



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN INTERDISCIPLINARIA EN CIENCIAS DE LA
SALUD Y LA EDUCACIÓN
(U I I C S E)

Determinación del grupo coliforme y aislamiento e
identificación de cepas de *E. coli* potencialmente
patógenas en el Embalse de Valle de Bravo,
Estado de México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

YAZMÍN YAÑEZ PANTOJA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO 2015



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.

Dedicatorias:

*A mis padres, Víctor Yáñez Chávez y María Pantoja Coifer
Por darme las herramientas, el apoyo físico, moral y económico,
ejemplo para superarme y lograr mis metas.*

A mis hermanas, Nancy y Judith Yáñez Pantoja por el apoyo.

*A mis Hijas, por darme la fortaleza, el amor para seguir
adelante.*

*A mi esposo Roberto Zesati Carlos, por la confianza, apoyo
económico y ayuda para terminar.*

Agradecimientos:

Gracias a mi familia que es mi mayor pilar para salir adelante profesional como personalmente:

A mi Papá **Victor Y.CH**. Por darme la vida, el ejemplo, las herramientas, tus consejos, las bases de la persona que soy, por el apoyo moral y económico, gracias por las enseñanzas cada día; a mi madre **María P. C.** por darme la vida, la fortaleza, tu confianza, amor, gracias por ser la madre y mujer que eres, estar siempre a mi lado escuchándome y ayudándome. A mis **hermanas** por el amor brindado, a mis **hijas** por la fortaleza, amor, espero les sirva de ejemplo para superarse cada día. A ti **Roberto Z.C.** por tu apoyo económico y moral, por la ayuda brindada, sin todos ustedes no lo hubiese logrado, GRACIAS los amo.

A la majestuosa casa de estudios Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la FES Iztacala por recibirme con los brazos abiertos después de arduo esfuerzo en el examen de admisión, por todas las oportunidades, desvelos, aprendizajes, experiencias tanto profesionales como personales, GRACIAS.

A mi director de tesis el **Dr. Pedro Ramírez García**, por la paciencia, apoyo, confianza, orientación en mi tesis, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A la **M. en C. Martha Leticia Gaytán Herrera** por su conocimiento, consejos, enseñanzas, apoyo brindado en estos años.

A los miembros del comité tutorial, **Dr. Eric Monroy Pérez, Ma. Dolores Hernández Martínez, Biol. Ma. Dolores Hurtado Bocanegra** por sus consejos, observaciones y asesoría en mi trabajo.

A la **Odon. Margarita Sermeño**, por la ayuda, cooperación, aportes.

Al laboratorio del departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina UNAM a cargo del **Dr. Carlos Eslava**, por el apoyo y enseñanzas otorgadas.

Gracias a todos mis compañeros y amigos que recorrieron a mi lado la carrera, gracias por ser un grupo unido, siempre apoyándonos y aprendiendo juntos. **Mayra, Jime, Susana, Cindy, Blanca, Karen, Cecy, Adela, Dani, Uriel, Carlos** (chompis), **Gustavo, Mauricio, Adán, Josué, Memo, Edgardo** (papá), **Ángel**.

A ustedes:

Osvelia sé que desde donde estas compartes la felicidad, siempre estuviste a mi lado apoyándome, creyendo en mi, siempre dándome armas para seguir con la cara en alto, gracias por la confianza que me brindaste, por ser parte importante en mi vida.

Mónica (Camarada Valencia) gracias por recorrer junto a mí de lado a lado la fes y mayor parte de nuestra vida en ella, siempre tan parecidas y diferentes, gracias por el apoyo, confianza, por el amor brindado y dejarme conocer a la hermosa mujer.

Ibet (iby) siempre he admirado la maravillosa mujer que eres, el ejemplo de prudencia, equilibrio, templanza, gracias iby por estar a mi lado escuchándome y aconsejando.

Rocío (Chio) gracias por ser mi media naranja, por ser la valiente mujer que eres, gracias por alentarme, escucharme, apoyarme.

Maribel gracias por el apoyo en el laboratorio y personal, por la compañía, platicas y aprendizaje.

GRACIAS a todas ustedes por estar siempre cuando las he necesitado, gracias por cada experiencia vivida juntas, las amo ¡por fin lo LOGRÉ!

A **Jessica** y **Paola** por cada día lleno de amor, apoyo, cada noche de recuerdos, gracias por ser las mujeres que son y han estado conmigo siempre.

Fernando gracias por siempre creer en mí, por alentarme a salir adelante, preocuparte, cuidarme, apoyarme, gracias infinitas.

Jesús (Wes) gracias por ser mi primer amiguito, por el apoyo, platicas, tonterías que hacíamos y decíamos juntos, gracias por estar siempre a mi lado.

Índice General

Abreviaturas	I
Índice de cuadros	II
Índice de figuras	III
Resumen	IV
1.- Introducción	1
1.1.- Microorganismos indicadores de calidad de agua	2
1.1.1.- Grupo Coliforme	2
1.2.- Epidemiología de <i>Escherichia coli</i> .	3
1.3.- <i>Escherichia coli</i>	4
1.3.1.- Morfología y metabolismo de <i>E. coli</i>	5
1.3.2.- Estructura antigénica de <i>E. coli</i> .	7
1.4.- Clasificación de <i>E. coli</i> .	7
1.4.1.- <i>E. coli</i> uropatogénicas (UPEC)	7
1.4.2.- <i>E. coli</i> causante de meningitis/septicemias (MNEC)	7
1.4.3.- <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	8
1.4.4.- <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	9
1.4.5.- <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC o VTEC o STEC)	11
1.4.6.- <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	12
1.4.7.- <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	13
1.5.- Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	14
2.- Antecedentes	15
3.- Justificación	20
4.- Objetivos	20
4.1.- General	20
4.2.- Particulares	20
5.- Área de Estudio	21
6.- Material y Métodos	26
6.1.- Parametros ambientales	26
6.2.- Toma de muestras para coliformes totales y fecales	26
6.3.- Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	27
6.4.- Extracción de DNA de <i>E. coli</i> por ebullición	27
6.5.- Identificación de Genes de Virulencia por PCR	27
6.6.- PCR Múltiple	29
6.7.- CANOCO	29
7.- Resultados	31
7.1.- Físicoquímicos	31
7.2.- Conteo de Coliformes Totales y Fecales	35
7.3.- Aislamiento e identificación de bacterias	36
7.4.- Genes de virulencia	37
7.5.- Correlación de físicoquímicos y patotipos de <i>E. coli</i> utilizando CANOCO	40

8.- Discusión	41
9.-Conclusiones	44
10.- Bibliografía	46
Anexo I	52
Anexo II	55
Anexo III	59

I.-Abreviaturas

(A/E): Adherencia y Esfacelación.
AI: Punto de muestreo Amanalco I.
AII: Punto de muestreo Cauce Amanalco II.
AIII: Punto de muestreo Cauce Amanalco III.
CA: Punto de muestreo Cauce Amanalco.
CDC: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades.
CE: Conductividad Eléctrica.
CF: Coliformes Fecales.
CH: Colitis Hemorrágica.
CT: Coliformes Totales.
CT: Punto de muestreo Cauce Tizates.
DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno.
DQO: Demanda Química de Oxígeno.
E. coli: Escherichia coli.
STEC: *E. coli* productora de la toxina shiga.
(UPEC): *Escherichia coli* UROPATOGÉNICAS.
(MNEC): *Escherichia coli* CAUSANTE DE MENINGITIS/SEPTICEMIAS.
(ETEC): *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICA.
(EHEC): *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA.
(EIEC): *Escherichia coli* ENTEROINVASIVA.
(EPEC): *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA.
(EAEC): *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA.
(DAEC): *Escherichia coli* DE ADHERENCIA DIFUSA.
FDA: Administración de Drogas y Alimentos.
ICA: Índice de Calidad de Agua.
LT: Toxina termolábil.
NMP: Número Más Probable.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
O.D: Oxígeno Disuelto.
PCR: Reacción en cadena de polimerasa.
SSA: Secretaría de Salud.
SHU: Síndrome Urémico Hemolítico.
ST: Toxina Termoestable.
STD: Sólidos Totales Disueltos.
STX: Toxina de Shiga.
STX1: Toxina de Shiga.
STX2: Toxina de Shiga.
TI: Punto de muestreo Tizates I.
TII: Punto de muestreo Tizates II.
TIII: Punto de muestreo Tizates III.
VT: Verotoxinas.
WHO: Organización Mundial de la Salud.

II.- Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Formación de pedestal por EPEC.	9
Figura 2. Adhesión de ETEC a células epiteliales.	10
Figura 3. Adhesión de EHEC a células epiteliales por medio de la intimina.	11
Figura 4. Invasión de EIEC a una célula epitelial.	12
Figura 5. Sitio de muestreo del embalse Valle de Bravo, Estado de México.	22
Figura 6. Sitios de Tizates I, II, III.	23
Figura 7. Sitios de Amanalco I, II, III.	24
Figura 8. CT. Cauce del Río Tizates 19° 12.06' N y 100° 08.10' W.	25
Figura 9. CA. Cauce del Río Amanalco, coordenadas 19° 30.25' N y 100° 07.39'W.	25
Figura 10. Condiciones del Termociclador para PCR Múltiplex.	30
Figura 11. Termociclador para PCR.	30
Figura 12. Coliformes Totales y Fecales 2010.	35
Figura 13. Coliformes Totales y Fecales 2010.	36
Figura 14. Porcentaje de bacterias aisladas e identificados.	37
Figura 15. Porcentaje de Genes obtenidos.	37
Figura 16. Genes obtenidos en 2010.	38
Figura 17. Genes STX 2 en 2010.	39
Figura 18. Genes Stx 2, 2011.	39
Figura 19. Relación de parámetros fisicoquímicos y patotipos de <i>E. coli</i> .	40

III.- Índice de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>E. coli</i> .	6
Cuadro 2. Genes asociados a factores de virulencia de cepas patógenas de <i>E. coli</i> .	28
Cuadro 3. Valores obtenidos de Temperatura del Agua (°C) en los diferentes puntos de muestreo.	32
Cuadro 4. Valores obtenidos de pH en los diferentes puntos de muestreo.	32
Cuadro 5. Valores obtenidos de Oxígeno Disuelto (mg/L) en los diferentes puntos de muestreo.	33
Cuadro 6. Valores obtenidos de DBO ₅ (mg/L ⁻¹) en los diferentes puntos de muestreo.	34
Cuadro 7. Valores obtenidos de DQO (mg/L ⁻¹) en los diferentes puntos de muestreo.	34

Resumen

La contaminación de los ecosistemas acuáticos se identifica como una de las más importantes preocupaciones de la humanidad en la actualidad, sobre todo para los países en vías de desarrollo. El objetivo del trabajo fue Realizar el aislamiento e identificación de *E. coli* potencialmente patógenas a partir de los coliformes presentes en el embalse de Valle de Bravo, siendo esta una de las principales fuentes de abasto de agua potable a la Ciudad de México. Se realizaron muestreos de agua en los meses de septiembre a noviembre de 2010 y de abril a julio de 2011. Se cuantificaron los coliformes totales y fecales por la técnica del Número Más Probable. La identificación de las *E.coli* fue mediante pruebas bioquímicas IMVIC, se extrajo el DNA por ebullición para correr el PCR y así conocer los patotipos obtenidos.

Los resultados obtenidos en los parámetros fisicoquímicos fueron: un promedio anual de Temperatura del Agua, de 22.8°C para el 2010 y de 24.3°C para el 2011, en cuanto al pH, éste mostró una tendencia a la alcalinidad durante el periodo de muestreo, se encontró un promedio anual para el 2010 de 8.52 y en el 2011 de 9.14, los valores obtenidos del Oxígeno disuelto (O.D), fueron de 7.56 mg/L como promedio anual en el 2010 y de 8.75 mg/L para el 2011, Para DBO₅ se encontró un promedio anual de 2.845 mg/L el 2010, para el 2011 fue de 2.948 mg/L, en cuanto a los valores de DQO, el promedio anual del 2010 fue de 11.6 mg/L, para el 2011 fue de 22.2 mg/L. las coliformes para el 2010 presentaron el mismo comportamiento, teniendo un aumento en el mes de octubre (13x10³ NMP/100mL). Por otro lado en el año 2011 se observa que en los cuatro meses de muestreo los valores más altos correspondieron a las coliformes totales y en el análisis por mes se observó un incremento en abril (13.6x10³ NMP/100mL). Se aislaron 55 cepas de *E.coli* de las cuales el 76% presenta al gen *stx2*, el 10% el gen *eaeA*, el 9% el *bfpA* y el restante 5% el gen de *ial*.

1.- INTRODUCCIÓN

El agua ha desempeñado un papel central para el desarrollo de diversas civilizaciones, la sociedad se beneficia ampliamente de los servicios ambientales del agua proveniente de acuíferos, ríos, lagos o costas, por lo mismo el ser humano ejerce una influencia directa e indirecta sobre ellos y la biota acuática que los habita (Brown, 2003).

El uso del agua impone numerosas modificaciones a la morfología de los ríos, tales como la construcción de presas y canales de riego. El uso del suelo en las cuencas influye en la calidad del agua, debido a que la agricultura, la industria, la urbanización y la deforestación representan las principales fuentes de contaminación. Así, se afecta el almacenamiento en acuíferos y la calidad del agua subterránea y superficial (Aguilar, 2010).

Las aguas naturales poseen una población bacteriana autóctona que incluye una amplia variedad de familias, grupos y géneros (Seoanez, 1999). Los principales contaminantes que modifican la calidad natural de las corrientes de agua son: materia orgánica, nutrientes (principalmente P y N, que aceleran la eutrofización), grasas, aceites, metales pesados, detergentes, plaguicidas y organismos patógenos que provienen de las excretas humanas y de animales de sangre caliente (Seoanez, 1999). La contaminación de origen fecal puede incorporar diferentes tipos de organismos patógenos intestinales, en ellos se encuentran los virales, parásitos y bacterianos. Las bacterias patógenas intestinales se hallan diseminadas a lo largo y ancho del planeta y aquellas cuya presencia ha sido detectada con mayor frecuencia en los cuerpos de agua son: *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia*, *Campylobacter fetus* y *Escherichia coli enterotoxigénica*. Estos organismos patógenos que proliferan en ambientes acuáticos pueden provocar: salmonelosis, fiebre tifoidea, cólera, enteritis, disenterías entre otras enfermedades. El agua se considera como un vehículo involucrado en la transmisión de virus,



parásitos o bacterias, ya que es utilizada como medio de eliminación de excretas y otros desechos (FDA 2002).

1.1.- Microorganismos indicadores de calidad de agua

La calidad del agua desde el punto de vista microbiológico, se evalúa por medio de bacterias indicadoras. Así, el grupo de bacterias coliformes se aplica como indicador general de monitoreo de calidad de agua (APHA- AWWA-WPCF, 2000).

Varios organismos son de transmisión fecal-oral y pueden estar presentes en el agua, entre los que se mencionaron están: *Salmonella* sp, *Shigella* sp, coliformes totales y fecales (Ocasio, 2004).

1.1.1.- Grupo Coliforme

Durante más de medio siglo se ha empleado al grupo Coliforme como un indicador del grado de contaminación y por lo tanto, de la calidad sanitaria del agua.

Los miembros del grupo se describen como: bacilos aerobios, anaerobios facultativos, Gram negativos, no formadores de esporas, que fermentan lactosa con producción de gas dentro de las 48 horas de incubación (Rompré et al. 2002); incluye a los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. Este grupo tiene importancia desde el punto de vista sanitario considerado como indicador bacteriológico, su dosis infectiva es de aproximadamente 10^2 org x100ml de agua (Roldán, 1992). *E. coli* es el más común entre los coliformes y su presencia podría estar principalmente asociada con contaminación fecal (Rompré et al. 2002). La determinación de coliformes fecales representa la fracción de coliformes cuyo hábitat es el intestino y la materia fecal en el hombre o animales de sangre caliente (coliformes termotolerantes) (FDA, 2002). Sin embargo, resultados recientes indican que existen cepas de *E.coli* que ocupan otros nichos distintos al colon. Entre estas destacan las *E.coli* patógenas, que pueden habitar en otras partes del tracto digestivo, en la sangre, en el

~ 2 ~



tracto urogenital y ambientes secundarios. Se ha encontrado que las cepas del desagüe y del agua son en general más diversas que las cepas encontradas directamente de los hospederos (Rodríguez 2002).

1.2.- Epidemiología de *Escherichia coli*.

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica, y una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y ancianos (León, 2006).

La diarrea es una alteración de las heces en cuanto a volumen, fluidez o frecuencia en relación anormal a la fisiología, lo cual lleva a una baja absorción de líquidos y nutrientes; algunas veces es acompañada de dolor, fiebre, náuseas, vómito, debilidad o pérdida de apetito. De acuerdo a la OMS, la diarrea es una de las principales causas de muerte en todo el mundo (Mandell et al., 1999), la cual constituye un problema importante de salud, ya que es una causa principal de mortalidad y morbilidad de la niñez en el mundo; por lo general, es consecuencia de la exposición a alimentos o aguas contaminadas. En todo el mundo, alrededor de mil millones de personas carecen de acceso a fuentes de agua de buena calidad y unos 2,500 millones no tienen acceso a instalaciones básicas de saneamiento (WHO, 2009).

Dentro de los patógenos causantes de enfermedades gástricas en el mundo, se encuentra *E. coli*, la cual puede ser responsable de enfermedades que llegan a ser muy graves, como la colitis hemorrágica y síndrome urémico (Banatvala et al., 2001, Rodríguez, 2002).

En el 2001, la SSA informó que las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias, ocupan la decima cuarta causa de fallecimientos a nivel nacional, y que los estados con mayor número de muertes fueron: Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guanajuato, Puebla y el



Distrito Federal. En México, un estudio en el 2003, reportó 4,556 decesos causados por infecciones intestinales (Paniagua, et al., 2007).

En el 2005 se reportó que el 10% de todas las gastroenteritis agudas producidas en niños en los Estados Unidos, fueron causadas por *E. coli* diarreogénicas (Cohen, et al., 2005). Uno de los brotes más recientes causado por *E.coli* O157:H7 fue reportado el 4 de enero del 2010 en 16 estados de los Estados Unidos. Según los casos reportados por el CDC, la carne de vacunos y aves contaminadas por esta cepa ocasionó que 21 personas enfermaran, entre las cuales se incluye un caso de un tipo de insuficiencia renal denominado SHU y 9 hospitalizaciones (CDC, 2010). Otro brote reciente fue reportado en el año 2011, en el mes de mayo, en Alemania y Suecia. Según los casos reportados por el CDC, el posible origen del contagio ha sido atribuido al germinado de soya, donde los últimos datos sobre la epidemia revelan que 3235 personas contrajeron la enfermedad, el 69% de ellas mujeres. Se reportaron 37 muertes, debido a un nuevo serotipo de EHEC O104:H4 (CDC, 2011).

1.3.- *Escherichia coli*

E. coli fue descrita por primera vez en 1885 por Theodor von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre *E. coli* en honor a quien la descubrió (Koneman et al., 1999, Prescott, 1999). Es una de las especies de bacterias mas estudiadas ya que tiene una alta capacidad patogénica y se ha utilizado como modelo de investigaciones metabólicas, genéticas y poblacionales. Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyo hábitat natural es el suelo, la materia en descomposición, el tubo intestinal (del hombre y animales de sangre caliente) y el agua (Sánchez, 2003). *E. coli* es una bacteria mesófila, es decir se desarrolla a temperatura de 20 a 45 grados Celsius, con una



temperatura óptima de 37°C y se desarrolla a un pH de 6-8 (Koneman, 1999, Sánchez, 2003).

Forma parte de la flora intestinal, es un agente oportunista que por lo general no causa enfermedad al hombre, a menos que se encuentre en condiciones favorables para la bacteria (individuos inmunosuprimidos, en particular la infancia y la vejez); además produce ciertas sustancias benéficas para el individuo, como bacteriocinas o colicinas que son sustancias bactericidas de tipo viral, las cuales mantienen un efecto inhibitorio para el desarrollo de otras especies potencialmente patógenas. Sin embargo, *E.coli* y otros bacilos entéricos son los responsables de la mayor parte de las infecciones nosocomiales (Sánchez, 2003).

1.3.1.- Morfología y metabolismo de *E. coli*

- Son bacilos Gram negativos.
- Móviles con flagelos peritricos o inmóviles.
- Tienen fimbrias o pilis, que son responsables a la fijación a otras bacterias.
- La pared celular se compone de mureína, lipoproteína, fosfolípido, proteína y lipopolisacáridos (LPS); la porción de lipoproteína y mureína es la responsable de la rigidez celular y constituye el 20% aproximadamente de la pared celular, el 80% restante a los lípidos de la lipoproteína, para formar la bicapa lipídica.
- Las cadenas laterales polisacáridas específicas del LPS son la porción responsable de los determinantes antigénicos, que es lo que origina la diversidad de especies.
- Pueden poseer una cápsula bien definida o una cubierta laxa (Koneman, 1999).
- Aerobios o anaerobios facultativos, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos.

~ 5 ~



- Catalasa positivos, oxidasa negativa, reductores de nitratos a nitritos (Ewing, 1985, Sánchez, 2003).

En el cuadro 1 se presenta la totalidad de las pruebas bioquímicas para identificarlas

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de *E. coli* (Rodríguez. 2002)

Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0 (-)
Producción de Indol	98 (+)
Rojo de Metilo	98 (+)
Voges-Proskauer	0 (-)
Citrato de Simmons	1 (-)
H ₂ S (TSI)	1 (-)
Hidrólisis de urea	1 (-)
Utilización de malonato	0 (-)
Acido de glucosa	100 (+)
Gas de glucosa	95 (+)
Fenilalanina desaminasa	0 (-)
Lisina descarboxilasa	90 (+)
Arginina dihidrolasa	17 (-)
Ornitina descarboxilasa	65 (+)
Movilidad a 36 °C	95 (+)
Hidrólisis de gelatina a 22°C	0 (-)
KCN crecimiento	3 (-)
Fermentación de lactosa	95 (+)
Fermentación de la sacarosa	50 (+)
Fermentación de D-manitol	98 (+)
Fermentación de D-sorbitol	94 (+)
Fermentación de mucato	95 (+)
Fermentación de dulcitol	60 (+)
Fermentación de salicina	40 (-)
Fermentación de adonitol	5 (-)
Fermentación de inositol	5 (-)
Fermentación de L-arabinosa	99 (+)
Fermentación de rafinosa	50 (+)
Fermentación de L-ramnosa	80 (+)
Fermentación de maltosa	95 (+)
Fermentación de D-xilosa	95 (+)
Fermentación de trealosa	98 (+)
Fermentación de celobiosa	2 (-)
Fermentación de α –metil-D glucósido	0 (-)
Fermentación de eritritol	0 (-)
Hidrólisis de la esculina	35 (-)
Fermentación de melobiosa	75 (+)
Fermentación de D- arabitol	5 (-)
Fermentación D-manosa	98 (+)
Fermentación de glicerol	75 (+)
Nitrato a nitrito	100 (+)
Tartrato de Jordán	95 (+)
Utilización de Acetato	90 (+)
ONPG	95 (+)
Lipasa	0 (-)



1.3.2.- Estructura antigénica de *E. coli*.

En 1944 kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno O es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con los cuadros clínicos en particular, otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales) han sido empleados para su clasificación o identificación (Rodríguez, 2002).

1.4.- Clasificación de *E. coli*.

Se distinguen dos grandes grupos de *E. coli* patógenas según el tipo de infección que provocan. Un primer grupo está constituido por las cepas de *Escherichia coli* responsables de infecciones extraintestinales (tracto urinario, sepsis y meningitis neonatal) y un segundo grupo constituido por cepas patógenas intestinales, responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales (Romeu, 2012).

1.4.1.- *E. coli* uropatógenicas (UPEC)

Coloniza la mucosa uretral, asciende desde la uretra hasta vejiga, ataca e invade las células epiteliales, y puede ascender hasta el riñón, causa Cistitis y pielonefritis, sus principales factores de virulencia son: Adhesinas (typ 1, F1C, S, M, Dr), Fimbria P (Pap), factor necrotizante citotóxico (CNF-1), Hemolisina A (Hly A), Proteasa autotransportadora (Sat).

1.4.2.- *E. coli* causante de meningitis/septicemias (MNEC)

Se dispersa hematógicamente, utilizando la sangre como medio de transporte para alcanzar el SNC y no causar daño en la barrera hematoencefálica. Provoca meningitis neonatal y septicemias, sus principales factores de virulencia son: Proteínas de membrana externa



(OmpA, Iba, IbeB, IbeC, AsIA), Factor necrotizante citotóxico (CNF-1), Antígeno capsular K1.

Dentro del segundo grupo se han realizado diferentes clasificaciones. Una de las más utilizadas es en la que se consideran sus factores de virulencia y patogénesis y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea, las cuales se clasifican en seis grupos: enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002).

1.4.3.- *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E) (Eslava et al., 1994).

Actualmente se conocen bastante bien los mecanismos de patogénesis de EPEC. Poseen una adhesina Bfp (bundle-forming pilus) codificada en el plásmido *Eaf* (adherence factor). Dicha adhesina es responsable de la adhesión a distancia de la bacteria al enterocito y de la adhesión localizada a células HEp-2. Presentan también la isla de patogenicidad LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) con los genes *eae*, *tir*, *esp* y *sep*. Se sabe que EPEC se adhiere íntimamente a los enterocitos, borrando las microvellosidades de estas células y que este proceso se correlaciona estrechamente con la presencia del gen *eaeA* que codifica



la intimina, produciendo lesiones en el enterocito y con la prueba de FAS, que permite observar la desorganización de la actina intracelular en el lugar donde la bacteria se adhiere a la célula, así como el gen *bfpA* que expresa la formación de haz de pilis (BFP) que forman un pedestal (Margall et al., 1997).

Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la intimina, que participa en A/E, y el plásmido *Eae* que codifica para el *bfp*; se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes *eae* pero no el plásmido *Eae* (Rodríguez, 2002).

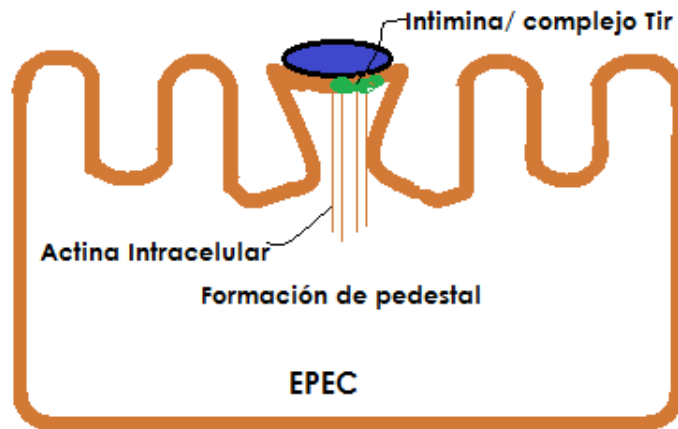


Figura.-1. Formación del pedestal por EPEC.

1.4.4.- *E.coli* enterotoxigénica (ETEC)

Las cepas de *E. coli* enterotoxigénica elaboran dos tipos diferentes de toxinas, la primera es una proteína dimérica de alto peso molecular (86,500 daltons) similar en estructura química, función y antigenicidad a la toxina producida por *V. cholerae* 01 y por su labilidad al calor (se inactiva a 100 °C durante diez minutos) se denomina enterotoxina termolábil LT.

La otra familia de enterotoxinas producidas por las ETEC son las denominadas termoestables (ST), resistentes al calentamiento. Estructuralmente son péptidos de bajo peso molecular (1000-6000 daltons), no son inmunogénicas, solubles en metanol. El control genético de la



producción de LT y ST reside en plásmidos transferibles (Kupersztoch et, al. 1990). Las enterotoxinas proteicas, no se ingieren preformadas ni ingresan al medio interno, sino que se forman y ejercen su acción localmente sobre la mucosa intestinal, promoviendo hipersecreción de agua y electrolitos (Reis et al., 1982).

Se ha reportado que ETEC posee la capacidad de adherirse y colonizar los enterocitos de la mucosa del intestino delgado, por medio de un mecanismo llamado CFA (colonización por conjunto de fimbrias) (Rodríguez, 2002).

Las ETEC son patógenos importantes en los lactantes, principalmente en niños menores de dos años y en particular en los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno en niños con diarrea es de 10 al 30%. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero. (Nataro, 1998; Salazar, 2009).

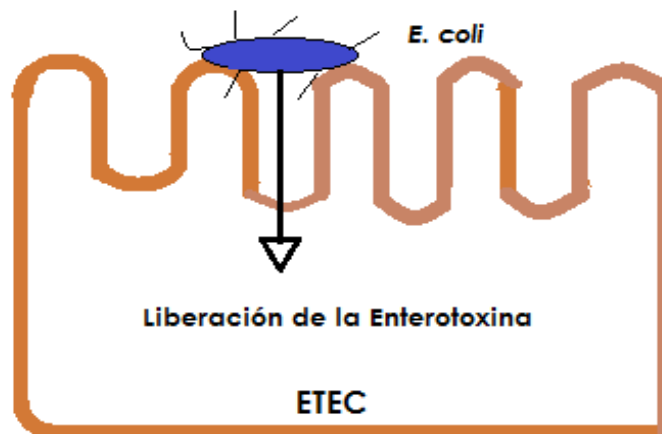


Figura.- 2. Adhesión de ETEC a células epiteliales.



1.4.5.- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC o VTEC o STEC)

Aparece en la década de los 80's en casos esporádicos y en brotes epidémicos en países desarrollados. El serotipo más observado en EE. UU, Europa y Japón ha sido O157:H7. Riley describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, a esto se le llamó colitis hemorrágica (CH) y fue causada por la ingestión de carne cruda o mal cocida (Riley et al., 1983).

EHEC es capaz de producir toxinas similares a la toxina de Shiga y se considera causante de patología grave, como la CH y SUH, en especial en niños. Las cepas causantes de estos cuadros tienen la capacidad de elaborar una o más citotoxinas con la actividad de las células Vero, por lo que se les llama verotoxinas (VT) (Nataro, 1998; Salazar, 2009).

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que la citotoxina *stx* es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago *stx*, que está insertado en el genoma (O'Brien, 1987); *stx* actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60'S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero. En las cepas aisladas, se han encontrado las variantes *stx1* y *stx2* las cuales son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizan alguna de las toxinas o ambas. Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad, como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E) y presentan el gene cromosomal *eae*, que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina (Rodríguez 2002).



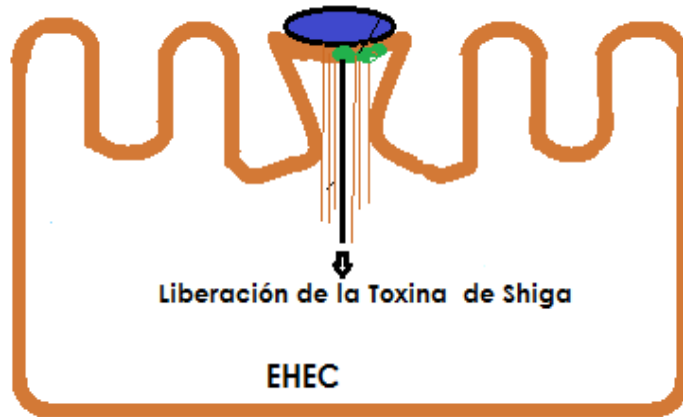


Figura.-3. Adhesión de EHEC a células epiteliales por medio de la intimina.

1.4.6.- *E.coli* enteroinvasiva (EIEC)

Se caracteriza por la capacidad de internalización y multiplicación dentro de las células epiteliales intestinales; causando muerte celular y acumulación de polimorfonucleados y produciendo disentería bacilar semejante a la producida por *Shigella*; ambas son descarboxilasas negativas, no móviles y lactosa negativa (Rodríguez, 2002).

El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa, para lo cual requiere de mucinasa y adhesinas; después de adherirse, entra por endocitosis a la célula epitelial, donde se multiplica y se disemina a células sanas adyacentes a través de su migración por el citoesqueleto (Nataro, 1998; Rodríguez, 2002).

La información genética para este mecanismo está en el loci (locus asociado con invasividad (*ia*)) del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en el plásmido de invasividad de 140 MDa llamado *plnv*, que codifica para las proteínas, como por ejemplo las *Ipah* y *Vir-F*,



entre otras, que están involucradas en el proceso de patogénesis (Eslava et al., 1994).

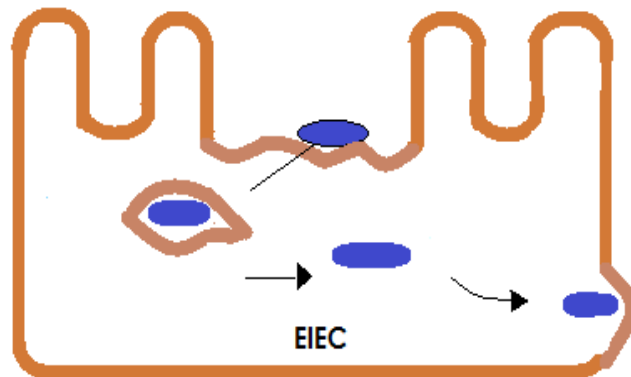


Figura.-4. Invasión de EIEC a una célula epitelial.

1.4.7.- *E.coli* enteroagregativa (EAEC)

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; las cepas tienen la capacidad de incrementar, en la mucosa, la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea (Savarino et al., 1991; Rodríguez, 2002).

El gen para una de estas proteínas se encontró en un plásmido de 65 MDa y a la proteína se le dio el nombre de Pet (Plásmidos que codifican toxina), la cual tiene la capacidad de producir efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por arredondamiento y desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina. En EAEC se ha descrito también la proteína *Pic* que está codificada en el genoma y que tiene actividad de proteasa (Nataro, 1998; Rodríguez, 2002).



1.5.- Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Durante la última década, se ha prestado gran atención al desarrollo de métodos inmunológicos y moleculares rápidos, sensibles y específicos para la detección e identificación de cepas patógenas de *E.coli* (Méndez, 2004). En el 2002 se publicaron tres nuevos protocolos de PCR multiplex que permiten la detección simultánea de numerosos genes que codifican toxinas de Shiga, la hemolisina entérica, la intimina, los serotipos O157 y el H7 (Pan et al., 2002). Estos protocolos no solo posibilitan la detección de los genes de virulencia y toxicidad más importantes asociados a *E.coli*, sino que además permiten diferenciar las variedades más patógenas. En el 2003 otros nuevos protocolos aportaron importantes avances en la detección de las cepas EPEC, VETEC, EIEC, ETEC, EAEC. En el 2003 utilizaron la detección simultánea de tres genes contenidos en plásmidos que confieren la denominada Adherencia de agregación (AA) a las variantes enteroagregativas. En el segundo protocolo de PCR multiplex, optimizaron un ensayo que permite la identificación y clasificación simultánea de los distintos tipos de *E. coli* causantes de diarrea mediante la detección de genes específicos de cepas enteropatogénicas, de cepas productoras de toxinas Shiga, de variantes enterotoxigénicas, de cepas enteroinvasivas y de variedades enteroagregativas (Toma et al., 2003).



2.- ANTECEDENTES

Dada la importancia de las cepas de *E. coli* enteropatógenas se ha hecho y se continúa haciendo investigación sobre este tipo de bacterias y la calidad del agua, pues se tiene la idea de que *E. coli* es un componente natural de la biota intestinal y que no representa ningún riesgo para la salud humana.

- ❖ Cortés *et al.*, (2002) reportan en un estudio hecho en el Valle de Chalco del Valle de México, que consistió en la tipificación de 1,118 muestras con una incidencia de 76.6% de *E.coli*: 62.2% correspondieron a ETEC (44.6% con LT, 11.2% con ST y 44.1% con ambas sondas), 0.84% para EIEC, 0.84% a EPEC, 0.08% a *E.coli* enterohemorrágica no-0157:H7 y 36.02% no se encontró asociación con *E.coli* patógena.
- ❖ Rivera *et al.*, (2002) realizaron un diagnóstico de las enterobacterias presentes en el Río Alseseca, Puebla. Ellos aislaron e identificaron las bacterias presentes; *E. coli* fue la más frecuente, representando el 44% del total de las muestras. También encontraron *Klebsiella sp*, *Serratia spp*, *Enterobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Cedacea spp.* y *Citrobacter spp.*
- ❖ Aguilar-Medina *et al.*, (2003) estudiaron la presencia de las bacterias causantes de diarrea, *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en dos ambientes acuáticos; agua superficial y agua subterránea en la zona de Xochimilco, haciendo una comparación con bacterias indicadoras consideradas en las normas oficiales mexicanas. Se tomaron en total 40 muestras de agua cubriendo las temporadas de secas y de lluvias. En cada temporada se tomaron muestras de 10



sitios de la zona de canales y 10 pozos. La PCR fue utilizada para amplificar ocho secuencias relacionadas con la patogenicidad de estas bacterias y una como marcador presente en todas las cepas de *E. coli*. Los resultados mostraron que el agua más contaminada fue la superficial, con el 100% de los sitios contaminados con al menos un sitio positivo a la prueba de coliformes y/o factores de virulencia, la temporada que presentó mayores índices de contaminación fue la de secas. Los factores de virulencia detectados fueron el plásmido pcvd430, Ler, SLTI y ial, lo que implica un riesgo para la salud pública.

- ❖ Díaz *et al.*, (2005) analizaron las propiedades físicas y químicas del agua y sedimento del lago de Zempoala durante un año. El oxígeno disuelto y el bióxido de carbono presentaron valores que indican proceso de descomposición, sobre todo en algunas áreas de la zona litoral y en el fondo. El sedimento se caracterizó como rico en materia orgánica, con zonas donde el pH tiende a la acidez y presenta cantidades variantes de nutrientes.
- ❖ Montiel (2005) evaluó los parámetros fisicoquímicos *in situ* en Xochimilco, realizó la cuantificación bacteriana del grupo coliforme y de este aisló un alto porcentaje de *E.coli* y de otros géneros como *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae*. A las cepas identificadas como *E. coli* se les realizó la identificación serológica para reconocer a qué grupo patógeno pertenecen; los resultados mostraron que dicho cuerpo de agua se encuentra con una alta contaminación bacteriológica y en cuanto a *E. coli* posee importancia clínica-epidemiológica ya que puede ser transmitida por el consumo de vegetales crudos provenientes de esta zona o simplemente con el contacto directo del agua.



- ❖ Chávez *et al.*, (2007) tipificaron 156 cepas de *E. coli* tomando como base la identificación de los genes LT y/o ST y la proteína longus, para lo cual emplearon la técnica de PCR y Western Blot, respectivamente. Los resultados mostraron que ETEC se encontró en 75% de las cepas de aire y agua, en 73.52% de las cepas aisladas de niños, en 61.11% en cepas obtenidas de alimentos y en 42.85% en cepas aisladas de adultos. Del total de éstas, sólo 51.58% expresó dos factores de virulencia (gen ST y longus) y 10.95% mostró el gen LT y/o longus. Se clasificaron como ETEC 63% del total de las cepas.
- ❖ Ramírez (2007) aisló e identificó cepas lactosa positiva de los canales de Xochimilco y de las cuales una gran proporción fueron *E. coli*, 82% para la época de estiaje y 69% en la época de lluvias. Del total de la muestras de *E. coli* analizadas, los grupos patógenos encontrados fueron: ETEC con un 22%, EPEC 12%, EHEC con 8%, EIEC con el 2% para la época de estiaje. Para la época de lluvias el 15% se catalogaron como EPEC, el 11% como EHEC, el 10% para EIEC y el 8% para ETEC y EAEC.
- ❖ Álvarez *et al.*, (2008) realizaron un estudio en la cuenca de río Amajac, Hidalgo, utilizando un método estandarizado para obtener el índice de calidad de agua (ICA). Seleccionaron 17 sitios representativos, empleando un Geoposicionador portátil (GPS) y en cada uno de los sitios determinaron: Turbidez, pH, Oxígeno Disuelto (O.D), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), Bacterias Coliformes Fecales y Sólidos Totales Disueltos (STD). La calidad del agua se clasificó como calidad media en el 29% de los sitios muestreados, el 59% se encontraron contaminados y el 12% se encontraron altamente contaminados. El rango de coliformes



fecales fue de 1.2×10^5 hasta 2.4×10^5 NMP/100 mL. El porcentaje de saturación de O.D fluctuó desde 0 hasta 115%, así mismo, observaron que la contaminación aumentaba cuando el pH disminuía. La DBO⁵ fue de 20.34 mg L^{-1} , los valores más altos de nitratos fueron de 19.67 mg L^{-1} ; para la Turbidez reportaron valores desde 7.52 hasta 76.33 NTU y finalmente para los STD los rangos fueron de 6.81 mg L^{-1} a 8.35 mg L^{-1} , concluyendo que la calidad del agua fue media.

- ❖ Chávez *et al.*, (2011) analizaron la composición química y bacteriológica del agua en la laguna de Chápala, seleccionando 16 sitios de muestreo localizados en ríos, presas, lagos y la laguna, el muestreo se realizó en tres fechas. Los resultados mostraron que la concentración de los contaminantes de las aguas superficiales de la Ciénega de Chápala se incrementó aguas abajo. El mayor aumento fue para la conductividad eléctrica (CE) coliformes fecales (CF) y Fósforo. La mejor calidad fue en la zona de ríos y presas con poca influencia de actividades antropogénicas, mientras que la más baja calidad correspondió al Lago de Chápala.
- ❖ Barrera *et al.*, (2013) en cuatro cuerpos acuáticos mexicanos (lago de Pátzcuaro, Mich, Xochimilco, D.F, la laguna de Metztitlán, Hgo, el lago de Zirahuén, Mich.) cuantificaron coliformes totales y coliformes fecales en el agua y sedimentos, mediante la técnica de Número Más Probable, ellos aislaron bacterias entéricas del agua mediante el uso de medios selectivos y evaluaron: el índice de sensibilidad, el riesgo atribuible y la presencia y ausencia de patógenos. Pátzcuaro y Xochimilco mostraron alta contaminación bacteriana. El sedimento presentó mayor concentración de CT y CF que el agua. Los CF mostraron ser indicadores más confiables para predecir la presencia



de *Salmonella* y *Shigella*, con una sensibilidad para cada género de 60 y 75% y un riesgo atribuible del 58 y 67%. Los CF mostraron una relación presencia-ausencia con un porcentaje de casos verdaderos del 82 a 88%. En contraste, los CT mostraron un riesgo atribuible bajo (inferior a 27%) y un alto porcentaje de falsos Positivos (65%), lo que impidió considerarlo como un buen indicador.

- ❖ Robles *et al.*, (2013) determinaron la calidad del agua del acuífero Tepalcingo-Axochiapan, México. Hicieron seis muestreos y tomaron muestras en ocho pozos de agua potable antes de añadirle cloro y en un manantial. Determinaron dos parámetros bacteriológicos y once fisicoquímicos. La mayoría de los pozos y el manantial presentaron aguas muy duras. Los pozos mostraron concentraciones más elevadas de sólidos disueltos en las zonas de menor altitud con excepción del manantial. El manantial presentó mayores diferencias con respecto a los demás pozos. Bacteriológicamente, el manantial y un pozo no son adecuados para actividad recreativa ni potable y fisicoquímicamente tres pozos son inadecuados como fuente de suministro de agua potable.



3.- JUSTIFICACIÓN

Dado que los agentes patógenos pueden alcanzar las dosis infectivas, es importante realizar un análisis para determinar el tipo de organismos que están presentes en el embalse de Valle de Bravo, ya que éste aporta el 38% del agua total del sistema Cutzamala (6 m³/seg.), el cual suministra un tercio del agua potable consumida en la Ciudad de México, además de abastecer al poblado de Valle de Bravo. Por su uso como abastecimiento de agua potable y de recreación, es importante tomar en cuenta que recibe descargas continuas de agua residual a través de efluentes de ríos y arroyos. En este trabajo se realizó el aislamiento e identificación de *E. coli* a partir del grupo Coliforme para establecer mediante pruebas bioquímicas a qué grupo entérico pertenecen los aislados de *E. coli*.

4.- OBJETIVOS

4.1.-OBJETIVO GENERAL

Realizar el aislamiento e identificación de *E. coli* potencialmente patógenas a partir de los coliformes presentes en el embalse de Valle de Bravo.

4.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Conocer las condiciones ambientales del embalse a través de algunos parámetros fisicoquímicos.
- ❖ Registrar la abundancia de coliformes totales y fecales en el embalse de Valle de Bravo, mediante la técnica del NMP.
- ❖ Realizar la identificación de *E. coli* utilizando la caracterización bioquímica IMVIC, más otra prueba diferencial utilizando tres azúcares (lactosa, manitol y maltosa).
- ❖ Determinar en las cepas de *E. coli* identificadas y aisladas la presencia de genes de virulencia mediante pruebas moleculares.

~ 20 ~



5.- ÁREA DE ESTUDIO

Se reconoce como sistema Cutzamala al conjunto de obras de infraestructura hidráulica que se encarga de abastecer a la ciudad de México de agua potable desde 1982; abarca principalmente el territorio de los estados de México y Michoacán, formando parte de la cabecera de la Cuenca del Río Balsas. El sistema está compuesto principalmente por 7 presas: Tuxpan, El bosque, Colorines, Ixtapan del oro, Chilesdo, Villa Victoria y Valle de Bravo (Gaceta de gobierno, 2007; Periódico Oficial, 2008).

Valle de Bravo es un embalse tropical de altura situado al oeste de la ciudad de Toluca, en el Estado de México, en las coordenadas 19° 11'50" N y 100° 09'13" W, a una altitud de 1785 msnm. Suministra agua potable a una población de aproximadamente 6 millones de habitantes en la ciudad de México (Ramírez et al., 2004), es parte del Sistema Cutzamala ubicado en la cuenca alta del río Balsas, que pertenece a la Región Hidrológica 18 (RH-18). La cuenca se ubica en la provincia fisiográfica Eje-Neovolcánico Transversal. De acuerdo a su ubicación y a su topografía, el embalse presenta clima templado subhúmedo con lluvias en verano (CONAGUA 2005). Tiene una superficie aproximada de 19 km y representa un 3.5% de la cuenca de drenaje. La profundidad media es de 20 metros y la profundidad máxima es de 35 m (Olvera et al., 1998).

Para cubrir los objetivos del presente estudio se realizaron un total de 7 muestreos uno cada mes, comprendiendo del periodo de septiembre a noviembre de 2010 y de abril a julio de 2011 tomando en cuenta época de secas y lluvia.

En este estudio se seleccionaron ocho puntos de muestreo, los que se mencionan a continuación (Figuras 5-9):



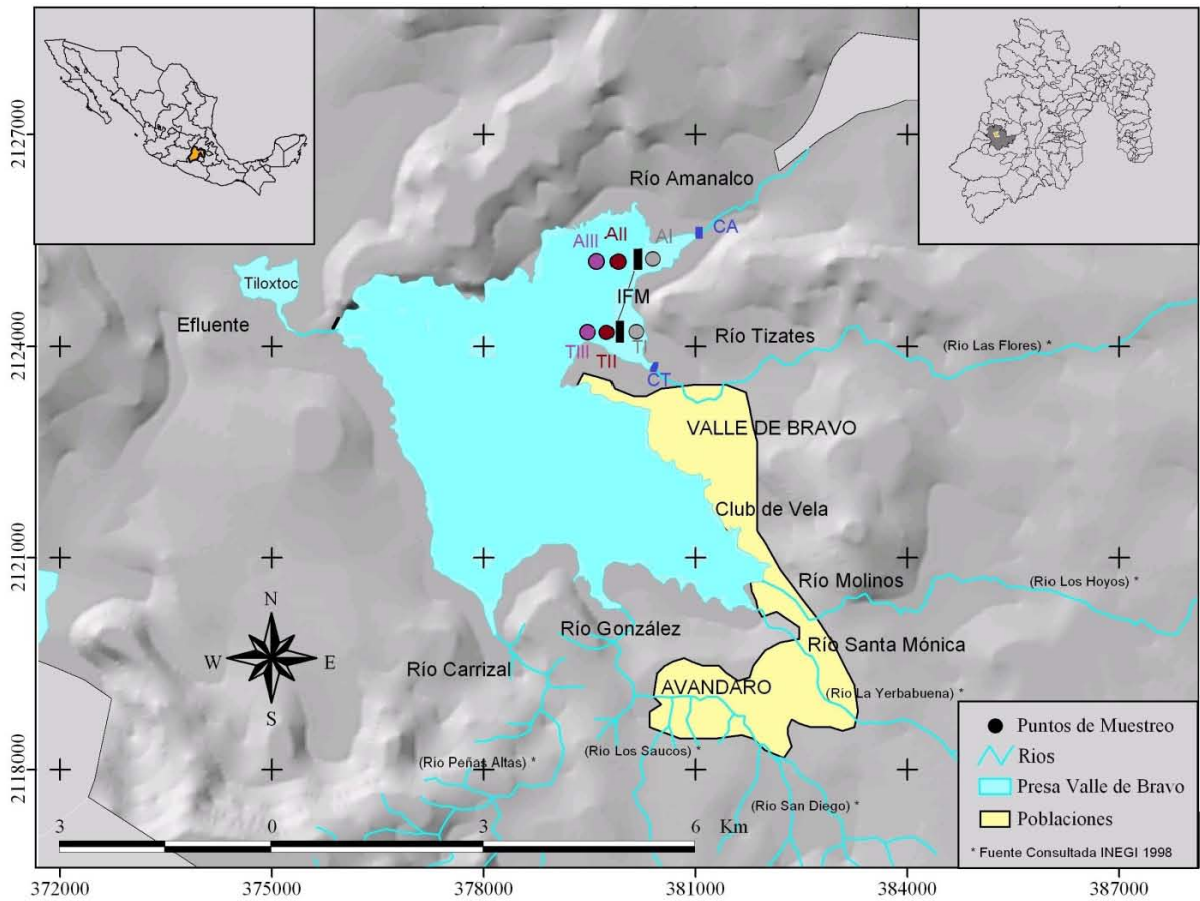


Figura.-5. Sitio de muestreo del embalse Valle de Bravo, Estado de México.





Figura 6.- Sitios de Tizates I, II, III.

- ❖ TI. el más próximo a la desembocadura del río Tizates. Coordenadas $19^{\circ} 12.248' N$ y $100^{\circ} 08.442' W$.
- ❖ TII. a una distancia de 50-70 metros en línea recta del punto anterior. Coordenadas $19^{\circ} 12.262' N$ y $100^{\circ} 08.467' W$.
- ❖ TIII. a una distancia de 100-150 metros en línea recta de la estación Tizates I. Coordenadas $19^{\circ} 12.288' N$ y $100^{\circ} 08.498' W$.





Figura 7.- Sitios de Amanalco I, II, III.

- ❖ Al. el más próximo a la desembocadura del río Amanalco. Coordenadas $19^{\circ} 13.145' N$ y $100^{\circ} 08.127' W$.
- ❖ All. a una distancia de 50-70 metros en línea recta del punto anterior. Coordenadas $19^{\circ} 13.122' N$ y $100^{\circ} 08.171' W$.
- ❖ Alll. a una distancia de 100-150 metros en línea recta de la estación Amanalco I. Coordenadas $19^{\circ} 13.105' N$ y $100^{\circ} 08.216' W$.





Figura 8.-CT. Cauce del Río Tizates 19° 12.06' N y 100° 08.10' W.



Figura 9.-CA. Cauce del Río Amanalco, coordenadas 19° 30.25' N y 100° 07.39'W.



6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.-Parametros ambientales

En la capa superficial del agua (0.5 m) se determinaron los siguientes parámetros *in situ*: Temperatura del agua (°C), Oxígeno Disuelto (O.D., mg L⁻¹), utilizando un Oxímetro YSI 85, (Ohio, USA), pH (unidades) con un potenciómetro digital HANNA HI 9126 (pH/ORP).

6.2.- Toma de muestras para coliformes totales y fecales

Para el análisis bacteriológico se colectaron un total de 56 muestras de agua en los diferentes puntos de muestreo (Cauce Río Tizates y Amanalco, cerca de las islas micrófitas). Se utilizaron bolsas de plástico estériles con cierre hermético, etiquetadas, las cuales, una vez con la muestra se transportaron al laboratorio en hielo, a una temperatura aproximada de 4°C.

Posteriormente en el laboratorio se realizó el conteo de coliformes totales y fecales por el método del Número más Probable (NMP), serie de cinco tubos con diluciones de (10mL, 1mL, 10⁻¹,10⁻²,10⁻³,10⁻⁴,10⁻⁵). Para la cuantificación de coliformes totales (Prueba presuntiva) se utilizó Caldo Lactosado (10 mL) en tubos de ensayo de 16x15mm con cámara de Durham; para observar la producción de gas, los tubos se incubaron a 37°C durante 48hrs.

Así mismo los positivos se resembraron en dos tubos con campana Durham, uno con 10mL de caldo Bilis Verde Brillante (BVB) y otro con 10mL de caldo EC, para realizar la prueba confirmativa de coliformes totales y fecales. Para ello se incubaron a 37°C durante 24hrs en bilis verde brillante y en caldo EC en baño de agua a 44 ± 0.5°C por 24hrs.



6.3.- Aislamiento e identificación de *E. coli*

Se realizó el aislamiento de *E. coli* tomando una asada de los tubos con caldo EC que produjeron gas en la técnica NMP y se sembró por estría en cajas con medio Mac Conkey y Mac Conkey con sorbitol para confirmar la presencia de *E. coli* corroborada por la aparición de colonias con las características morfológicas típicas tales como: colonias de pequeñas medidas con el centro hundido redondas, lisas o rugosas (Molina, 2003). Posteriormente a las colonias seleccionadas se les realizó una identificación preliminar por medio de las pruebas IMVIC (Anexo I).

6.4.- Extracción de DNA de *E. coli* por ebullición

Las cepas de *E. coli* aisladas de los diferentes puntos se cultivaron en placas de TSA, para poder obtener un cultivo fresco; las placas se incubaron a 37°C durante 24hrs. Posteriormente se tomó una asada con abundante biomasa, el contenido se colocó en tubos eppendorf conteniendo 1 mL de agua desionizada estéril, se homogenizó en vórtex. Los tubos sellados se sometieron a ebullición durante 8min, pasado ese tiempo se colocaron en hielo para precipitar las proteínas y asimismo se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min.

6.5.- Identificación de Genes de Virulencia por PCR.

Para determinar los patotipos, se corrió el DNA extraído con las siete secuencias específicas para el análisis de genes relacionados con los factores de virulencia de *E. coli* (Cuadro 2).



Patotipo	Gen	Descripción	Secuencia
EHEC	<i>stx1</i>	Toxina Shiga like, que produce lisis en el cultivo celular, con 302pb	F:5' ctg gat tta atg tgc cat agt 3' R:5' aga acg ccc act gag atc atc 3'
EHEC	<i>stx2</i>	Toxina Shiga like, que produce lisis en el cultivo celular, con 518pb	F:5' ggc act gtc tga aac tgc tcc 3' R:5' tgc cca gtt atc tga cat tct 3'
EHEC	<i>eaeA</i>	Codifica para la proteína de la membrana externa	F:5' gac ccg gca caa gca taa gc 3' R:5' cca cct gca gca aca aga gg3'
EPEC	<i>bfpA</i>	Gen que codifica para la subunidad del pili BFP	F:5' aat ggt gct tgc tgc 3' R:5' gcc gct tta tcc aac ctg gta 3'
EPEC	<i>st</i>	Gen que codifica para la síntesis de la toxina termoestable de <i>E. coli</i> .	F:5' att ttt ctt tct gta ttg tct t 3' R:5' cac ccg gta caa gca gga tt 3'
ETEC	<i>lt</i>	Gen que codifica para la síntesis de la toxina termolábil de <i>E. coli</i> .	F:5' ggc gac aaa tta tac cgt gc 3' R:5' cgg tct cta tat tcc ctg tt 3'
EIEC	<i>ial</i>	Gen con secuencia de 320 pb del locus asociado con invasividad	F:5' ggt atg atg atg atg agt cca 3' R:5' gga ggc caa caa tta ttt cc 3'

Cuadro 2. Genes asociados a factores de virulencia de cepas patógenas de *E. coli*



6.6.- PCR Multiplex.

Esta es una variante de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que permite la amplificación de múltiples segmentos de DNA empleando dos o más pares de primers simultáneamente en un mismo tubo. Este procedimiento se realizó bajo las siguientes condiciones: en cada tubo de reacción se colocaron 2.5 μL de buffer 10x, 0.75 μL de MgCl (50 mM), 2.5 μL de dNTPs (2 mM)(dATP, dTTP, dGTP y dCTP), el pool de oligos 0.625 μL de cada uno, 8.95 μL de agua para PCR, 0.3 μL de Taq polimerasa (5U/ μL) y 5 μL del DNA muestra, obteniendo un volumen final de 25 μL . Así mismo se realizó por separado cada gen con las siguientes cantidades por tubo de reacción: 2.5 μL de buffer 10x, 0.75 μL de MgCl (50 mM), 0.5 de dNTPs (2 mM)(dATP, dTTP, dGTP y dCTP), de oligos 1.75 μL de cada uno, 17.5 μL de agua para PCR, 0.1 μL de Tac polimerasa (5U/ μL) y 2 μL del DNA muestra, obteniendo un volumen final de 25 μL . Una vez listo el tubo de reacción se seleccionaron las siguientes condiciones en el termociclador 1 ciclo de 94°C 5min., 50°C 2min, 35 ciclos de 72°C 0.45min, 94°C 0.45min, 50°C 0.45min, 1 ciclo de 72°C 10min dando un total de 37 ciclos (Figura 10). Posteriormente se preparó un gel de agarosa al 2% y en cada pozo se colocaron 5 μL del producto de PCR más 2 μL de buffer de carga y se corrió a 90 V por un periodo de 30min, se observó el producto amplificado en un transiluminador en luz UV (Anexo III).

6.7.- CANOCO

Se realizó un análisis utilizando el programa CANOCO 4.5 para Windows, con el fin de detectar las variables ambientales que podrían asociarse con los patotipos de *E. coli*.



CONDICIONES DEL TERMOCICLADOR

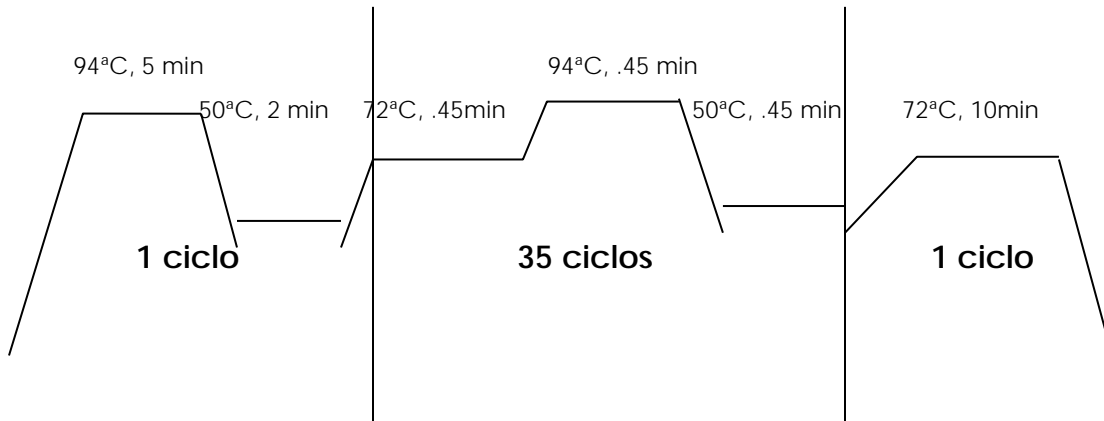


Fig. 10.- Condiciones del Termociclador para PCR Multiplex.



Fig. 11.- Termociclador para PCR.



7.- RESULTADOS

El estudio se realizó en el embalse de Valle de Bravo y en dos cauces de ríos que llegan a dicho cuerpo de agua, se efectuó durante los meses de septiembre a noviembre de 2010 y de abril a julio de 2011. En ese periodo se realizaron 75 análisis de parámetros fisicoquímicos y se aislaron 71 cepas de las cuales 55 se identificaron como *E. coli*.

7.1.- Fisicoquímicos

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos estudiados mostraron: un promedio anual de Temperatura del Agua, de 22.8°C para el 2010 y de 24.3°C para el 2011; la temperatura más baja registrada fue de 20.5°C en el mes de noviembre del año 2010, en la estación de Amanalco III y la más alta fue en el mes de mayo del 2011 con 25.3°C en Amanalco I (Cuadro 3).

Con respecto al pH, éste mostró una tendencia a la alcalinidad durante el periodo de muestreo, se encontró un promedio anual para el 2010 de 8.52 y en el 2011 de 9.14, en el análisis por mes se observa que el valor más bajo se presentó en noviembre de 2010 (7.16) en Tizates III y el mes de junio de 2011 tuvo el más alto (9.55) en Amanalco III (Cuadro 4).

Por otro lado las cifras obtenidas para el Oxígeno disuelto, durante el estudio, fueron de 7.56 mg/L como promedio anual en el 2010 y de 8.75 mg/L para el 2011, mostrando el valor más bajo en el mes de noviembre de 2010 (3.62 mg/L) y en mayo de 2011 el más alto (9.9mg/L) (Cuadro 5).



	SEP	OCT	NOV	Promedi o anual 2010	ABR	MAY	JUN	JUL	Promedi o anual 2011
Tizates I	22.9	23.4	21.0	23.2	23.2	25.2	24.5	24.1	24.3
Tizates II	22.7	22.7	21.1	22.7	24.8	25.3	24.7	24.1	24.7
Tizates III	22.7	23.0	20.8	22.9	23.9	25.0	24.6	24.1	24.4
Amanalco I	22.8	22.5	20.9	22.7	22.8	25.3	24.5	23.9	24.1
Amanalco II	22.9	22.5	21.0	22.7	23.5	25.2	24.5	24.2	24.4
Amanalco III	23.1	22.8	20.5	23.0	23.4	25.0	24.2	23.8	24.1
Promedio Total	22.9	22.8	20.9	22.8	23.6	25.2	24.5	24.0	24.3

Cuadro 3. Valores obtenidos de Temperatura del Agua (°C) en los diferentes puntos de muestreo.

	SEP	OCT	NOV	Promedi o anual 2010	ABR	MAY	JUN	JUL	Promedi o anual 2011
Tizates I	8.55	8.30	7.23	8.43	8.43	8.9	9.2	8.9	8.86
Tizates II	8.50	8.42	7.18	8.46	8.80	9.38	9.3	9.02	9.13
Tizates III	8.64	8.45	7.16	8.55	8.99	9.50	9.50	9.00	9.25
Amanalco I	8.66	8.54	7.50	8.60	8.78	9.44	9.53	9.07	9.21
Amanalco II	8.65	8.45	7.31	8.55	8.55	9.33	9.51	9.06	9.11
Amanalco III	8.61	8.49	7.32	8.55	8.92	9.43	9.55	9.18	9.27
Promedio Total	8.60	8.44	7.28	8.52	8.75	9.33	9.43	9.04	9.14

Cuadro 4. Valores obtenidos de pH en los diferentes puntos de muestreo.



	SEP	OCT	NOV	Promedi o anual 2010	ABR	MAY	JUN	JUL	Promedi o anual 2011
Tizates I	6.46	7.76	4.23	7.11	8.15	9.43	7.72	8.82	8.53
Tizates II	5.96	7.92	3.93	6.94	8.02	8.38	8.56	8.75	8.43
Tizates III	6.61	8.28	3.62	7.45	8.55	9.9	7.81	8.6	8.72
Amanalco I	7.39	9.08	6.84	8.24	8.20	9.60	9.25	9.25	9.08
Amanalco II	7.22	8.92	5.48	8.07	8.61	9.46	7.69	9.3	8.77
Amanalco III	7.02	8.11	5.98	7.57	8.45	9.75	8.20	9.59	9.00
Promedio Total	6.78	8.35	5.01	7.56	8.33	9.42	8.21	9.06	8.75

Cuadro 5. Valores obtenidos de Oxígeno Disuelto (mg/L) en los diferentes puntos de muestreo.

Para DBO₅ se encontró un promedio anual de 2.845 mg/L el 2010, para el 2011 fue de 2.948 mg/L, en el análisis por mes el valor más bajo fue en el mes de noviembre de 2010 en Tizates II con 1.629mg/L, en el mes de abril de 2011 en Tizates I se registraron los valores más altos (4.078 mg/L) (Cuadro 6).

En cuanto a los valores de DQO, el promedio anual del 2010 fue de 11.6 mg/L, para el 2011 fue de 22.2 mg/L. Los valores más bajos (4.2 mg/L) fueron en el mes de noviembre en Amanalco II, los más altos son igualmente en Amanalco II en el 2011 de 51.946 mg/L (Cuadro 7).



	SEP	OCT	NOV	Promedi o anual 2010	ABR	MAY	JUN	JUL	Promedi o anual 2011
Tizates I	3.055	3.564	3.818	3.479	4.078	2.900	2.953	1.880	2.953
Tizates II	2.724	2.546	1.629	2.299	3.983	3.357	1.913	2.299	2.888
Tizates III	2.571	2.266	2.749	2.529	4.010	3.100	2.433	2.100	2.911
Amanalco I	2.342	3.895	3.080	3.106	3.357	3.078	3.217	1.913	2.891
Amanalco II	2.571	3.182	2.393	2.715	3.700	3.983	3.842	1.992	3.379
Amanalco III	2.851	2.818	3.156	2.942	3.168	2.490	2.889	2.117	2.666
Promedio Total	2.686	3.045	2.804	2.845	3.716	3.151	2.874	2.050	2.948

Cuadro 6. Valores obtenidos de DBO₅ (mg/L⁻¹) en los diferentes puntos de muestreo.

	SEP	OCT	NOV	Promedio anual 2010	ABR	MAY	JUN	JUL	Promedio anual 2011
Tizates I	19.047	15.872	11.111	15.343	22.525	38.888	22.525	15.670	24.902
Tizates II	12.698	11.111	9.523	11.111	12.895	20.281	15.058	23.178	17.853
Tizates III	12.698	15.872	6.349	11.640	17.710	29.585	18.791	19.424	21.378
Amanalco I	14.285	11.111	8.571	11.322	15.996	36.767	24.270	15.017	23.013
Amanalco II	14.285	14.285	4.127	10.899	20.893	51.946	36.420	20.893	32.538
Amanalco III	14.285	7.936	6.349	9.523	11.099	21.587	12.119	9.141	13.486
Promedio Total	14.550	15.872	7.672	11.640	16.853	33.176	21.531	17.220	22.195

Cuadro 7. Valores obtenidos de DQO (mg/L⁻¹) en los diferentes puntos de muestreo.



7.2.- Conteo de Coliformes Totales y Fecales

En la Figura 12 se observa que las coliformes presentaron el mismo comportamiento, teniendo un aumento en el mes de octubre (13×10^3 NMP/100mL).

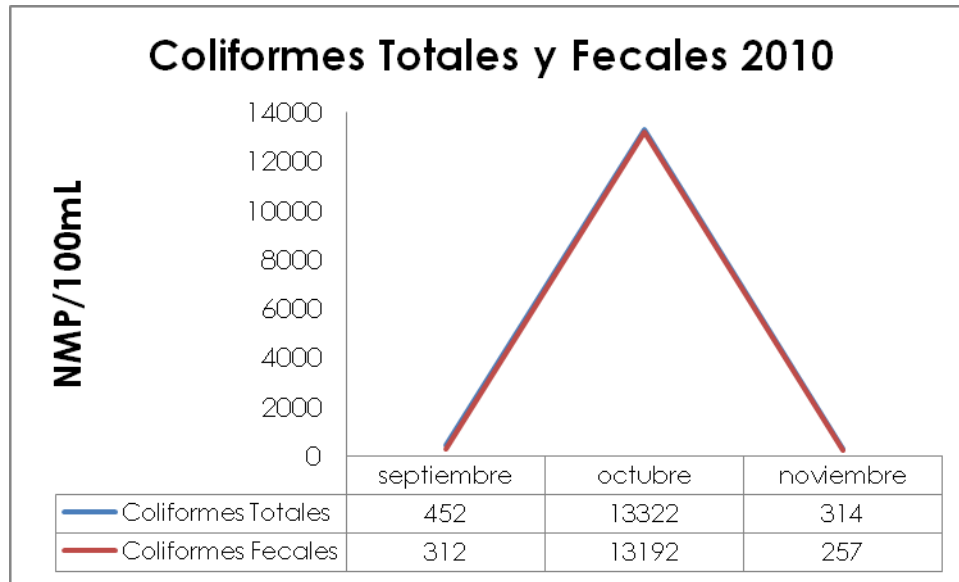


Figura12.- Coliformes Totales y Fecales 2010.

Por otro lado en el año 2011 se observa que en los cuatro meses de muestreo los valores más altos correspondieron a las coliformes totales y en el análisis por mes se observó un incremento en abril (13.6×10^3 NMP/100mL) y para julio los valores más bajos (1.5×10^3 NMP/100mL); en cuanto a las coliformes fecales, en los meses de abril y junio se obtuvieron valores más altos (2.34×10^3 NMP/100mL) que en el mes de mayo (3×10^2 NMP/100mL) y que en julio (6×10^2 NMP/100mL) (Figura 13).



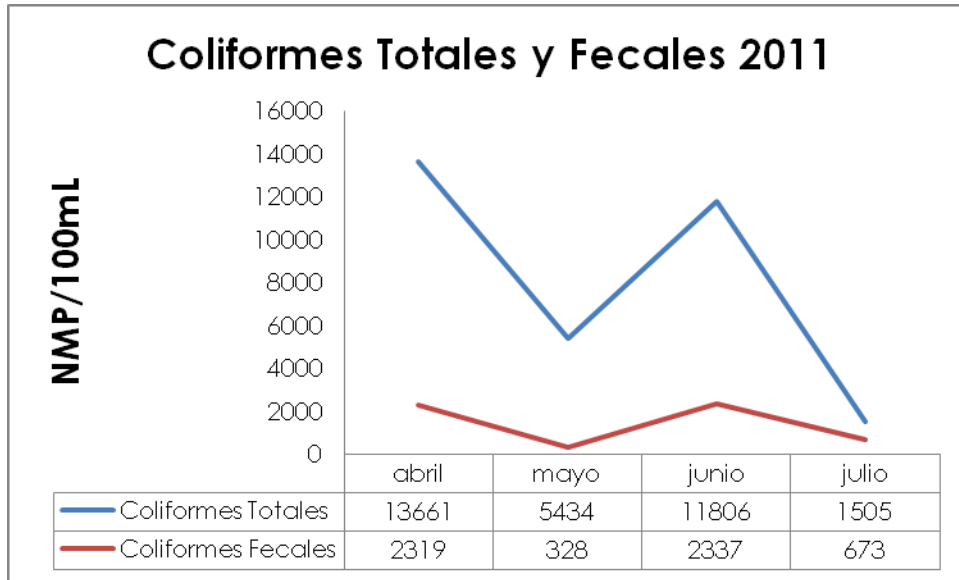


Figura 13. Coliformes Totales y Fecales 2010.

7.3.- Aislamiento e identificación de bacterias

El aislamiento de *E. coli* se realizó a partir de los tubos positivos de EC provenientes de la prueba por tubos múltiples para el grupo coliforme, la identificación se hizo con las pruebas bioquímicas IMVIC (Anexo I), que dio como resultado la identificación de 71 cepas que correspondieron a diferentes géneros. El resultado mostró que el 78% (55 cepas) correspondieron a *E. coli* (Figura 14). Más una prueba adicional de tres azúcares (Maltosa, Manitol, Lactosa) para ampliar el espectro de identificación (Cuadro 8).



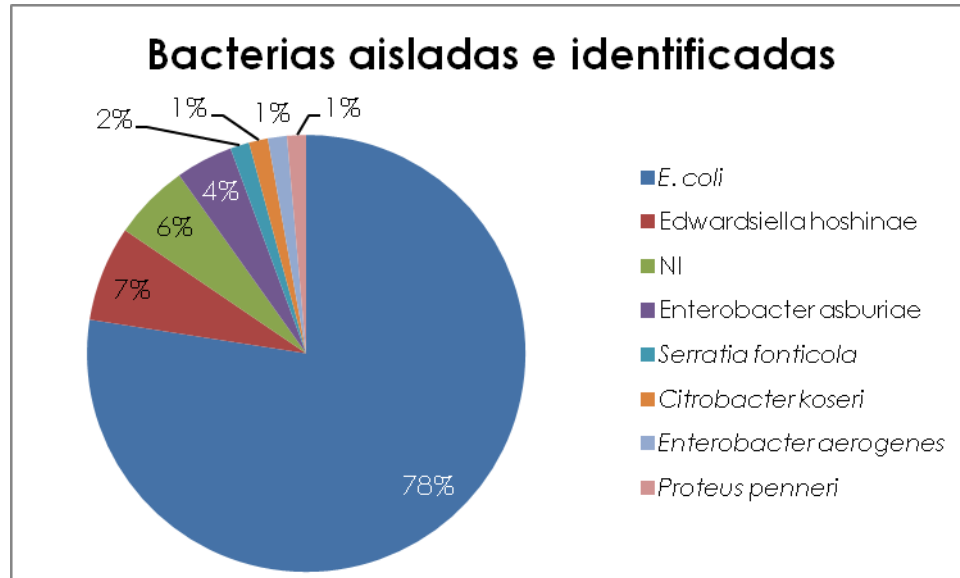


Figura 14. Porcentaje de bacterias aisladas e identificados.

7.4.- Genes de virulencia

Se buscaron genes de virulencia mediante un ensayo de PCR, a las cepas de *E. coli* aisladas en el presente estudio. Los resultados obtenidos mostraron que el 76% presenta al gen *stx2*, el 10% el gen *eaeA*, el 9% el *bfpA* y el restante 5% el gen de *ial* (Figura 15).

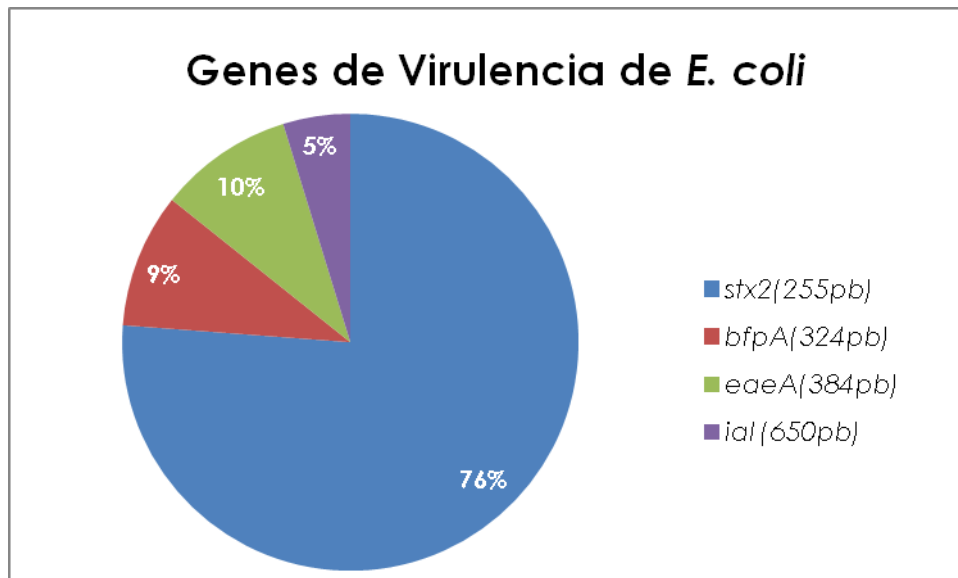


Figura 15. Porcentaje de Genes obtenidos.



Para el año de 2010 se detectó en el mes de octubre en el sitio de Amanalco II el gen *ial*, para Amanalco I dos genes de *stx2* y en cuanto a Tizates I un gen de *stx2*; para noviembre en el sito del cauce Amanalco se detectaron dos genes de *eaeA* y uno de *stx2*, en Amanalco II un gen *stx2*, en Amanalco III se encontró un gen *bfpA* y dos *stx2*, para el cauce de Tizates, Tizates I y Tizates III un gen de *stx2*. Cabe mencionar que en el mes de septiembre no se detectó la presencia de genes (Figuras 16 y 17).

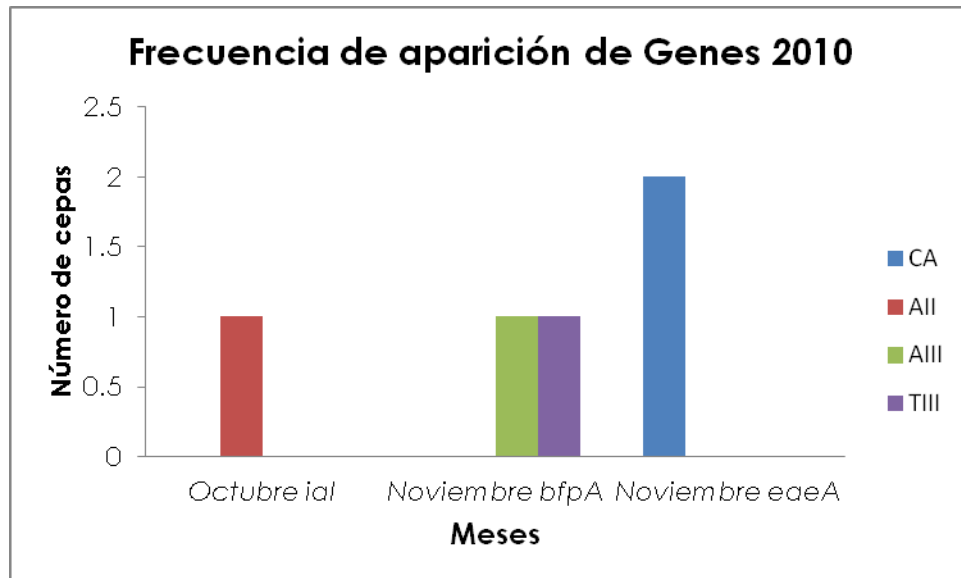


Figura 16. Genes obtenidos en 2010.



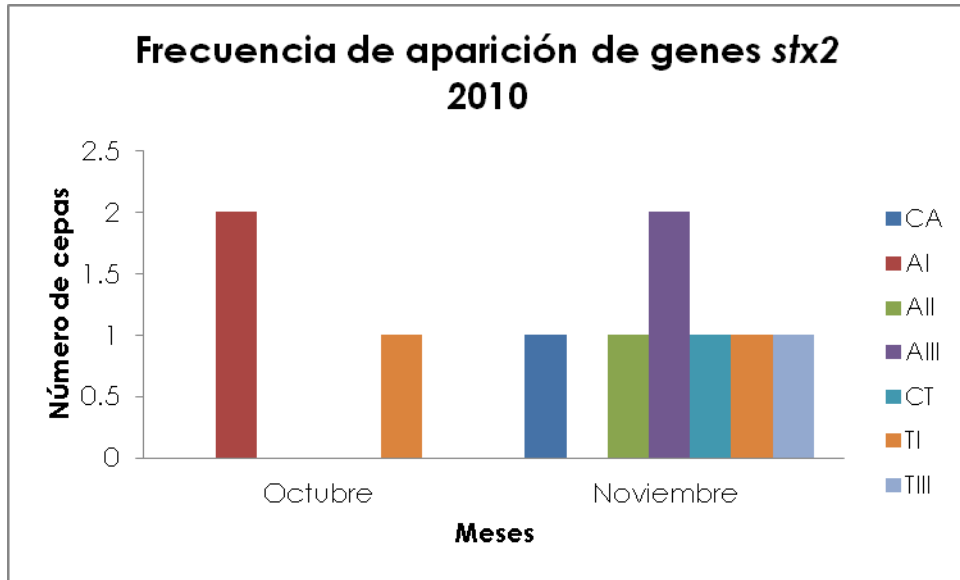


Figura 17. Genes *stx 2* en 2010.

Por otro lado en el año 2011 sólo se detectaron genes de *stx2*, en el mes de abril se obtuvo un gen en el sitio del cauce del río Tizates, en el mes de mayo un gen en el cauce del río Amanalco y del Tizates II, al igual en este sitio y en Tizates III hubo presencia de 2 genes en el mes de julio (Figura 18).

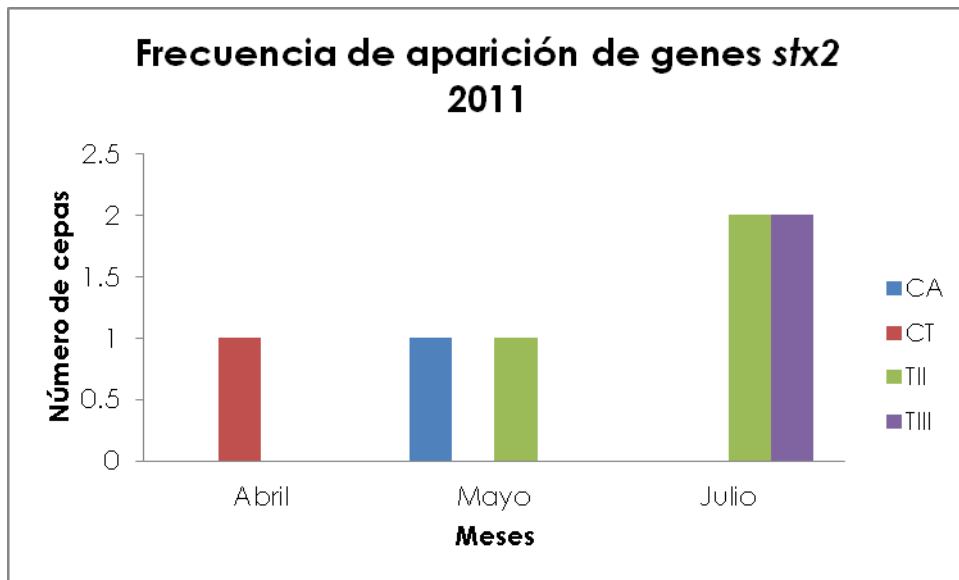


Figura 18. Genes *stx2*, 2011.



7.5.-Correlación de fisicoquímicos y patotipos de *E. coli* utilizando CANOCO.

En el análisis de CANOCO se encontró relación en octubre Tizates I con EHEC (*stx2*) y DQO, en el mismo mes repitiéndose el patotipo en el sitio de AI, se asocia con DBO₅, el mes de noviembre presentó mayor variación y frecuencia sin relación alguna con los fisicoquímicos.

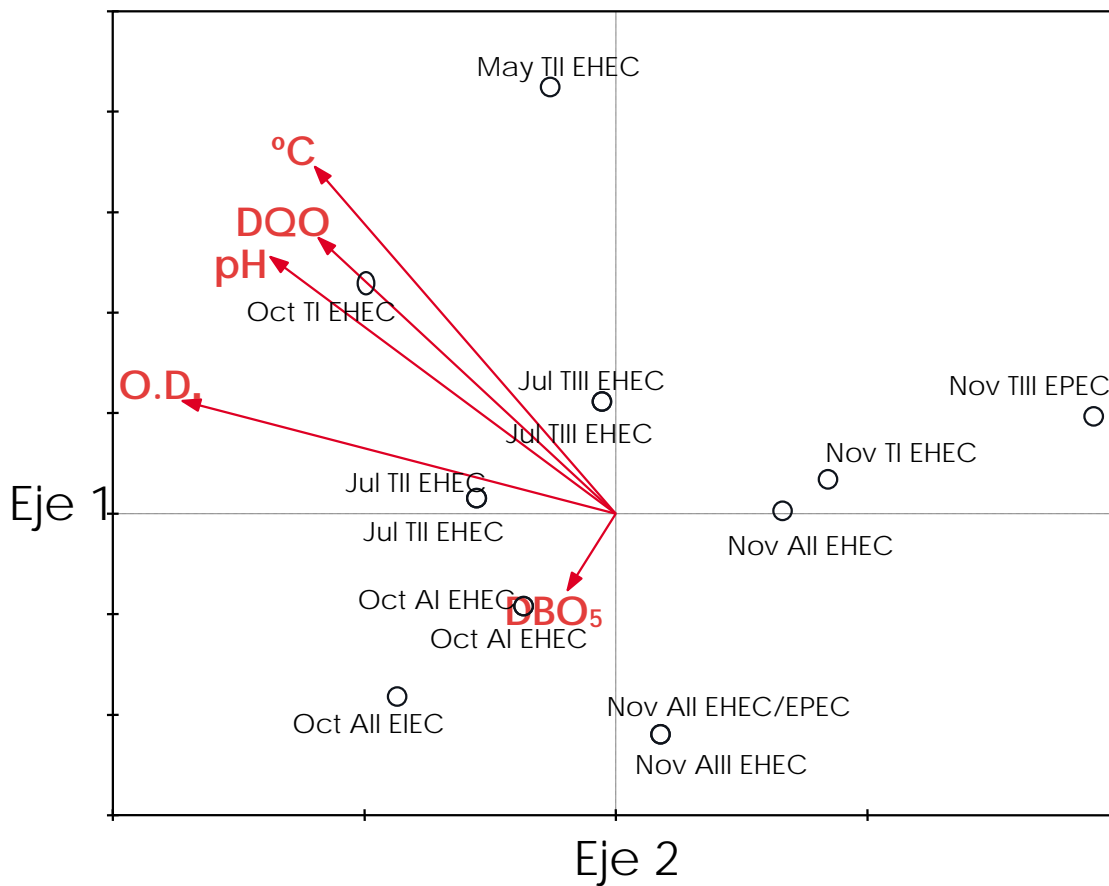


Figura 19.- Relación de parámetros fisicoquímicos y patotipos de *E. coli*.



8.- Discusión

En el presente estudio se determinaron parámetros ambientales y fisicoquímicos que se comportaron de la siguiente forma:

La temperatura es el factor con más influencia en los cuerpos acuáticos ya que determina: densidad, viscosidad y movimiento del agua, también juega un papel importante en la distribución, periodicidad y reproducción de los organismos, puede ocasionar que la población bacteriana desaparezca o sobreviva por más tiempo en el ambiente (Microbiología del Agua 1985). En un ambiente natural su variación se produce por cambios climáticos y por el movimiento constante del cuerpo de agua. Los datos obtenidos de temperatura del agua para Valle de Bravo oscilaron entre 22.8 y 22.9 °C para el 2010 y 23.7 a 25.2 °C en 2011, situación que es favorable para el crecimiento de diferentes microorganismos como es el caso de *E. coli* cuyo rango de temperatura va desde 10 °C como temperatura mínima a los 37 °C como óptima y 45 °C como máxima (Presscott, 2002).

El rango de pH en el estudio fue en el 2010 de 8.43 a 8.60 unidades y en el 2011 de 8.78 a 9.53; para el año del 2011 sobrepasa ligeramente el rango de pH óptimo para el grupo coliforme (6.5 - 9.0, APHA, 1985).

Los niveles de oxígeno obtenidos variaron de 5.96 a 9.9 mg/L, los menores valores se registraron en septiembre y octubre, de abril a julio los valores de oxígeno son altos, probablemente debido a la aireación que provoca el viento así como a la actividad fotosintética de los organismos.

La Demanda Bioquímica de Oxígeno, no sobrepasó los niveles permitidos por la NOM-001-SEMARNAT-1996 de 30 mg L⁻¹ para uso público urbano, lo cual indica que la carga de materia orgánica no es muy alta. Se observó que los mayores valores registrados en los meses de octubre 2010 y abril de 2011, corresponden a las mayores cuentas de bacterias.



Con respecto a la Demanda Química de Oxígeno, los valores rebasan el límite recomendado para aguas destinadas al abasto (10 mg L⁻¹), en todos los sitios muestreados, excepto en noviembre.

En el presente estudio se realizó la cuantificación de Coliformes Totales y Coliformes Fecales por la técnica del NMP, las cuentas mas altas y que sobrepasaron los límites de 1000 NMP/100mL que menciona la Norma Oficial Mexicana (1996) se reportaron para el año 2010 en el mes de octubre, en la estación de Tizates I, II y III, esto debido a que se observaron descargas de desechos en las corrientes. Por otro lado la estación de Amanalco se mantuvo dentro de los límites de la norma. Cabe mencionar que tanto Coliformes Totales y Coliformes Fecales tuvieron un mismo comportamiento para este año, observándose casi las mismas cuentas. Para el año 2011 el conteo de Coliformes fue en su totalidad de organismos Fecales lo que indica el aporte de excretas al sitio; estos valores sobrepasan los límites máximos permisibles para uso de riego.

Posteriormente la identificación de las bacterias aisladas demostró la presencia de diferentes géneros de la familia de *Enterobacteriaceae* (Gráfica 3). *E. coli* fue el microorganismo más común (78%), hecho que resulta relevante por la importancia que esta bacteria tiene como patógeno involucrado en la etiología de las diarreas (Eslava, 1994).

E. coli al igual que otras bacterias, genera ciertos tipos de mecanismos biológicos que conducen a un fenotipo de resistencia que les permite sobrevivir, también han desarrollado ciertos factores de virulencia que pueden causar daño al hospedero, ya que favorecen la colonización y facilitan la sobrevivencia de bacterias infectantes.

Al hacer el análisis con el CANOCO se observa que la mayor frecuencia de patotipos se dio en la época de estiaje cuando el embalse está en proceso de mezcla (octubre y noviembre), se cree que la bacteria permanece en algún sustrato y al empezar la mezcla ésta produce su

~ 42 ~



mayor distribución. En el mes de noviembre se presentó la mayor frecuencia y diversidad de patotipos, cabe mencionar que es el mes con valores más bajos en los análisis fisicoquímicos excepto DBO_5 y en el conteo de bacterias, probablemente favorables para su desarrollo.

En cuanto a los ensayos de PCR para determinar genes relacionados con virulencia se encontró que la mayor diversidad y frecuencia se presenta en el mes de noviembre con los patotipos de EHEC y EPEC. También en el mes de julio se observó un mayor número de aislamientos, pero sólo de EHEC al aumentar el O.D. el cual se puede explicar por el aumento de lluvias en ese mes, que elevan la concentración del gas y además arrastran sedimentos que albergan a estos organismos.



9.-Conclusiones

- ❖ Los datos obtenidos de Temperatura son favorables para el crecimiento de *E. coli*.
- ❖ El pH es óptimo para el crecimiento del gupo coliforme.
- ❖ Los valores de DBO₅ no sobrepasarán los niveles permitidos por la NOM-001-SEMARNAT-1996 de 30 mg L⁻¹ para uso público urbano.
- ❖ La DQO rebasa el límite recomendado para aguas destinadas al abasto.
- ❖ Los niveles de oxígeno son elevados.
- ❖ El conteo de CT y CF sobrepasaron los límites permisibles según las normas mexicanas para aguas destinadas al abasto.
- ❖ Los conteos microbiológicos más altos se dieron en los meses de octubre de 2010 y en abril de 2011.
- ❖ *E. coli* fue el microorganismo que predominó en los organismos aislados.
- ❖ Con base en los genes de virulencia, el grupo que se presentó en mayor porcentaje fue EHEC.
- ❖ En el mes de noviembre se reportó mayor frecuencia y diversidad de genes.
- ❖ El gen de virulencia Stx2 para el 2010 se encontró en todos los puntos de muestreo, con excepción de TII.
- ❖ Para el 2011 sólo se encontró el gen de virulencia Stx2, con mayor frecuencia en el mes de julio.

~ 44 ~



- ❖ La estación de Tizates tuvo la mayor presencia de cepas con genes de virulencia.
- ❖ En cuanto a los cauces, Amanalco presentó la mayor frecuencia de aparición de genes, con el riesgo que esto representa.



10.- Bibliografía

1. Administración de Drogas y Alimentos (FDA). 2002. Riesgos de enfermedades transmitidas por el agua en zonas rurales. <http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/capitulo13.html>.
2. Aguilar, M. J., Mazari, H, M. 2003. *Escherichia coli* virulence factor in water from the Xochimilco, México city. International water association. 4th. International Symposium on Wastewater Reclamation and Reuse. México, D. F.
3. Aguilar, I. A. 2010. Calidad del agua: un enfoque interdisciplinario, México: UNAM, Instituto de Investigaciones Económicas. pp 11-13.
4. Álvarez A. J; et al. 2008. Índice de calidad del agua en la cuenca del río Amajac, Hidalgo, México. Información Tecnológica. 19(6): 21-32.
5. APHA-AWWA-WEF, 1985. Standard Methods for examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington D.C.
6. APHA- AWWA-WPCF, 2000. Métodos normalizados para el análisis de agua potable y residual. Edición 17. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España. pp 1147.
7. Banatvala N., Griffin P.M., Greene K.D., Barret T.J., Bibb W.F., Green J.H., Wells J.G. 2001. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical and epidemiologic findings. J Infect Dis ;183:10631070.
8. Barrera E. G; et al. 2013. La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. Hidrobiológicas. 23(1): 87-96.



9. Brow, R. L. 2003. *Salvar el planeta*, Barcelona, Paidós.
10. Cortéz-Ortiz, I.A., Rodríguez-Angeles, G., Moreno-Escobar, E.A., Tenorio Lara, J.M., Torres-Masadiego, B.P., Montiel-Vázquez, E. 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud Pública de México*. 44(4): 297-302.
11. Cravioto, A., Eslava, C. 2003. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* patógenos comunes en el lago de Xochimilco. *Latinoamericanas en Ciencias*. 23:3 UNAM, México.
12. Chávez-Bravo, E., Martínez-Gómez, L. E., Cedillo-Ramírez, M. L., Gil Juárez, C., Avelino-Flores, F. Castañeda-Roldán, E. I. 2007. Identificación de cepas enterotoxigénicas en diferentes ambientes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 27(3): 70-74.
13. Chávez-Alcántar, A., Velázquez-Machuca, M., Pimentel-Equihua, J. L. Venegas-González, J., Montañez-Soto, J. L., Vázquez-Gálvez, G. 2011. Hidroquímica de las aguas superficiales de la ciénega de Chapala e índice de calidad de agua. *Tierra Latinoamericana*. 29(1): 83-94.
14. Díaz-Vargas, M., Elizalde-Arriaga, E. E., Quiroz-Castelán, H. García-Rodríguez, J., Molina-Estudillo, I. 2005. Caracterización de algunos parámetros físicoquímicos del agua y sedimentos del Lago Zempoala, Morelos, México. *Acta Universitaria*. 15(2): 57-65.
15. Eslava, C., Mateo, J., Cravioto, A. 1994. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Secretaría de Salud México.



16. Ewing W. H. 1985. Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th. Edition, Elsevier.
17. Koneman E. W; et al. 1999. *Enterobacteriaceae* en Diagnóstico microbiológico. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana S. A. pp. 171-200.
18. Kupersztoch Y. M; et al. 1990. Secretion of metanol insoluble heat-stable enterotoxin (STb): energy and dependet conversión of pre STb to intermediate from the extracellular toxin. J. Bacteriol 172:2427-2432.
19. León, V. L. F. 2006. Índices de calidad de agua (ICA), formas de estimarlos y aplicación de la cuenca Lerma-Chapala. México. *Ciencia UANL*, 9, 426-430.
20. Mac Faddin, D. F. 1991. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Panamericana. México. D. F. . 45-197.
21. Mandell, A. et al. 1999. Tratado de medicina interna. Tomol. Edit. Mac Graw-Hill Interamericana. 20 edición. 102:778-791.
22. Manual de Microbiología del agua. 3^a ed. 1985. México: Subsecretaría de infraestructura hidráulica. Dir. Gral. De desarrollo tecnológico. Subdir. De Pág. 285.
23. Margall, N. et al. 1997. *Escherichia coli* enterohemorrágica. Rev. Esp. Salud Pública. 71(5):437-443.
24. Mendez, A. S. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Mirobiol. Clin.* 22(3):183-192.



25. Molina, L. J., Cravioto, A. 2003. Enterobacterias patógenas, *Escherichia coli* en microbiología y parasitología Médicas. Mendez Editores. 3^{era} México. Pp. 92-98.
26. Montiel, R. C. 2005. Evaluación de la calidad bacteriológica del agua de los canales de Xochimilco y caracterización serológica de *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura FES Iztacala. UNAM. Pp. 47
27. Nataro, J. P. Koper, J. B. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 11(1): 142-201.
28. NOM-001-SEMARNAT-1996. Límites máximos permisibles de contaminantes de las descargas de aguas residuales en agua y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
29. NOM-112-SSA1-1994. Determinación de bacterias coliformes técnica del número más probable. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
30. O'Brien, A. D., Holmes, R. K. 1987. Shiga and Shiga-like toxin. Microbiol Revs; 51:206-220.
31. Ocacio, N., López, M. 2004. El Uso del Cloro en la Desinfección del Agua. [http:// www.edustatipr.com/proyectos/inv97-98-11-3.pdf](http://www.edustatipr.com/proyectos/inv97-98-11-3.pdf).
32. Olvera-Viascán, V., Bravo-Inclán, L., Sánchez-Chávez, J. 1998. Aquatic ecology and management assessment in Valle de Bravo reservoir and watershed. *Aquatic Ecosys. Health. Manage.*, 1, 277-290.



33. Pan, T. M. et al. 2002. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR with primers specific to the *hlyA*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *fliC* and *rfb* genes. J Formos Med Assoc. 101:661-664.
34. Prescott, L. M., Harley, P. J., Klein, D. A. 1999. Microbiología. Cuarta edición. Editorial Mc Graw-Hill. Interamericana de España. Pág. 957.
35. Prescott, L. M. Harley, P. J., Klein, D. A. 2002. Microbiología. Quinta edición. Editorial Mc Graw-Hill. Interamericana de España. Pág. 1239.
36. Ramírez, C. S. Y. 2007. Aislamiento e identificación de cepas patógenas de *Escherichia coli* en muestras de agua del lago de Xochimilco. Tesis de Licenciatura. UAM Xochimilco. Pág. 58.
37. Ramírez, G. P., Martínez, E., Martínez, D. M., Eslava, C. 2004. Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana. Microbiología ambiental (INE-Semarnat).
38. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, M. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Johnson, L. M. Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 308:681-5.
39. Robles S. E. et al. 2013. Calidad bacteriológica y fisicoquímica del agua del acuífero Tepalcingo-Axochiapan, Morelos, México. Av. Cien. Ing.: 4(1), 19-28.
40. Rodríguez A. G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública. 44: 464-475.
41. Roldán, G., 1992. Fundamentos de Limnología Neotropical. Colercción de Ciencia y Tecnología Universidad de Antioquina. Medellín. 1:128.



42. Romeu, A. B., 2012. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Habana. Tesis de Doctorado. Universidad de la Habana. Pp. 159
43. Rompré A. et al. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. Journal of microbiological methods. 49:31-54.
44. Salazar E. P. 2009. Aislamiento, identificación y resistencia a antibioticos de *Escherichia coli* en una planta de tratamiento y su descarga al lago de Xochimilco. Tesis de Licenciatura FES Iztacala. UNAM. Pp. 74
45. Sánchez, J. T., Zavala, J. T. 2003. Fundamento de Microbiología Médica. Cuarte edición Méndez Editores. S.A. de C.V. Pág. 238-246.
46. Savarino, S. J., Fasano, A., Robertson, D. C., Levine, M. M. 1991. Enteraggregative *escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in vitointestinal model. J Clin Invest. 87:1450-1455.
47. Seoanez, C. M. 1999. Ingeniería Medioambiental Agua Residuales Urbanas. 2da, Mundi-prensa. México, DF. Pp 11-139.
48. Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier., Rivas, M., Iwanaga, M. 2003. Muiltiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*. Jornal of clinical microbiology. Pág 2669-2671.
49. World-Health-Organization. (WHO). 2009. Enfermedades Diarreicas.



Anexo I

Bioquímicas IMVIC

- ❖ Indol (I). Consiste en cultivar la especie en estudio en un caldo rico en triptófano; después de 24-48 horas de crecimiento se determina la presencia de indol con reactivos específicos como P-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Kovack), en el que adquiere un color rojo en presencia de indol. En la práctica se emplean medios combinados tales como sulfuro-indol-movilidad (SIM), movilidad-indol-ornitina (MIO) o indol-nitrato.
- ❖ Rojo de Metilo (M). El rojo de metilo es un indicador de pH. Actúa entre variando desde rojo (pH 4.2) a amarillo (pH 6.3). Por lo tanto, permite determinar la formación de ácidos que se producen durante la fermentación de un carbohidrato. El rojo de metilo se prepara con .1g de este reactivo en 300 mL de alcohol etílico y se diluye en 500 mL de agua.
- ❖ Voges-Proskauer (VI). Permite determinar la formación de acetil metil carbinol, un producto intermediario de la fermentación, que conduce a la formación de 2,3 butanodiol y que se caracteriza a ciertas especies de las Enterobacteriaceae. El medio más utilizado es el Metilo-Voges-Proskauer.
- ❖ Citrato de Simmons (C). Determina si el organismo bacteriano en cuestión desarrolla o no en un medio mineral que contiene citrato como única fuente de carbono.



PRUEBAS BIOQUIMICAS													
Cepa	Mes	Sitio				TSI					Lactosa	Manitol	Maltosa
			M	I	O	Acido	Gas	C	V.P	R.M			
	2010												
1	Sep.	CA	+	+	+	A/A	++	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
29	Sep.	TIII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
30	Sep.	AI	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
31	Sep.	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
2A	Oct.	AI	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
2B	Oct.	AI	+	+	+	A/A	+++	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
3	Oct.	All	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
5	Oct.	AI	-	+	-	A/A	++	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
6A	Oct.	All	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
7	Oct.	All	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
8	Oct.	CT	+	+	+	A/A	++++	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
9	Oct.	TI	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
10	Oct.	TIII	-	+	-	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
11	Oct.	TIII	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
12	Oct.	TII	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
13	Oct.	TII	-	+	+	A/A	++	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
32	Oct.	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
33	Oct.	TI	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
14	Nov.	CA	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
15	Nov.	CA	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
18	Nov.	CT	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
19	Nov.	TI	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
20	Nov.	TII	-	+	-	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
21	Nov.	TIII	+	+	-	A/A	++	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
23	Nov.	TII	-	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
24	Nov.	TIII	-	+	+	A/A	++	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
34	Nov.	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
35	Nov.	All	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
36	Nov.	All	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
37	Nov.	All	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
38	Nov.	All	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
	2011												
40	Abril	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
42	Abril	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
39	Mayo	CA	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
48	Mayo	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+



49	Mayo	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
50	Mayo	CA	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
51	Mayo	TII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
52	Mayo	TII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
55	Junio	CA	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
56	Junio	CA	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	-
57	Junio	AI	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
58	Junio	AI	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
59	Junio	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
60	Junio	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
61	Junio	TIII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
62	Junio	TIII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
63	Julio	CT	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
65	Julio	TII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
66	Julio	TII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
67	Julio	TIII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
68	Julio	TIII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
69A	Julio	AIII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
69B	Julio	AIII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+
70	Julio	AIII	+	+	+	A/A	+	-	-	+	A/A+	A/A+	A/A+



Anexo II

Medios

Caldo Lactosado

Componentes:

Extracto de Carne	3g
Peptona de Gelatina	5g
Lactosa	5g
Agua Destilada	1000 mL

Preparación: Disolver 13 gramos del polvo en 1000 mililitros de agua destilada y distribuir en tubos de 16x150mm con campana Durham, Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Caldo EC

Componentes:

Triptosona	20g
Lactosa	5g
Mezcla de sales biliares	1.5g
Fosfato bibásico de potasio K ₂ HPO ₄	4g
Fosfato monobásico de potasio KH ₂ PO ₄	5g
Cloruro de Sódio	1.5g
Agua Destilada	1000 mL

Preparación: Disolver 37g en 1000 mililitros de agua destilada y distribuir en tubos de 16x150mm con campana Durham, Esterilizar a 121°C durante 15 min.



Agar MacConkey-Sorbitol

Componentes:

Peptona	15.5g
Peptona de proteasa	3g
d-Sorbitol	10g
Sales biliares	1.5g
Cloruro de Sódio	5g
Agar	15g
Rojo Neutro	0.03g
Violeta de cristal	0.001g
Agua Destilada	1000 mL

Preparación: Suspenda 50g del polvo en 1000 mililitros de agua destilada caliente, agitando frecuentemente y hiérvala durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar y vaciar en placas estériles.

Agar MacConkey

Componentes:

Peptona	17g
Peptona de proteasa	3g
Lactosa	10g
Sales biliares	1.5g
Cloruro de Sódio	5g
Agar	13.5g
Rojo Neutro	0.03g
Violeta de cristal	0.001g
Agua Destilada	1000 mL

Preparación: Suspenda 50g del polvo en 1000 mililitros de agua destilada caliente, agitando frecuentemente y hiérvala durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, dejar enfriar y vaciar en placas estériles.



Gelosa especial.

Componentes:

Base de gelosa sangre	20g
Agar bacteriológico	15g
Extracto de carne	1.5g
Agua Destilada	1000 mL

Preparación: Suspender la mezcla en el agua y calentar hasta disolver el medio, ajustar el pH a 7.4 Vaciar 2.5 mL en viales o tubos estériles e inclinar.

Medio MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)

Componentes:

Extracto de levadura	3g
Peptona de gelatina	10g
Peptona de caseína	10g
L-ornitina	10g
Dextrosa	1g
Púrpura de bromocresol	.02g
Agar	2g
Agua Destilada	1000 mL

Preparación: Disolver 31g del medio en un litro de agua destilada, obteniendo un pH final de 6.4, se calienta hasta disolverse completamente, distribuir de 3 a 4 mL en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, enfriarlos y dejarlos en reposo en posición vertical hasta solidificar.



Agar de Hierro y Triple azúcar (TSI)

Componentes:

Peptona de caseína	10g
Peptona de carne	10g
Cloruro de Sodio	5g
Lactosa	10g
Sacarosa	10g
Dextrosa	1g
Sulfato de Hierro y Amonio	.2g
Tiosulfato de Sodio	.2g
Rojo Fenol	.025g
Agar	13g
Agua Destilada	1000 mL

Preparación: Suspender 59.4g del polvo en un litro de agua destilada, mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar a 118°C durante 15 minutos, enfriar en posición inclinada.

Agar Citrato de Simmons

Componentes:

Fosfato hidrogenado de Amonio	10g
Fosfato Dipotásico	1g
Cloruro de Sodio	5g
Citrato de Sodio	2g
Sulfato de Magnesio	0.2g
Agar	15g
Azul de Bromotimol	.08g
Agua Destilada	1000 mL

Preparación: Suspender 24.4g del polvo en un litro de agua destilada, mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta que se disuelva, distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.



Anexo III

PCR: Esta técnica utiliza una enzima denominada ADN polimerasa que copia cadenas de ADN en un proceso que simula la forma en la que el ADN se replica de modo natural en la célula. Este proceso, que ha revolucionado todos los campos de la biología, permite a los científicos obtener gran número de copias a partir de un segmento determinado de ADN.

Fundamento: La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, utilizando para ellos las propiedades de la Taq Polimerasa, siempre que se conozca una parte de la secuencia de nucleótidos.

Desnaturalización: Para que comience la reacción es necesario que el ADN se encuentre en cadena sencilla lo cual se consigue aplicando temperatura de 90° a 95° C que produce la ruptura de los puentes de hidrógeno y por tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de todas las muestras la temperatura debe mantenerse por unos minutos, si el ADN se desnaturaliza parcialmente este se renaturalizará rápidamente evitando así una eficiente hibridación de los primers y una posterior extensión. En este ciclo las cadenas de ADN se separan para formar cadenas sencillas, un cebador se une a la cadena de ADN y otro a la complementaria, la síntesis se lleva a cabo en la región de interés y con distancias variables en la región flanqueante produciendo fragmentos de long variable.

Hibridación: Una vez que el ADN esta desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre 40° y 60° C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flaqueantes del fragmento que se desea amplificar. Cuando comienza este segundo ciclo



hay dos tipos de patrón 1) las cadenas de ADN original 2) las cadenas de ADN recién sintetizadas que constan de una región de interés y de fragmentos de long variable da la región flanqueante en el extremo 3'. Cuando se una este último patrón en este ciclo sólo se copia la región de interés.

Extensión: La Taq Polimerasa sintetiza una cadena complementaria. La enzima lee la secuencia de la cadena opuesta y extiende los cebadores agregando nucleótidos en el orden en que pueden emparejarse. En este tercer ciclo la región de interés recién sintetizada (sin regiones flanqueantes) actúa como patrón. La molécula de ADN original esta todavía presente y lo estará hasta el final, sin embargo después de unos pocos ciclos el fragmento de ADN recién sintetizado se establece como patrón predominante.

