sugieren continuar monitoreándolos en sistemas naturales, debido a la información complementaria que nos muestran y al gran variación que existe en estos sistemas.

El sistema de clasificación de Kavka *et al.* (2006) sugiere que la calidad microbiológica de los sitios evaluados se encuentra primordialmente en un estado moderado-crítico, lo que significa que los asentamientos humanos pueden estar teniendo una influencia directa sobre la calidad del agua incrementando los conteos de CF y EF, por lo que es necesario hacer estudios para identificar específicamente la fuente de contaminación. López-Tapia (2008) concluye que la calidad del agua del río Cuitzmala se encuentra en un estado transicional en el cual están empezando a tener efecto las actividades productivas, sin embargo, es importante considerar que en estos sistemas existen aportes de la fauna silvestre, que contribuyen a los conteos de los microorganismos indicadores, por lo que es necesario discriminar de manera muy cuidadosa entre los aportes asociados a actividades humanas y a fauna que forma parte del sistema.

De acuerdo con el cociente CF/EF (Geldreich y Kenner, 1969.), que si bien es polémico puede darnos una aproximación en cuanto a que los sitios con una posible contaminación



de origen humano son ECAE, ECAS, y CH en época de lluvias. En la época seca solo JS no tiene un origen humano, así que las lluvias pueden estar funcionando como un acarreador de desechos animales trasportándolos al río, mientras que en secas al no existir este fenómeno se hace más evidente la influencia que pueden tener los asentamientos humanos. En sitios como CE y CS se detectó la presencia de ganado vacuno. Si bien este cociente nos sugiere una aproximación al origen de la contaminación, es necesario corroborar con más estudios los posibles factores que pueden provocar errores en el momento de la interpretación, más aun cuando se trata de sistemas tan complejos como el río Cuitzmala.

### 8.2.2 Protozoarios

En el río Cuitzmala se detectó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y quistes de *Giardia lamblia* en el agua, sugiriendo que existe un riesgo potencial para la salud de las personas y animales que estén expuestos a través de usos como riego, recreación, preparación y lavado de alimentos, consumo, etc. Los niveles de contaminación con *C. parvum* y *G. lamblia* varían entre los sitios y en general están en función de la cantidad de población, la fuente y tipo de agua. Se encontró que San Miguel es uno de los sitios que tiene los conteos más elevados debido a que su aporte de agua residual es constante, ya que ambas especies se identificaron tanto en la entrada del pueblo (SME), como en la salida (SMS) y en la laguna de oxidación (SMO) en ambas temporadas. Por otro lado, el Camalote es un rancho con ganado vacuno que también se logro identificar como posible fuente de contaminación de tipo animal, ya que *C. parvum* y *G. lamblia* solo se detectaron en la salida del rancho (CS).

*Cryptosporidium parvum* se identificó en un 66.6% de las muestras en la época de lluvias, mientras que en la época seca se observó en todas las muestras de agua analizadas. La cantidad de ooquistes de *C. parvum* no mostró diferencias significativa entre temporadas, sin embargo, la cantidad promedio en la época de secas fue mayor a la de lluvias, debido posiblemente al efecto de concentración por evaporación. Estos resultados son diferentes a los reportados por Castro-Hermida *et al.* (2009); ellos mencionan que las altas densidades de *C. parvum* en primavera y verano (el verano presenta lluvias) coinciden con la alta proporción de ooquistes detectados en el ganado durante el mismo año; Wilkes *et al.* (2009) reporta también que la mayor concentración de ooquistes de *C. parvum* se presenta durante la época de lluvias, debido al efecto de arrastre.

De acuerdo con el análisis *C. parvum* presentó diferencias significativas entre tipos de agua. Nuestros resultados son congruentes con lo reportado por Lemarchand y Lebaron (2003), quienes reportan 0.4-209.2 ooquistes/L en agua residual, mientras que en agua superficial 0.04-7.3 ooquistes /L en agua de la cuenca del río Tech, en Francia. Sin embargo y de acuerdo con Gerba y Pepper (2009) la concentración de protozoarios parásitos en agua

residual en países en desarrollo es mayor que en países industrializados, sin embargo, debe de considerarse la baja densidad poblacional de ésta zona y la pérdida de (oo)quistes por la manipulación en el análisis, la cual fue de 38% para *C. parvum* y de 48% para *G. lamblia*. Otros métodos para la concentración y detección de *C. parvum* y *G. lamblia* presentan perdidas por la manipulación en el análisis desde 16% hasta 79% (Betacourt y Querales, 2008).

Roberson *et al.* (2006) menciona que los procesos de manipulación (concentración, clarificación y detección) de las muestras de agua residual pueden resultar en una disminución de la concentración de (oo)quistes de manera significativa, sin embargo el porcentaje de muestras positivas aumenta significativamente, debido a que se disminuye el límite de detección con una técnica de concentración (ultrafiltración y centrifugación). El porcentaje de recuperación utilizando nuestro método (ultrafiltración-centrifugación, detección por inmunofluorescencia indirecta) fue de 62% para *C. parvum* y 60% para *G. lamblia*, lo cual indica que éste método puede incrementar el porcentaje de muestras positivas en agua.

En el análisis de correlación para agua superficial tenemos que *C. parvum* y *G. lamblia* presentaron una relación positiva con el OD en agua superficial, aunque el significado de las relaciones entre protozoarios patógenos y parámetros físicos y químicos no es muy clara debido a que poseen estructuras de resistencia a condiciones adversas y no se replican en el ambiente, de manera que los pequeños cambios en algún parámetro no afectan en su detección.

La relación negativa entre *C. parvum* y el OD en agua con aportes residuales, es explicada por los cambios que el OD presenta en este tipo de ambientes ricos en nutrientes y microorganismos, y no específicamente a una relación directa entre ambos parámetros.

*Cryptosporidium parvum* no mostró ninguna relación con los indicadores microbiológicos analizados y tampoco con *G. lamblia*. Lemarchand y Lebaron (2003) menciona que la débil relación entre indicadores (CF y EF), *C. parvum* y *G. lamblia* en agua del río, puede explicarse en cierta medida por el hecho de que la actividad y transporte de los diferentes microorganismos son afectados por procesos hidrológicos, químicos y biológicos (por ejemplo: el flujo de agua, la afinidad a determinadas partículas, fenómenos de sedimentación y resuspensión, sobrevivencia, etc.). Los ooquistes de *C. parvum* pueden sedimentarse en aguas estancadas o sin flujo, mientras que CF y EF se mantienen suspendidos y son más susceptibles al transporte.

La falta de relación entre *C. parvum* y *G. lamblia* también ha sido registrada por Wilkes *et al.* (2009), él reporta un coeficiente de correlación muy similar al mostrado en ésta investigación. Ésta falta de relación puede deberse a las distintas concentraciones que se encontraron para ambas especies, así como a la heterogeneidad de los sistemas naturales, a las características biológicas que cada organismo presenta, que le permiten una

persistencia mayor o menor en el ambiente, así como también una mayor facilidad para su detección y cuantificación (tamaño del ooquiste en el caso de *C. parvum* dificulta su observación); esta baja relación nos sugiere que *C. parvum* no puede ser utilizado como un buen indicador de la presencia de *G. lamblia* y viceversa en agua superficial. Le Chevallier y colaboradores (1991) mencionan que posiblemente *G. lamblia* está más asociado a la introducción de efluentes residuales, es decir su densidad aumenta dependiendo del grado de protección de la cuenca a la fuente de agua (protegida, limitada, recreativa, uso en agricultura, descargas residuales e industria), mientras que los niveles de *C. parvum* no muestran ésta relación, y pueden ser asociados a distintas fuentes de contaminación.

En agua con aportes residuales *C. parvum* no mostró una relación con CF, EF y *G. lamblia*; Lemarchand y Lebaron (2003) mencionan que en agua residual puede haber muchas partículas que pueden interferir con la detección de *C. parvum* por inmunofluorescencia, dando como resultado una heterogeneidad de los datos. Por lo que se recomienda que las muestras se purifiquen utilizando métodos convencionales de flotación, sedimentación o separación inmuno-magnética (IMS por sus siglas en inglés), con la finalidad de facilitar la observación y obtener registros más precisos.

*Giardia lamblia* se detectó en un 66.6% de las muestras en la época de lluvias, mientras que en la época seca se detectó en el 100% de las muestras. La época seca mostró un incremento con respecto a la cantidad de quistes detectados aunque ésta diferencia no fue significativa. Un patrón distinto es descrito por Castro-Hermida y colaboradores (2009), en su trabajo la mayor concentración de quistes de *G. lamblia* se presentó durante primavera y verano en la cuenca del río Tambre (el verano presenta lluvias como en México), en un intervalo de 0-722 quistes/L, además la concentración en primavera-verano mostró diferencias significativas respecto a otoño-invierno. Las diferencias entre temporadas también fueron reportadas por Wilkes *et al.* (2009).

Las diferencias en la concentración de quistes de *G. lamblia* entre tipos de agua se corroboraron con el análisis. En un estudio realizado por Ho y Tam (1998) en muestras de agua con aportes residuales en el río Lam Tsuen, Hong Kong encontraron niveles de *G. lamblia* ligeramente más bajos (1-468 quistes/L) a los detectados en los sitios con aportes directos de aguas residuales (CJ, CV, SMO). Esta diferencia en las densidades de *G. lamblia* pueden ser explicadas por la variación en los métodos de concentración; Ho y Tam (1998) utilizan el método de gradiente de floculación, también puede explicarse por las densidades más bajas que existe en países industrializados (Gerba y Pepper, 2009).

En agua superficial *G. lamblia* no mostró ninguna relación con los indicadores microbiológicos CF y EF. En el trabajo de Wilkes *et al.* (2009) no detectó relaciones entre *G. lamblia* y los indicadores microbiológicos ( $r=0.18$  para CF y  $r=0.17$  para EF), y de acuerdo con los autores estas relaciones son difíciles de detectar en sistemas naturales debido a la

gran complejidad que estos sistemas presentan y a las características físicas, químicas, biológicas que pueden estar alterando la sobrevivencia y/o detección de estos organismos. En sistemas menos expuestos a las condiciones ambientales desfavorables así como en los sitios con aportes residuales encontramos que *G. lamblia* presentó una relación significativa con los CF. Kinzelman *et al.* (2003) menciona que los miembros de los EF muestran una mejor correlación que los CF en riesgos de enfermedades, debido a que su persistencia en agua es similar a la de múltiples patógenos, incluidos *C. parvum* y *G. lamblia*. En ésta investigación no existió ninguna relación entre *G. lamblia* y EF, lo que sugiere que no necesariamente la detección de EF nos puede dar una idea de lo que pasa con *G. lamblia* y *C. parvum*. De la misma manera los CF no nos reflejan por si mismos evidencia de la presencia de estos microorganismos patógenos.

Las posibles fuentes de contaminación en la cuenca del río Cuitzmala incluyen: sistemas sépticos, localizados en la mayoría de los poblados; manejo de animales domésticos, como pueden ser zonas de ganadería, y aporte de animales silvestres; escorrentías y sistemas de tratamiento, como el detectado en San Miguel.

La calidad del agua de río depende de muchos factores, entre ellos la vegetación de galería, la cual ayuda a retener sedimentos, nutrientes y microorganismos patógenos, como *C. parvum* y *G. lamblia*, así mismo ayudan en la recarga de agua subterránea, a mantener los flujos de agua y a conservar la vida acuática. Por todo lo anterior, es necesario implementar estrategias de estudio, manejo y monitoreo de los ecosistemas, a fin de incrementar la salud y bienestar de humanos y otras comunidades que hacen uso de estos sistemas.

### **8.3 Relaciones entre indicadores y patógenos.**

La evaluación de las relaciones entre indicadores y patógenos es muy variable, y dependen en mayor o menor medida de características intrínsecas del ambiente (temperatura, precipitación, sobrevivencia, tipo y fuente de contaminación, etc.), así como también de características extrínsecas (métodos de detección, concentración, análisis, etc.). Estas últimas están en función del interés, experiencia y/o criterio que cada investigador utiliza, provocando que la evaluación de las relaciones no sea muy uniforme y representativa, y por lo tanto no refleja fielmente las diferencias que cada sistema presenta. Tomando en cuenta todos los datos presentados en este trabajo de presencias y ausencias entre indicadores fecales (CF y EF) y patógenos (*C. parvum* y *G. lamblia*) es posible sugerir que los CF y EF en conjunto son buenos indicadores de la presencia de ambos patógenos (95.9% de categoría correcta). Cabe aclarar que esta premisa se cumple sí tomamos en cuenta a ambos indicadores y a las dos especies de patógenos al mismo tiempo.

Wicki *et al.* (2009) describe una relación similar entre microorganismos indicadores (EF y *E. coli*) y *G. lamblia*, ellos concluyen que EF son buenos indicadores de la presencia de éste

patógeno, sin embargo *E. coli* no presenta una buena relación, por lo que recomiendan seguir monitoreando a *G. lamblia* ya que la presencia de ambos indicadores no explica de manera satisfactoria la presencia de *G. lamblia*.

En la Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 (DOF, 1997), y la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 (DOF, 2000), solo los CF se encuentran incluidos, por lo que de manera contrastante si solo utilizamos a los CF comparado con *C. parvum* tenemos que el 79.1% de las muestras positivas para CF son positivas para éste patógeno (categoría correcta), mientras que la proporción de falsos positivos (indicador-presente patógeno-ausente) es de 16.6%, y de falsos negativos (indicador-ausente patógeno-presente) es de 4.1%. Un comportamiento similar se observó entre CF y *G. lamblia*.

La proporción de muestras positivas para EF y cada uno de las dos especies de patógenos fue de 62.5% de categoría correcta, 16.6% falsos positivos y 20.8% de falsos negativos.

Los falsos positivos pueden resultar en falsas alarmas y no son muy informativos del verdadero peligro para la salud humana, tanto CF como los EF presentan un porcentaje considerable de falsos positivos detectados en el río Cuitzmala. Por otro lado, los falsos negativos sugieren que el peligro para la salud humana no se ha comenzado a detectar, poniendo en riesgo la salud de las personas y animales que están expuestos en esos sitios. Los CF presentaron una menor proporción de falsos negativos comparados con los EF.

Harwood y colaboradores (2005) concluyen que la elección de un indicador para predecir la sobrevivencia y/o frecuencia de una gran variedad de microorganismos patógenos fuerza a la elección de uno de los dos tipos de error.

#### **8.4 Riesgo potencial en agua del río Cuitzmala.**

La detección de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en el agua del río Cuitzmala significa que la población y los animales que utilizan el agua para múltiples actividades están expuestos a un peligro que puede constituir un riesgo de infectarse con estos parásitos y eventualmente desarrollar un brote o una epidemia. Los niños entre 0 a 14 años son los más susceptibles de desarrollar una enfermedad (Cifuentes *et al.*, 2000 y 2004), por lo que son un grupo vulnerable, al igual que las personas inmunocomprometidas. La dosis infecciosa y la tasa de inactivación son los dos características críticas (Tabla 2) en estos organismos que definen el riesgo de causar un brote o una enfermedad.

En los brotes en Bradford (Inglaterra) y Milwaukee (Estados Unidos) se detectaron densidades de ooquistes de *C. parvum* menores de 0.4 ooquistes/L (Atherton *et al.* 1995; MacKenzie *et al.* 1994 respectivamente). En nuestro trabajo encontramos niveles en un intervalo mayor de *C. parvum* (0.6-87 ooquistes/L). Estos datos revelan un peligro para la población expuesta. Es importante que los datos obtenidos en este estudio sean sometidos a un estudio de evaluación de la exposición y del riesgo, para conocer la magnitud del efecto

que podría tener la presencia de estos parásitos en el agua del río Cuitzmala, sobre las poblaciones humanas y animales.

Cabe destacar que la infección por *C. parvum* y *G. lamblia* en el ganado puede generar pérdidas económica a los productores. En cabras jóvenes y ovejas una infección experimental con *G. lamblia* resultó en la disminución de la eficiencia de la alimentación, y subsecuentemente en una disminución del peso ganado, que se refleja en pérdidas económicas (Koudela y Vitovec, 1998).

Si bien en este trabajo no se detectó la viabilidad de los patógenos podemos suponer que la presencia misma de cada uno de ellos conlleva un riesgo, y que además éste riesgo aumenta con la cercanía a los asentamientos humanos. Fayer *et al.* (1996) encontró que en temperaturas cálidas (como es el caso de la cuenca del río Cuitzmala), los ooquistes de *C. parvum* permanecen infecciosos alrededor de 12 semanas. Smith *et al.* (2006) menciona que los quistes de *G. lamblia* permanecen infecciosos hasta por dos meses suspendidos en el agua.

Con base en lo anterior, estamos convencidos de que el monitoreo de la calidad del agua es fundamental para proporcionarnos evidencias y elementos sobre los que habrá de intervenir para mejorar las condiciones de salud ambiental, y de esta manera aumentar no solo el bienestar humano, si no también mejorar las condiciones ambientales en la región.

## 9 CONCLUSIONES

- Con base en el análisis de la calidad del agua del río Cuitzmala durante un ciclo anual (lluvias 2009, secas 2010), se determinó que no existen diferencias significativas entre los parámetros fisicoquímicos entre temporadas, y que solo el OD y la conductividad presentaron diferencias significativas entre tipos de agua, lo cual sugiere que en estos sitios existe una descarga de contaminantes que pueden alterar la calidad del agua del río. Cabe mencionar que el canal de Jirosto aporta contaminantes pero no con la misma intensidad que la laguna de oxidación de San Miguel y el canal de Francisco Villa.
- El cociente CF/EF muestra una tendencia de contaminación fecal predominantemente animal en la época de lluvias, y una tendencia de contaminación fecal predominantemente humana en época de secas.
- El estado de contaminación con base en CF y EF es de moderado a crítico en la mayoría de los sitios estudiados.
- La época de lluvias funciona como un acarreador de desechos, pero también como un diluyente, disminuyendo la cantidad de microorganismos en un mismo volumen de muestra, mientras que la época seca concentra los contaminantes.
- La combinación de una técnica de concentración (ultrafiltración-centrifugación) y detección (inmunofluorescencia en fase líquida) son eficientes en la detección y cuantificación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en muestras de agua.
- El análisis de protozoarios patógenos nos indica que existe un mayor peligro de exposición durante la época seca, debido a que la concentración de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* es más alta en esta temporada, además es constante en todos los sitios.
- La relación entre indicadores fecales (CF y EF) y parásitos patógenos (*Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*) no son muy claras, además la presencia de los indicadores no representa confiablemente la presencia de los patógenos, por lo que se recomienda que *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* se consideren dentro de las legislaciones en materia de agua en México.
- San Miguel es un sitio clave en el aporte de contaminantes fecales para el agua del río Cuitzmala, su sistema de drenaje y su sistema de tratamiento (laguna de oxidación), pueden estar teniendo impacto en la calidad del agua y en la salud de los pobladores cuenca abajo.
- Las actividades humanas pueden estar modificando la calidad del agua del río Cuitzmala, y además pueden incrementar el riesgo potencial de infección para las

poblaciones humanas y de otros animales, así como también, aumentado pérdidas económicas.

- Los análisis de calidad de agua deben de ser lo más completos posible, abarcando la mayor cantidad de parámetros disponibles para de esta manera poder ayudar a mejorar las estrategias de monitoreo, el cual nos da elementos-evidencias sobre las que habrá que intervenir para mejorar las condiciones de salud ambiental donde se incluye el bienestar humano, para ésta zona tropical los parámetros que mostraron correlaciones que resulta fundamental medir son: pH, temperatura, OD, CF, EF C. *parvum* y *G. lamblia*.



## 10 PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.

Los parámetros fisicoquímicos generalmente nos dan una buena idea de lo que está ocurriendo en los sistemas naturales. En este caso en concreto solo la conductividad y el oxígeno disuelto son indicativos de cambios en la calidad del agua comparando las distintas fuentes, mas no muestran claramente las relaciones entre temporalidad, por lo que es necesario determinar más datos con el fin de aclarar lo mejor posible, el funcionamiento de éste sistema.

Los indicadores biológicos (CF y EF) son una buena evidencia de contaminación fecal, aunque en climas tropicales la evidencia de los CF puede ser cuestionada, debido a que pueden crecer en el ambiente y además su relación con *C. parvum* y *G. lamblia* no está completamente establecida, por lo que se recomienda monitorear a *C. parvum* y *G. lamblia* de manera complementaria, con la finalidad de crear mejores estrategias para mejorar la calidad de ambiente y el bienestar humano.

La posible fuente de contaminantes fecales en el río Cuitzmala no es muy clara, debido a que muestra una tendencia hacia contaminación de origen humano en la época seca, sin embargo, la tendencia a contaminación animal en la época de lluvias puede asociarse al lavado de suelos en ésta época . Estos datos nos revelan que es necesario profundizar en el origen de contaminación y evaluar cual es el nivel de microorganismos que constituye un peligro para las poblaciones humanas y animales.

Debido a que los valores de OD, conductividad, CF, EF, *C. parvum* y *G. lamblia* resaltan en San Miguel, nosotros proponemos a éste lugar como un sitio que debe monitorearse debido a sus aportes al río Cuitzmala. El manejo de sus aguas residuales (laguna de oxidación), debería de modificarse a fin de hacerlo eficiente reduciendo las cargas de patógenos que tienen efecto sobre la salud de las personas y/o animales cuenca abajo.

Otro punto importante es que tanto la población humana como la fauna silvestre y doméstica, en sitios como el Camalote, pueden influir en el la calidad del agua y por ende en las condiciones de salud. Yoder y Beach (2010), proponen que el riesgo de transmisión zoonótica con *Cryptosporidium parvum* puede reducirse aumentando las condiciones de higiene en las granjas o establos, secuestrando los desechos animales y reduciendo el contacto con estos animales.

La reducción del riesgo de transmisión persona a persona con *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* puede reducirse por tener prácticas adecuadas de higiene (CDC, 2008).

Teniendo en cuenta que la época seca es la que presentó mayor concentración de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* recomendamos que en esta época se ponga mayor atención en materia de prevención de enfermedades diarreicas, además de

intensificar las campañas de desparasitación, y también reducir la exposición a fuentes probables de infección.

También es recomendable gestionar las reformas necesarias en materia de calidad del agua para proveer agua segura de fuentes superficiales, que desafortunadamente en nuestro país no se han mejorado en las últimas décadas.

Por otro lado, cabe destacar que el método de detección de inmunofluorescencia en fase líquida mostró un buen rendimiento (1 (oo)quiste/mL), mientras que la técnica de concentración (ultrafiltración-centrifugación) tuvo un porcentaje considerable de recuperación (61.66% para *C. parvum* y 59.85% para *G. lamblia*); ambos métodos son eficientes en la concentración y detección de protozoarios patógenos, además tienen un costo relativamente bajo, una vez que se cuenta con la infraestructura adecuada. Sin embargo, el tiempo invertido para el análisis es considerable (alrededor de 3 días) y es necesario contar con personal técnico especializado. Nosotros recomendamos el uso del método con fines de monitoreo de la calidad del agua con base a detección y cuantificación de *C. parvum* y *G. lamblia*.

Debido a las condiciones sociales, políticas, económicas y ambientales que se viven en México, los análisis de protozoarios patógenos en el agua deberían ser prioritarios, con la finalidad de conocer la incidencia de enfermedades asociadas con el agua, y de esta manera mejorar los sistemas de salud ambiental y humana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M. A., A. Z. Al-Herrawy y S. E. El-Hawaary. 2004. Detection of Enteric Viruses, *Giardia* and *Cryptosporidium* in two Different Types of Drinking Water Treatment Facilities. *Water Research* (38): 3931–3939.
- Al-Abri, S., N. J. Beeching y F. J. Nye. 2005. Traveller`s Diarrhoea. *The Lancet Infectious Diseases* (5): 349-360.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association y Water Environment Federation. 2005. Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21<sup>st</sup> Edition. Editorial Centennial.
- Appelbee, A. J., R. C. A. Thompson y M. E. Olson. 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Mammalian Wildlife – Current Status and Future Needs. *Trends in Parasitology* (21): 370-376.
- Atherton, F., C. P. S. Newman y D. P. Casemore. 1995. An Outbreak of Waterborne Cryptosporidiosis associated with a Public Water Supply in the UK. *Epidemiology and Infection* (115): 123–131.
- Betancourt, W. Q. y L. J. Querales. 2008. Parásitos Protozoarios Entéricos en Ambientes Acuáticos: Métodos de Concentración y Detección. *Interciencia* (33): 418-423.
- Briancesco R. y L. Bonadonna. 2005. An Italian Study on *Cryptosporidium* and *Giardia* in Wastewater, Freshwater and Treated Water. *Environmental Monitoring and Assessment* (104): 445–457.
- Canadian Council of Resource and Environment Ministers (CCREM). 1999. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: summary table. En: *Canadian Environmental Quality Guidelines*. 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.
- Carabias, J. y R. Landa. 2005. Agua, Medio Ambiente y Sociedad: Hacia la Gestión Integral de los Recursos Hídricos. Universidad Nacional Autónoma de México, El Colegio de México y Fundación Río Arronte. México D. F.

- Castro-Hermida, J. A., I. García-Presedo, A. Almeida, M. González-Warleta, J. M. Correia y M. Mezo. 2009. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in Surface Water: A health Risk for Humans and Animals. *Water Research* (43): 4143-4142.
- Ceballos G., A. Szekely, A. García, P. Rodríguez y F. Noguera. 1999. Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuitzmala. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, México.
- Chaidez, C., P. Gortares, K. Mena y M. Soto. 2005. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in Irrigation Water and its Impact on the Fresh Produce Industry. *International Journal of Environmental Health Research* (5): 339-345.
- Cifuentes, E., M. Gómez, U. Blumenthal, M. M. Tellez-Rojo, I. Romieu, G. Ruiz-Palacios y S. Ruiz-Velazco. 2000. Risk factors for *Giardia intestinalis* Infection in Agricultural Villages Practicing Wastewater Irrigation in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (62): 388-392.
- Cifuentes, E., L. Suárez; M. Espinosa, L. Juárez-Figueroa y Adolfo Martínez-Palomo. 2004. Risk of *Giardia Intestinalis* Infection in Children from on Artificially Recharged Groundwater Area in Mexico City. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (71): 65-70.
- Clarke, C. G., M. Barlow, 2004. Preface. En: *The Water Atlas. A Unique Analysis of the World's Most Critical Resource*. The New Press. New York.
- Control Disease Center. 2008. Cryptosporidiosis outbreak response and evaluation. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC. Available from: [http://www.cdc.gov/crypto/pdfs/core\\_guidelines.pdf](http://www.cdc.gov/crypto/pdfs/core_guidelines.pdf)>
- D'Antonio, R.G., R. E. Win, J. P. Taylor, R. L. Gustafson, W. L. Current, M. M. Rhodes, W. Gary. y R. A. Zajac. 1985. A Waterborne Outbreak of Cryptosporidiosis in Normal Hosts. *Annals of Internal Medicine* (103): 886-888.
- Diario Oficial de la Federación. 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. 6 de enero, 1997. México D.F.

- Diario Oficial de la Federación, 2000. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental, Agua para Uso y Consumo Humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. 20 de junio, 2000. México D.F.
- Díaz-Cinco, M. E., E. E. Leyva-Michel, V. Mata-Haro y H. González-Ríos. 2003. Incidencia y Viabilidad de *Cryptosporidium parvum* en el Agua Potable de Ciudad Obregón, Sonora, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* (2): 67-72.
- Dirección General de Epidemiología (DGEPI) 2010: [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)
- Enriquez, J. F., C. R. Ávila, I. Santos, J. Tanaka-Kido, O. Vallejo y C. R. Sterling. 1997. Cryptosporidium Infections in Mexican Children: Clinical, Nutritional, Enteropathogenic, and Diagnostic Evaluations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (3): 254-257.
- Fayer, R., JM Trout y T Nerad. 1996. Effects of a Wide Range of Temperatures on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Eukaryotic Microbiology* (43): 64S.
- Feng Y. 2009. *Cryptosporidium* in Wild Placental Mammals. *Experimental Parasitology*. doi:10.1016/j.exppara.2008.11.005.
- Ferguson, C. M., B. G. Coote, N. J. Ashbolt y I. M. Stevenson. 1996. Relationships between Indicators, Pathogens and Water Quality in an Estuarine System. *Water Research* (30): 2045-2054.
- Flisser A., O. Reynoso, J. Ambrosio y Grupo de Alumnos del 2o Diplomado Latinoamericano de Parasitología Médica, Facultad de Medicina, UNAM. 2002. Identificación y tratamiento de parasitosis intestinales en la población de Coapeche, Veracruz. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM* (45): 14-16.
- Franco, R. M. B., R. Rocha-Eberhardt, y R. Cantusio Neto. 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Raw Water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* (43): 109-111.

- Fraser, D. 1994. Epidemiology of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* infections in Childhood. *Israel Journal of Medical Sciences* (30): 356–361.
- Gerba, C. P. 2009. Indicador Microorganisms. En: *Environmental Microbiology*. Maier, R. M., I. L. Pepper y C. P. Gerba, Eds. Academic Press. China: 485-499.
- Gerba, C. P. y I. L. Pepper. 2009. Wastewater Treatment and Biosolids Reuse. En: *Environmental Microbiology*. Maier, R. M., I. L. Pepper y C. P. Gerba, Eds. Academic Press. China: 503-530.
- Geldreich, E. E. y B. A. Kenner. 1969. Comments on Fecal Streptococci in Stream Pollution. *Journal of Water Pollution Control Federation* (41): R336-R341
- Guerrero, T. A., L. R. Guerrero, A. L. R. Hernández, T. U. Berruela, J. F. M. Chacón, A. D. Estrada y J. Tay-Zavala. 2007. Parasitosis intestinales en alumnos de la Escuela Nacional Preparatoria de la Universidad Autónoma de México y su relación con el rendimiento escolar. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM* (50): 107-109.
- Ho, B. S. W. y T.-Y. Tam. 1998. *Giardia* and *Cryptosporidium* in Sewage-Contaminated River Water. *Water Research* (32): 2860-2864.
- Hsu, Bing-Mu., C. Huang y C-L Hsu. 2001. Analysis for *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Water Samples from Small Water Systems in Taiwan. *Parasitology Research* (87): 163-168.
- Karanis P., I. Sotiriadou, V. Kartashev, C. Kourenti, N. Tsvetkova y K. Stojanova. 2006. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Water Supplies of Russia and Bulgaria. *Environmental Research* (102) 260-271.
- Kavka, G.G., G. D. Kasimir y A. H. Farnleitner. 2006. Microbiological Water Quality of the River Danube (km 2581–km 15): Longitudinal Variation of Pollution as Determined by Standard Parameters. In: Proceedings 36th International Conference of IAD. Austrian Committee Danube Research/IAD, Vienna. 415–421.

- Kinzelman, J., Ng. Clement, E. Jackson, S. Gradus y R. Bagley. 2003. Enterococci as Indicators of Lake Michigan Recreational Water Quality: Comparison of two Methodologies and their Impacts on Public Health Regulatory Events. *Applied. Environmental. Microbiology* (69): 92–96.
- Koudela, B. y J. Vitovec. 1998. Experimental Giardiasis in goat kids. *Veterinary Parasitology* (74): 9–18.
- Lechevallier, M. W., W. D. Norton y R. G. Lee, 1991a. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Surface Water Supplies. *Applied and Environmental Microbiology* (57): 2610-2616.
- Lechevallier, M. W., W. D. Norton y R. G. Lee, 1991b. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Filtered Drinking Water Supplies. *Applied and Environmental Microbiology* (57): 2617-2621.
- Lemarchand, K. y P. Lebaron. 2003. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in French Coastal Watershed: Relationship with Fecal Indicators. *FEMS Microbiology Letters* (218) 203-209.
- López-Tapia, D. M. 2008. Elaboración de Criterios para la Restauración de la Cuenca del Río Cuitzmala, Jalisco con Base en un Análisis de Agua. Tesis de Maestría. Posgrado (Rest. Amb.) Ciencias Biológicas, UNAM. México D.F.
- Mac Kenzie, W. R., J. H. Neil, E. P. Mary, M. Stephen Gradus, A. B. Kathleen, E. P. Dan, J. James, D. G. Kazmierczak, K. Fox, B. R. Joan y J. P. Davis. 1994. A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection Transmitted through the Public Water Supply. *New England Journal of Medicine* (331): 161-167.
- Magaña O. D., J. León F; J. M. Soto B; C. I. Martínez R. y C. Cháidez Q. 2006. Detección de *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. en Agua de Mar de Playas del Estado de Sinaloa por el Método 1623. XV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales.
- Marshall, M. M., D. Naumovitz, Y. Ortega y C. R. Sterling. 1997. Waterborne Protozoan Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* (10): 67-85.

- Mazari-Hiriart, M., B. E. Jiménez C. y Y. López-Vidal. 2005. El Agua y su Impacto en la Salud Pública. El colegio de México, Fundación Gonzalo Río Arronte, I. A.P. y Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Meléndez C., J. F. 1999. Hidrogeografía de la Cuenca del Río Cuitzmala, Jalisco. Tesis de Maestría. Facultad de Filosofía y Letras. UNAM. México D.F.
- Moe, C. L. 2007 Waterborne Transmission of Infectious Agents. En: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst, C. J; R. L. Crawford, J. L. Garland, D. A. Lipson, A. L. Mills, Eds. ASM Press. Washington, D.C. 222-248.
- National Research Council, Academia de la Investigación Científica, A.C. y Academia Nacional de Ingeniería, A.C. 1995. Mexico City's Water Supply, Improving the Outlook Sustainability. National Academy Press. Washington D.C.
- Nnane, D. E., J. E. Ebdon y H. D. Taylor, 2011. Integrated Analysis of Water Quality Parameters for Cost-Effective Faecal Pollution Management in River Catchments. *Water Research* (45): 2235-2246
- Ongerth, J. y H. H. Stibbs. 1987. Identification of *Cryptosporidium* Oocysts in River Water. *Applied and Environmental Microbiology* (53) 672-676.
- Okhuysen P. C. 2001. Traveler's Diarrhea due to Intestinal Protozoa. *Clinical Infectious Diseases* (33): 110-114.
- Ouyang, Y., P. Nkedi-Kizza, Q. T. Wu, D. Shinde y C. H. Huang. 2006. Assessment of Seasonal Variations in Surface Water Quality. *Water Research* (40): 3800-3810.
- Pepper, I. L., C. P. Gerba y M. L. Brusseau. 2006. Environmental and Pollution Science. 2da. Ed. Academic Press, San Diego, California.
- Plutzer, J., J. Ongerth y P. Karanis. 2010. Giardia Taxonomy, Phylogeny and Epidemiology: Facts and Open Questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (213): 231-233.



- Polaczyk, A. L., J. Narayanan, T. L. Cromeans, D. Hahn, J. M. Roberts, J. E. Amburgey y V. R. Hill. 2008. Ultrafiltration-based Techniques for Rapid and Simultaneous Concentration of Multiple Microbe Classes from 100-L Tap Water Samples. *Journal of Microbiological Methods* (73): 92-99.
- Rangel-Martínez, C. 2010. Identificación de *Blastocystis hominis* en muestras de agua obtenidas de Ciudad Universitaria en la Ciudad de México. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Simón Bolívar. México D.F.
- Romieu, I. y S. López 2002. Contaminación Ambiental y Salud de los niños en América Latina y el Caribe. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, México.
- Robertson L. J., L. Hermansen y B. K. Gjerde. 2006. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in Sewage in Norway. *Applied and Environmental Microbiology* (72): 5297-5303.
- Sánchez-Vega, J. T., J. Tay-Zavala, L. Robert-Guerrero, R. Romero-Cabello, D. R. Sánchez y Cristino Rivas-García. 2000. Frecuencia de Parasitosis Intestinales en Asentamientos Humanos Irregulares. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM* (43): 80-83.
- Sauch, J. F. 1985. Use of Immunofluorescence and Phase-Contrast Microscopy for Detection and Identification of *Giardia* cysts in Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology* (50): 1434-1438.
- Savioli L., H. Smith y A. Thomson, 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* Join the "Neglected Diseases Initiative". *Trends in Parasitology* (22) 203-208.
- Schets, F. M., J. H. van Wijnen, J. F. Schijven, H. Schoon y A. M. de Roda Husman. 2008. Monitoring of Waterborne Pathogens in Surface Waters in Amsterdam, the Netherlands, and the Potential Health Risk Associated with Exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these Waters. *Applied and Environmental Microbiology* (74): 2069-2078.
- Smith, H. V. y J. B. Rose. 1990. Waterborne Cryptosporidiosis. *Parasitology Today* (6): 8-12

- Smith, H. V., L. J. Robertson y J. E. Ongerth. 1995. Cryptosporidiosis and Giardiasis: the Impact of Waterborne Transmission. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua* (44): 258-274.
- Smith, H. V., S. M. Cacciò, A. Tait, J. McLauchlin y R.C.A. Thompson. 2006. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Humans. *Trends in Parasitology* (22): 160-167.
- Smith, H. V. y R. A. B. Nichols. 2007. *Cryptosporidium*. En: *Foodborne Diseases*. Shabbir Simjee, Ed. Humana Prees Inc. Totowa, N.J. 233-276.
- Smith, H. V. y T. Paget, 2007. *Giardia*. En: *Foodborne Diseases*. Shabbir Simjee, Ed. Humana Prees Inc. Totowa, N.J.. 303-336.
- Tadesse, I., F.B. Green y J.A. Puhakka. 2004. Seasonal and Diurnal Variations of Temperature, pH and Dissolved Oxygen in Advanced Integrated Wastewater Pond System Treating Tannery Effluent. *Water Research* (38): 645-654.
- Tay-Zavala, J. y J. T. Sánchez-Vega, 2002. Características de Protozoarios y Helminos Capaces de Causar Diarrea Aguda en Humanos. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM* (45): 64-70.
- Toranzos, G. A; G. A. McFeters, J. J. Borrego, M. Savil, 2007. Detection of Microorganism in Environmental Freshwater and Drinking Waters. En: *Manual of environmental Microbiology*. Hurst, C. J; R. L. Crawford, J. L. Garland, D. A. Lipson, A. L. Mills, Eds. ASM Press. Washington, D.C. 249-264.
- Water Quality and Health: [www.waterandhealth.org](http://www.waterandhealth.org)
- Wicki M., P. Svoboda y M. Tanner. 2009. Occurrence of *Giardia lamblia* in Recreational Streams in Basel-Landschaft, Switzerland. *Environmental Research* (109): 524-527.
- Wilkes, G., T. Edge, V. Gannon, C. Jokinen, E. Lyautey, D. Medeiros, N. Neumann, N. Ruecker, E. Topp y D. R. Lapen. 2009. Seasonal Relationships among Indicator Bacteria, Pathogenic Bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and Hydrological Indices for Surface Waters within an Agricultural Landscape. *Water Research* (43): 2209-2223.

- World Health Organization (WHO). 2006. Preventing disease through healthy environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease. World Health Organization. Francia.
- Yoder, J. S. y M. J. Beach. 2010. Cryptosporidium Surveillance and Risk Factors in the United States. *Experimental Parasitology* (124): 31-39.