



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**DETECCIÓN DE *Cryptosporidium parvum* Y *Giardia lamblia* EN DOS
ECOSISTEMAS ACUÁTICOS CONTRASTANTES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARCO ANTONIO TAPIA PALACIOS

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARISA MAZARI HIRIART
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dr. JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ
Dra. ROSAURA MAYÉN ESTRADA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**TUTOR INVITADO: M. en C. MIRZA ROMERO VALDOVINOS
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ**

Ciudad de México, mayo, 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS

**DETECCIÓN DE *Cryptosporidium parvum* Y *Giardia lamblia* EN DOS
ECOSISTEMAS ACUÁTICOS CONTRASTANTES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARCO ANTONIO TAPIA PALACIOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARISA MAZARI HIRIART
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ
Dra. ROSAURA MAYÉN ESTRADA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

TUTOR INVITADO: M. en C. MIRZA ROMERO VALDOVINOS
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

Ciudad de México, mayo, 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 29 de febrero de 2016, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, del alumno **TAPIA PALACIOS MARCO ANTONIO** con número de cuenta **300019476** con la tesis titulada "**Detección de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en dos ecosistemas acuáticos contrastantes**", bajo la dirección de la **DRA. MARISA MAZARI HIRIART**:

Presidente:	DR. JAVIER CARMONA JIMÉNEZ
Vocal:	DR. ALFONSO LUGO VÁZQUEZ
Secretario:	DR. JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO
Suplente:	DRA. ALICIA CASTILLO ÁLVAREZ
Suplente	DRA. ROSAURA MAYÉN ESTRADA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de mayo de 2016



M del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de la beca recibida para la realización de este trabajo, de 2013-1 a 2014-2.

A los proyectos:

Manejo del agua en la cuenca del río Cuixmala: bases ecológicas y sociales para un manejo integrado de cuencas. DGAPA PAPIIT-IN222703. Enero 2004-Diciembre 2006. Por el apoyo en la compra de material.

Análisis de la Vulnerabilidad del Socio-Ecosistema de Bosque Tropical Seco al Cambio Global en la Región de Chamela, Jalisco. Proyecto CONACYT No. 83441. Colaboración con Instituto de Biología-Instituto de Ecología-Centro de Investigaciones en Ecosistemas-Unidad Colima-Estación de Biología Chamela, IBUNAM. Junio 2009-Diciembre 2012. Por el apoyo en la compra de material.

Patógenos zoonóticos como indicadores de salud ambiental en un gradiente altitudinal y perturbación de una zona tropical en Jalisco, México. PAPIIT IN215910. DGAPA-PAPIIT, UNAM. 2010-2011. Por el apoyo con material y viáticos en las salidas de campo.

Indicadores de salud ambiental en la cuenca del río Cuitzmala, Jalisco. DGAPA-PAPIIT IG200213. 2013-2014. Por el apoyo con material y viáticos en las salidas de campo.

Respuesta del socio-ecosistema del bosque tropical seco de la región de Chamela al Huracán Jova: un evento catastrófico infrecuente”. CONACYT 174094. 2013-2016. Por el apoyo con los viáticos en las salidas de campo.

A mi tutora, Marisa Mazari Hiriart por todo el apoyo, compromiso y paciencia para la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutor:

José Pablo Maravilla Campillo, por los comentarios en cada tutorial, las revisiones de la tesis y por el apoyo durante mi estancia en el Hospital General Manuel Gea González.

Rosaura Mayén Estrada, por los comentarios en cada tutorial y las revisiones y correcciones de esta tesis.

Al tutor invitado Mirza Romero Valdovinos por sus enseñanzas y asesoría durante mi estancia en el hospital.

A los miembros del jurado: Alfonso Lugo Vázquez, Alicia Castillo Álvarez y Javier Carmona Jiménez, por sus comentarios y correcciones de esta tesis.

Agradecimientos especiales a:

Al Laboratorio Nacional de Ciencia de la Sostenibilidad, por convertirse en mí segunda casa.

Hospital General Dr. Manuel Gea González, por brindarme el espacio y las instalaciones para aprender las técnicas utilizadas en esta tesis.

La estación de biología Chamela-IBUNAM, por acogerme en sus instalaciones en las salidas de campo.

Mi tutora Marisa Mazari, por su asesoría, revisión, aceptación y apoyo para la realización de este trabajo y su confianza para la integración a proyectos y clases en el laboratorio.

Dr. Pablo Maravilla, por su apoyo y asesoría durante la estancia en el Hospital Gea, y por su revisión durante los tutorales y al escribir esta tesis.

Dra. Rosaura Mayen, por su asesoría y revisión en los tutorales y por la revisión de este trabajo.

M. en C. Mirza Romero, por su enseñanza durante mi estancia en el Hospital Gea.

Dr. Javier Carmona, por los comentarios y la revisión de esta tesis.

Dra. Alicia Castillo, por los comentarios y la revisión de esta tesis.

Dr. Alfonso Lugo, por los comentarios y la revisión de esta tesis.

Dra. Ángela Caro por el apoyo en los muestreo y el apoyo en las tardes noches de análisis.

Dra. Ana Cecilia Espinosa, por su guía, consejos y revisiones para la realización de este trabajo, y principalmente por su amistad.

M. en C. Gustavo Pérez, por sus críticas constructivas, asesoría en los análisis estadísticos, apoyo en campo, enseñanza y amistad.

Abel Verduzco, por su valioso apoyo en el campo y recordarme siempre que la humildad es una virtud de los grandes.

M. en C. Miguel Rivas, por su apoyo en las salidas de campo y las miles de risas.

La licenciada en Ciencias de la Comunicación Vanessa Cravioto Fierro, por su apoyo con la caracterización socio-económica, y por su sinceridad.

P. de Biol. Eduardo Rodríguez, por su apoyo en las salidas a Chamela.

Mi amada casi-esposa. Tú me has enseñado tanto que no tengo palabras para agradecerte y demostrarte todo lo que soy gracias a ti. Te amo.

Mi madre Maria Palacios, porque a ti te debo toda mi vida.

Mi padre Marco A. Tapia, por todas tus enseñanzas, amor y voto de confianza para superarme todos los días.

Mis hermanos Alberto, Arturo, Panque y Raciél, porque siempre confían en mí y por ser mis compañeros de vida y de travesuras.

Mi familia del LANCIS, Alejandra, Stephanie, Chucho, Omar, Rosa, Erick, Jannice, Elisa, Ramón, Nallely, Miguel, Jaqueline, Paco-Toño, Paty, Shiara, Selene y Tere, por todos los momentos divertidos, las salidas, el trabajo, las fiestas y las horas de plática que hemos compartido.

Mis amigos de la vida Cisteil, Chela, Magui, Brenda, Zenyese, Claudia, Tania, Miguel Atl, Luis y Flor, por su amistad, cariño y sinceridad.

Detrás de lo que creemos conocer de sobra se esconde una cantidad equivalente de desconocimiento. La comprensión no es más que un conjunto de equívocos

Haruki Murakami

INDICE

Resumen	xii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
1.1 Socio-ecosistemas y salud	1
1.2 Enfermedades infecciosas relacionadas con la alteración de los socio-ecosistemas.....	2
1.3 Carga de enfermedades diarreicas	4
1.4 Transmisión de protistas patógenos a través de agua	6
1.5 Epidemiología y características de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i> que facilitan su transmisión.....	6
1.6 <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en los socio-ecosistemas	8
1.7 Caracterización molecular de <i>Cryptosporidium</i> sp. y <i>Giardia lamblia</i>	9
1.8 Factores sociales y ambientales de la trasmisión y dispersión de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i> en los socio-ecosistemas	10
1.8.1 Variación climática	10
1.8.2 Cambio de uso de suelo.....	10
1.8.3 Factores socio-económicos	11
2. Justificación.....	12
3. Hipótesis.....	13
4. Objetivos	13
4.1 Objetivo general	13
4.2 Objetivos particulares	13
5. Zonas de estudio.....	14
5.1 Río Magdalena-Eslava, Ciudad de México	14
5.2 Río Cuitzmala, Jalisco	16

6.	Métodos.....	18
6.1	Métodos de campo.....	18
6.2	Análisis bacteriológico	20
6.3	Detección de protistas patógenos	20
6.3.1	Concentración de muestras de agua	20
6.3.2	Muestras control de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i>	21
6.3.3	Detección y cuantificación de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Giardia lamblia</i> por Inmunofluorescencia	21
6.4	Análisis molecular	23
6.4.1	Extracción de DNA	23
6.4.2	Detección de <i>Cryptosporidium parvum</i> por PCR	23
6.4.3	Detección de <i>Giardia lamblia</i> por PCR	24
6.5	Análisis de resultados	24
7.	Resultados	25
7.1	Parámetros fisicoquímicos.....	25
7.2	Parámetros microbiológicos	27
7.3	Protistas patógenos	32
7.4	Análisis de PCR.....	35
7.5	Análisis de correlación	36
8.	Discusión.....	38
	Evaluación de parámetros fisicoquímicos.....	38
	Evaluación de parámetros microbiológicos	39
	Evaluación de protistas patógenos	41
	Ensayos de PCR	44
	Relaciones entre turbidez, microorganismos indicadores y protistas patógenos	45

Contexto socio-ecológico de los socio-ecosistemas estudiados.....	46
9. Conclusiones	50
10. Perspectivas y recomendaciones	52
Bibliografía.....	53

Resumen

Para comprender las causas que originan la transmisión de enfermedades infecciosas es necesario un conocimiento del socio-ecosistema. Los “socio-ecosistemas” o “sistemas socio-ecológicos” (SEs) hacen referencia al ambiente conformado de un componente social (humanos) y un componente ecológico (biofísico). La contaminación del agua en los ecosistemas lóticos (ríos) es un tipo de modificación en los SEs que puede conducir a la aparición, resurgimiento o transmisión de enfermedades infecciosas intestinales, provocadas entre otras por *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*. Estos protistas patógenos son de los agentes infecciosos más prevalentes causantes de enfermedades diarreicas en el mundo. Ambas especies se transmiten por el consumo de agua contaminada, por descargas de aguas residuales, por el consumo de alimentos contaminados y por la alteración del suelo. Los factores socio-ambientales como son la variación climática, el cambio de uso de suelo y los aspectos económicos intervienen en la transmisión y dispersión de estos patógenos.

El objetivo de esta investigación fue la detección y cuantificación de (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia* en agua en dos SEs contrastantes, comparando las cargas de patógenos, así como los distintos factores sociales y ambientales asociados con su transmisión y dispersión. Para realizar esto, se colectaron muestras de agua en el río Magdalena, Ciudad de México y su afluente el río Eslava durante un ciclo anual en tres épocas distintas durante los años 2012-2013, y para el río Cuitzmala, Jalisco, en un ciclo anual en tres temporadas durante el año 2014. Se llevó a cabo la determinación de parámetros fisicoquímicos *in situ*. Se utilizó el método de filtración por membrana para la cuantificación de coliformes fecales y estreptococos fecales. Para la detección y cuantificación de *C. parvum* y *G. lamblia* se utilizó el método de inmunofluorescencia indirecta con tinción de anticuerpos monoclonales específicos para cada especie.

Se encontró que en la zona urbanizada tanto en el río Magdalena como en el río Eslava, existen cambios importantes en la conductividad eléctrica, los sólidos disueltos totales y turbidez, que superan los criterios ecológicos que permiten la sobrevivencia de especies acuáticas.

El río Cuitzmala presentó niveles de entre tres y cuatro unidades logarítmicas de bacterias coliformes fecales (CF) y estreptococos fecales (SF) por debajo de los observados en la zona urbana del río Magdalena-Eslava. Tanto la variación temporal como espacial fueron factores claves estadísticamente significativos, en la concentración de coliformes fecales y estreptococos fecales en ambos SEs.

En ambos SEs se detectó la presencia de ooquistes *C. parvum* y quistes *G. lamblia*. En el río Cuitzmala las concentraciones de (oo)quistes de ambas especies fue similar a la encontrada en la zona natural de los ríos Magdalena y Eslava, menos de una unidad logarítmica. La concentración de (oo)quistes se incrementó de manera significativa en aquellos sitios en el río Magdalena y Eslava que mostraron un mayor grado de urbanización. La evaluación temporal de la concentración de (oo)quistes solo fue significativa en el río Eslava, donde la falta de agua durante las épocas de estiaje disminuye el aporte de agua residual y, por lo tanto, no influyó en el incremento de la cantidad de (oo)quistes.

Se encontró que la turbidez fue un indicador de la presencia de microorganismos en el agua. Se observó una correlación entre la turbidez, y la concentración de CF, SF, *C. parvum* y *G. lamblia* en agua donde las concentraciones de microorganismos fueron elevadas, sin embargo, cuando la concentración de microorganismos fue menor no hubo correlación. Se observó una correlación significativa entre CF, SF, *C. parvum* y *G. lamblia* en los ríos Magdalena y Eslava, debido principalmente al aporte de agua residual en las zonas urbanas y al origen fecal de los microorganismos aportados principalmente por desechos humanos, por lo que la correlación de estos parámetros en SEs rurales, como el río Cuitzmala, donde los aportes no tienen un origen puntual, no se encontró correlación.

Se determinó que la densidad poblacional, la edad, el acceso a servicios de agua entubada y drenaje, son algunos de los factores sociales asociados con la diseminación y transmisión de *C. parvum* y *G. lamblia*, por lo que se concluye que es necesario hacer un planteamiento integral para la evaluación de la condición del agua en los SEs, que integre el monitoreo de patógenos y la determinación de los factores socio-ambientales, que influyen en su dispersión e incrementan el riesgo de infección.

Abstract

To understand the causes of transmission infectious diseases a knowledge of the socio-ecosystem is required. The "socio-ecosystems" or "socio-ecological systems" (SEs) refer to the ambient consisting of a social component (human) and an environmental component (biophysical). Water contamination in lotic systems (rivers) is a type of modification in the SEs which can lead to the appearance, resurgence and transmission of intestinal infectious diseases, caused by *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*. These protist pathogens are among the most prevalent infectious agents causing diarrheal illnesses worldwide. Both species are transmitted by consumption of contaminated water, wastewater discharges, consumption of contaminated food, and soil disturbance. The socio-environmental factors such as climatic variation, land-use change and economy are aspects involved in the transmission and spread of these pathogens.

The aim of this research was the detection and quantification of *C. parvum* and *G. lamblia* (oo)cysts in water, in two contrasting SEs, comparing the burden of pathogens as well as the various social and environmental factors associated with the transmission and dispersion. To do this, water samples were collected from Magdalena River, Mexico City and its tributary Eslava River during an annual period in three different seasons from 2012 to 2013, and the Cuitzmala River, Jalisco, during an annual period covering three seasons in 2014. Physicochemical parameters were measured *in situ*. The membrane filtration method was used for the quantification of fecal coliforms and fecal streptococci. For *C. parvum* and *G. lamblia* the indirect immunofluorescence detection was performed through the staining method with specific monoclonal antibodies for each species.

We found that in the urban area in both Magdalena and Eslava rivers, there were significant changes in electric conductivity, turbidity and total dissolved solids, which are above the ecological criteria for the survival of aquatic species.

Cuitzmala River presents three to four logarithms of FC and FS below those observed in urban areas in Magdalena and Eslava rivers. Both, the seasonal and spatial variation were key factors, statistically significant, in the concentration of FC and FS in that SEs.

The presence of *C. parvum* oocyst and *G. lamblia* cyst was detected in both SEs. Cuitzmala river concentrations of (oo)cysts from the two species were similar to the ones found in the natural area of the Magdalena and Eslava rivers, less than one logarithm. Oocysts and cyst

concentrations increased significantly in those sites in Magdalena and Eslava rivers that present a higher degree of urbanization. The temporal assessment of the concentration of (oo)cysts was only significant in the Eslava River, where the lack of water during dry season diminished the supply of wastewater and, therefore, the amount of (oo)cyst do not increase in that river.

Our data showed that turbidity can be considered as a good indicator of the presence of microorganisms in the water. We found a good correlation between turbidity and concentration of CF, SF, *C. parvum* and *G. lamblia* in water where concentrations of microorganisms are higher, however, when the microorganism's concentration decreased these relationships became weak. Significant correlation between CF, SF, *C. parvum* and *G. lamblia* at the Magdalena and Eslava river was observed, mainly due to contribution of wastewater in urban areas and the fecal origin of the microorganisms provided mainly by human waste, so the correlation of these parameters in rural SEs, as Cuitzmala river, where contributions that have no clear origin and become diffused.

It was determined that the population density, age, access to tap water and drainage, are some of the social factors associated with the spread and transmission of *C. parvum* and *G. lamblia*, so it is concluded, that it is necessary to have an integrated approach to assess the conditions of water in the SEs, which can integrate the monitoring of pathogens and the determination of socio-environmental factors influencing their dispersion and increase the risk of infection.

1. Introducción

1.1 Socio-ecosistemas y salud

Comprender las causas que originan la transmisión de enfermedades infecciosas es un reto que va más allá de conocer las relaciones huésped-parásito o los medios de transmisión. Es necesario un conocimiento del socio-ecosistema para entender las condiciones que lo rigen y así poder identificar estas causas.

El término “Socio-ecosistemas” o “Sistemas socio-ecológicos” (SEs) es un concepto que hace referencia al ambiente conformado de un componente social (humanos) y un componente ecológico (biofísico). La conceptualización de los SEs es una forma de concebir al ambiente sin las limitaciones de las distintas disciplinas científicas, por ejemplo: ecología, sociología, economía, derecho, geografía, entre otras, que permean en el lenguaje y la manera de explicar los diferentes fenómenos que suceden en el entorno (Ostrom, 2009).

Los SEs se componen de múltiples subsistemas, por ejemplo: en una pesquería existe la unidad del recurso (langosta, camarón, atún, por mencionar algunos), los usuarios (pescadores) y un sistema de gestión (organizaciones y reglas para la pesca), mismos que están relativamente separados pero interactúan para producir resultados que los retroalimenten, y cada uno de estos puede ser evaluado sin perder la visión conjunta del cómo funcionan de manera integral (Ostrom, 2009), es decir, no podemos conocer cada una de las partes sino lo entendemos como un todo.

Un SEs puede ser tanto urbano como rural; un socio-ecosistema urbano presenta un mayor grado de atributos artificiales a diferencia del rural; sin embargo, ambos están inmersos en diversas condiciones biofísicas y están sometidos a diferentes *impulsores de cambio* (Gallopín, 1994).

Los *impulsores de cambio* son cualquier factor natural o antropogénico que causa una modificación directa o indirecta en los SEs, por ejemplo: el cambio de uso de suelo, el crecimiento poblacional y la urbanización (MA, 2005), que de acuerdo con Harris (2004) inducen efectos que promueven la emergencia o re-emergencia y/o diseminación de enfermedades.

En la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio (*Millennium Ecosystem Assessment*) se argumenta que la salud y el bienestar humano dependen de los servicios ecosistémicos, que son todos aquellos beneficios que obtiene el ser humano, de manera directa o indirecta, del ecosistema, los cuales pueden ser categorizados como servicios de provisión, de regulación, culturales y de soporte (MA, 2005), y que por ende están inmersos y son dependientes del funcionamiento de los SEs. En este punto el concepto de SEs cobra más fuerza, porque se vuelve

indispensable evaluar los cambios en estos sistemas, desde múltiples enfoques, para comprender qué servicios ecosistémicos se están alterando o perdiendo bajo ciertos esquemas de manejo y aprovechamiento, incluyendo cómo esto afecta a la salud pública y animal.

La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*) retomó la importancia de la evaluación de SEs, desde una perspectiva de servicios ecosistémicos, y consideró, por ejemplo, que el 25% de la carga global de enfermedades es directamente atribuible a causas ambientales (Prüss-Üstün y Corvalan, 2006). De manera similar en un estudio del Banco Mundial (*World Bank*, 2008) se mencionó que un mayor acceso sustentable a los servicios de provisión proporcionados por los SEs, se correlaciona con una mejor salud e ingresos económicos.

En general, podemos decir que las interacciones de un SEs tienen lugar bajo dos modalidades principales: “acciones humanas” que inciden en los sistemas ecológicos, y “efectos ecológicos” generados en la naturaleza (espontáneamente o en respuesta a acciones humanas) que transgreden en el sistema social (Gallopín, 1994). Por lo tanto, la evaluación de cada componente, nos permite entender estas interacciones y evaluar las prioridades para la protección ambiental, siempre promoviendo la idea de que el manejo de los SEs juega un papel clave en la protección de la salud humana y ambiental.

1.2 Enfermedades infecciosas relacionadas con la alteración de los socio-ecosistemas

Las relaciones causales entre los cambios en los SEs y la salud humana son complejos, ya que a menudo son indirectos, están descontextualizadas en espacio y tiempo además son dependientes en gran medida de los potenciadores de cambio. En éste trabajo se analizó cual es el estado de alteración con base en los protistas patógenos *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer, 1912) y *Giardia lamblia* (Lamb, 1858), en dos SEs contrastantes: el río Magdalena, Ciudad de México, como sistema lótico peri-urbano y el río Cuitzmala, Jalisco, como sistema lótico rural. En ambos sistemas existen potenciadores de cambio, por ejemplo: la deforestación puede alterar los patrones de morbilidad así como los climas locales o regionales, afectando potencialmente con el tiempo la distribución de los vectores de enfermedades, que en menor o mayor grado influyen en las relaciones causales de diseminación de estos patógenos. Los procesos de perturbación de los SEs pueden conducir a la aparición o resurgimiento de enfermedades, mientras que los factores locales como pobreza, falta de prevención y tratamiento del agua, así como malas prácticas de higiene pueden causar una mayor susceptibilidad de adquirir una enfermedad (Corvalan *et al.*,

2005), y en los SEs estudiados pueden favorecer la dispersión y transmisión de enfermedades a nivel local.

Una de las principales alteraciones de los SEs que puede tener repercusiones en la diseminación de enfermedades es la dispersión de agentes infecciosos, por ejemplo, la contaminación de las fuentes de abastecimiento de agua (Corvalan *et al.*, 2005).

Entre las enfermedades de mayor relevancia para la salud pública que requieren de atención especial debido al cambio en los SEs (Tabla 1), pero que también tienen un potencial mayor de reducir el riesgo con intervenciones planificadas se encuentran la criptosporidiosis, enfermedad causada por *Cryptosporidium* spp., en sistemas rurales (sistemas agrícolas) y la giardiosis, causada por *Giardia lamblia* en sistemas de abastecimiento urbanos (Corvalan *et al.*, 2005). Ambas enfermedades producen diarrea, tienen alta incidencia en países en desarrollo y presentan una distribución mundial.

Tabla 1. Enfermedades infecciosas y los mecanismos relacionados con los cambios potenciales en los SEs (Modificado de Corvalan *et al.*, 2005).

Enfermedad	AVAD* miles	Mecanismo Emergente	Impulsor emergente	Distribución geográfica	Sensibilidad al cambio ecológico
Malaria	46,486	Invasión de nicho	Deforestación	Tropical (América, Asia y África)	++++
Dengue	616	Expansión del vector	Proyectos hídricos	Tropical	+++
Leishmaniosis	2,090	Transferencia del anfitrión	Deforestación	Tropical, Europa y Medio Oriente	++++
Enfermedad de Chagas	667	Alteración del hábitat	Desarrollo agrícola	América	++
Enfermedades diarreicas causadas por virus, bacterias y protozoos	62x10 ⁶	Alteración del hábitat	Deforestación e invasión de áreas para la conservación	Global	+++
		Contacto con animales	Variabilidad climática		
		Contaminación de agua y alimentos	Manejo inadecuado a nivel cuenca cuando existe ganado		
			Urbanización y crecimiento poblacional		

*Años de Vida Ajustados por Discapacidad. Clave: ++ = moderada; +++, alta; +++++, muy alta.

1.3 Carga de enfermedades diarreicas

Las enfermedades diarreicas son una de las cinco principales enfermedades causantes de muerte en el mundo. De acuerdo con Prüss-Üstün *et al.* (2004) y la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015) la carga de enfermedades diarreicas atribuibles a agua de calidad dudosa y malas prácticas de higiene y saneamiento causan anualmente de 1.7 a 2.2 millones de muertes en todo el mundo (4% de todas las muertes a nivel global), de las cuales 68% son en niños menores de 14 años, y más del 99% de estas muertes ocurren en países en desarrollo, siendo la sub-regiones

africanas, sureste de Asia y el Mediterráneo oriental las regiones con mayor incidencia (88%) de estas muertes.

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015) estima que anualmente existen más de 4,000 millones de casos de diarrea a nivel mundial y 62.5 millones de AVAD.

Las vías por las cuales un individuo, referido así porque la infección causada por las especies estudiadas en éste trabajo pueden infectar humanos y animales es decir, son zoonóticas se esquematizan en la Figura 1.

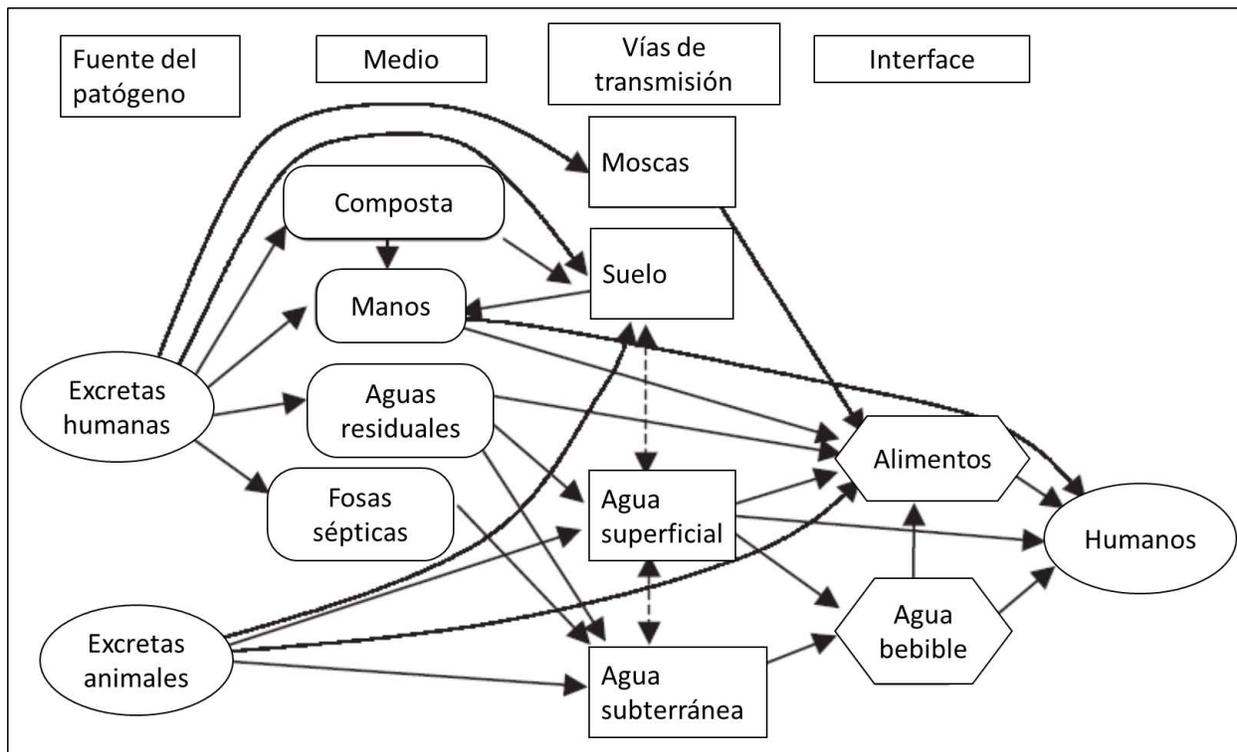


Figura 1. Vías de trasmisión de enfermedades diarreicas (modificado de Prüss-Üstün *et al.*, 2004).

Como podemos observar en la Figura 1, una de las principales vías de transmisión de patógenos al humano es el agua superficial, que incluye cuerpos de agua continentales, como son ríos y lagos, siendo ésta uno de los elementos integradores de los procesos en los SEs (MA, 2005), y por ende una de las matrices a evaluar en esta investigación.

1.4 Transmisión de protistas patógenos a través de agua

Los protistas patógenos *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* de acuerdo con Baldursson y Karanis (2011) son los parásitos infecciosos más prevalentes causantes de enfermedades diarreicas en el mundo. Ambas especies pueden transmitirse por el consumo de agua contaminada con heces de individuos infectados, a través de la ruta fecal-oral, por descargas de aguas residuales que alteran las fuentes de abastecimiento, por el consumo de alimentos contaminados, así como por la alteración del suelo con éstos microorganismos (Lanata, 2003). Otros autores (Rose y Slifco, 1999), señalaron que el 90% de los brotes causados por éstos parásitos ocurre a través del agua, mientras que el 10% está relacionado con los alimentos.

LeChevallier *et al.* (1991) reportaron para Estados Unidos y Canadá una prevalencia del 87% y 81% para *Cryptosporidium* y *Giardia* respectivamente en agua superficial, evidenciando su amplia distribución y persistencia en este medio.

1.5 Epidemiología y características de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* que facilitan su transmisión

El Género *Cryptosporidium* pertenece al Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoasida, Orden Eucoccidiorida, Familia Cryptosporidiidae. Existen 30 especies, de las cuales *C. parvum* y *C. hominis* se han reportado como la principal causa de brotes en humanos (Slapeta, 2013.).

El Género *Giardia* pertenece al Phylum Metamonada, Clase Trepomonadea, Orden Giardiida Familia Giardiidae. Dentro de este género existen seis especies de las cuales solo *G. lamblia* se reporta como la única especie que infecta humanos (Plutzer *et al.*, 2010).

Ambas especies tienen incidencia mundial, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo. *Giardia lamblia* (sinónimos *G. intestinalis* y *G. duodenalis*) produce 280 millones de casos de giardiosis al año en el mundo, que son aproximadamente el 35% de los brotes epidémicos que se han reportado en países desarrollados (Lane y Lloyd, 2002; Baldursson y Karanis, 2011); mientras que *Cryptosporidium* se reportó en el 60% de estos brotes, siendo el brote de Milwaukee, E.U. en el año 1993 el más importante con más de 400,000 casos (Mac Kenzie *et al.*, 1994), donde los niños menores de cinco años y las personas inmunocomprometidas fueron los grupos más vulnerables (Baldursson y Karanis, 2011).

Baldursson y Karanis (2011) recopilaron los datos epidemiológicos de los años 2000 a 2010 y calcularon la frecuencia de brotes transmitidos por agua causados por protistas parásitos en todo el mundo (Figura 2), en el cual *Cryptosporidium* spp. representó el 60% de los brotes (120) mientras que *G. lamblia* presentó el 35% (70 brotes). Debe considerarse que la infraestructura de cada país es distinta, por lo que la información puede estar sesgada hacia los continentes con países que destinan mayores recursos a la investigación epidemiológica, como es el caso de Estados Unidos en el Continente Americano, y no representar la verdadera magnitud del problema a nivel mundial.

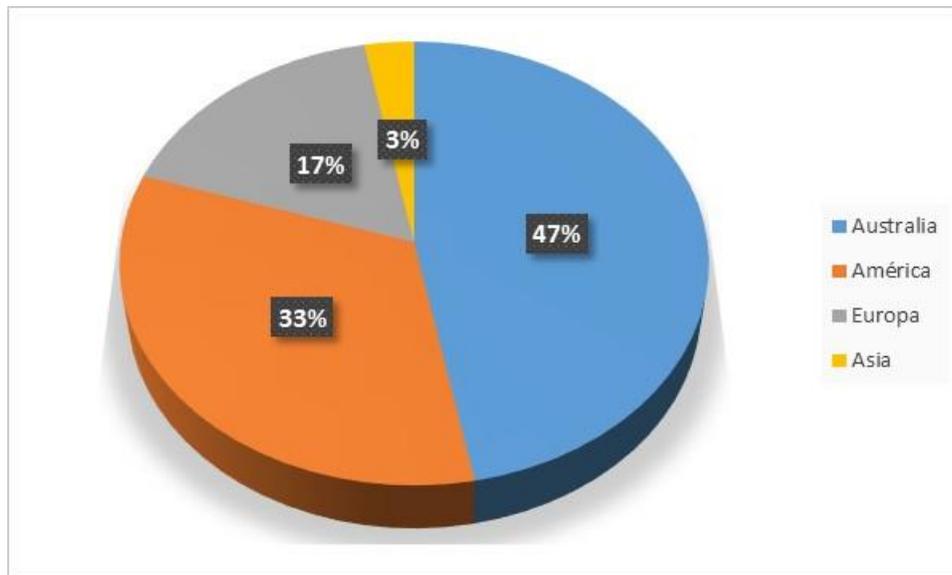


Figura 2. Distribución mundial de brotes transmitidos por agua atribuidos a protistas parásitos entre los años 2000-2010 (Baldursson y Karanis, 2011).

De acuerdo con Smith *et al.* (1995) el número de (oo)quistes (abreviación para quiste y ooquiste) que se requieren para inducir una infección en el 50% de los individuos (dosis infecciosa 50 = DI_{50}) es relativamente baja, siendo $DI_{50} = 9-1042$ ooquistes de *C. parvum* (Okhuysen *et al.*, 1999) y $DI_{50} = 25-100$ quistes de *G. lamblia* (Rendtorff, 1979).

La pared del ooquiste de *C. parvum* está formado por una bicapa de fosfolípidos (>60% fosfatidilcolina) y glucoproteínas ácidas; los ooquistes poseen enlaces ricos en disulfuro que le confieren una barrera protectora a los esporozoítos infecciosos (Mitschler *et al.*, 1994), son de forma esférica y poseen un tamaño de entre 4-6 μm . Los quistes de *G. lamblia* están formados

por una red de filamentos formados por proteínas GalNAc y un complejo proteico de galactosaminas (Jarrol *et al.*, 1989), son de forma ovalada y poseen un tamaño de entre 8-12 μm . Tanto el tamaño, forma y composición de los (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia* les confieren una gran resistencia a las condiciones ambientales desfavorables brindándoles un mayor tiempo de permanencia y sobrevivencia en los sistemas acuáticos, y por sus dimensiones pueden penetrar las barreras físicas de los sistemas de tratamiento; además estas características los hacen resistentes a diversos desinfectantes, como por ejemplo al cloro (Korich *et al.*, 1990).

Fayer *et al.* (1996) encontraron que a las temperaturas de las zonas cálidas los ooquistes de *C. parvum* permanecen infecciosos en el agua alrededor de 12 semanas. Smith *et al.* (2006) mencionan que los quistes de *G. lamblia* permanecen infecciosos hasta por dos meses suspendidos en el agua.

Ambas especies se han descrito como zoonóticas, es decir, que pueden transmitirse de animales a humanos y viceversa (Appelbee *et al.*, 2005), generando problemas de salud y en algunos casos pérdidas económicas a través de eventos de diarrea en animales domésticos productivos, o bien la muerte de éstos (Koudela y Vitovec, 1998; Fayer *et al.*, 2000).

Slifko *et al.* (2000) describieron tres razones por las cuales ambos protistas parásitos son los patógenos transmitidos por agua más comunes: la primera es que algunos animales domésticos y de abasto también son infectados con *Cryptosporidium* sp. y *G. lamblia*; la segunda es que la frecuencia de contaminación de los ecosistemas acuáticos con ambas especies es alta, alrededor del 97% (LeChevallier *et al.*, 1991) y por último, la resistencia de los (oo)quistes a condiciones ambientales desfavorables y a múltiples desinfectantes.

1.6 *Cryptosporidium* y *Giardia* en los socio-ecosistemas

Desde el año 1952 existe evidencia de la presencia de *G. lamblia* en agua (Rendtorff y Holt, 1954) y para *Cryptosporidium* sp. se ha documentado desde 1984 (D'Antonio *et al.*, 1985).

La presencia de *Cryptosporidium* spp. y *G. lamblia* en diferentes componentes de los SEs ha sido documentada a nivel mundial. Castro-Hermida *et al.* (2009) detectaron la presencia de ambas especies en agua superficial del río Tambre, Galicia, España, en zonas que incluían tanto sitios recreativos como sitios con influencia ganadera, así mismo evaluaron la incidencia de estos patógenos en las heces del ganado en granjas de la toda la cuenca. Xiao *et al.* (2013) detectaron la

presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y *G. lamblia* (86% y 65% de muestras positivas respectivamente) en 23 sitios de monitoreo y cinco sitios de efluentes de agua tratada en la Reserva de las Tres Gargantas, China.

En México, Tapia-Palacios (2012) registró la presencia de *C. parvum* y *G. lamblia* en el río Cuitzmala, Jalisco, una zona con poca influencia de actividades humanas, donde la principal fuente de contaminación estuvo asociada con las comunidades rurales y las zonas ganaderas.

Rangel *et al.* (2014) detectaron y cuantificaron por el método de inmunofluorescencia indirecta (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia* en agua residual, residual tratada para reúso en riego agrícola de las áreas verdes de Ciudad Universitaria, UNAM, Ciudad de México.

En otro trabajo Mazari-Hiriat *et al.* (2014) detectaron la presencia (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia* en el río Magdalena, un río periurbano que se encuentra en el límite de la ciudad de México.

1.7 Caracterización molecular de *Cryptosporidium* sp. y *Giardia lamblia*

El método utilizado comúnmente para la detección y cuantificación de *C. parvum* y *G. lamblia* en el ambiente es la microscopía utilizando técnicas de inmunofluorescencia (IF), como por ejemplo el método 1623 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2005). En el presente trabajo se utilizó la IF como método principal para la detección de *C. parvum* y *G. lamblia* en agua; sin embargo, y de acuerdo con Xiao *et al.* (2001) y Plutzer *et al.* (2008) los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), además de ser más sensibles, permitirían conocer la diversidad de especies, genotipos y ensambles de ambas especies, por lo que tratándose de parásitos zoonóticos ésta herramienta es un elemento importante no solo para establecer el posible origen de la contaminación (Bertrand y Schwartzbrod, 2007), sino también proporcionar información sobre la presencia de genotipos/ensambles patogénicos para humanos y animales. Ésta información respaldaría la selección y evaluación efectiva de las prácticas de manejo, para reducir la contaminación del agua con *C. parvum* y/o *G. lamblia* y, por lo tanto, disminuir el riesgo de exposición a estos patógenos.

1.8 Factores sociales y ambientales de la trasmisión y dispersión de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en los socio-ecosistemas

Una revisión de los factores sociales y ambientales que intervienen en la transmisión y dispersión de *C. parvum* y *G. lamblia* fue presentada por Lal (2014). A continuación se describen los factores más relevantes para ambas especies.

1.8.1 Variación climática

La variación climática es uno de los factores ambientales que más modifican las condiciones en los SEs de manera natural. Algunos elementos de este factor son: temporalidad considerando las épocas del año, patrones de lluvias y temperatura; cada uno de ellos puede tener repercusiones tanto en la dispersión como en la transmisión de *C. parvum* y *G. lamblia*. Por ejemplo, Tryland *et al.* (2011) encontraron que eventos de lluvias muy abundantes pueden incrementar la carga de *C. parvum* y *G. lamblia*; este incremento de la carga de patógenos puede saturar y modificar los sistemas de abastecimiento y dañar la infraestructura de las plantas de tratamiento, llevando hacia un brote epidémico. La influencia de las lluvias extremas puede tener consecuencias más directas, severas y duraderas en la porción de la población que es social, económica y/o geográficamente marginada, es decir, aquellos individuos que viven en los márgenes de las ciudades o en zonas de alto riesgo (Ahern *et al.*, 2005). Wilkes *et al.* (2009) encontraron que las cargas de (oo)quistes son dependientes de las épocas del año en que son evaluadas.

1.8.2 Cambio de uso de suelo

El uso de suelo para agricultura modifica el paisaje y la función de los ecosistemas acuáticos, teniendo como consecuencia que se incrementen las cargas y dispersión de patógenos (Wilkes *et al.*, 2009).

El grado de asociación y conectividad dentro de los SEs también juega un papel muy importante en la transmisión de enfermedades, por ejemplo, Bates *et al.* (2007) observaron en nueve comunidades en Ecuador que existió una asociación positiva de las enfermedades diarreicas con la densidad de casas, es decir la incidencia de enfermedades se relaciona con la densidad de la población.

En otro estudio, Snel *et al.* (2009) hallaron que la incidencia de criptosporidiosis se incrementa en zonas rurales y está correlacionada con la densidad animal en las granjas, mientras que la distribución de giardiosis es consistente con una predominancia humana en sistemas más urbanizados.

1.8.3 Factores socio-económicos

Criptosporidiosis y giardiosis son infecciones entéricas comunes en países con población de bajos ingresos (Guerrant *et al.*, 1990). Los hábitos de limpieza, la infraestructura y las características particulares de cada individuo como su edad, estado inmunológico y ocupación, así como la infraestructura urbana, son componentes socio-económicos que están involucrados en el incremento del riesgo de infecciones diarreicas como la giardiosis (Cifuentes *et al.*, 2000). De acuerdo con éstos autores el incremento de infecciones con *G. lamblia* es debido principalmente a los componentes mencionados, más aún que a las cargas de este patógeno en el agua para riego.

2. Justificación

Este trabajo se centra en el estudio de dos SEs contrastantes. El primero es el río Magdalena, considerado como un sistema urbano, ubicado en la Ciudad de México, y el río Cuitzmala, considerado como un sistema rural en la zona costera del estado de Jalisco. En ambos SEs existe una presión por parte de las actividades humanas sobre el recurso agua. Las actividades socio-económicas generadas en cada sistema puede incrementar el riesgo de infección con *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* (Mazari-Hiriart *et al.*, 2014; Tapia-Palacios, 2012), potenciado por distintos factores sociales y ambientales como son el cambio de uso de suelo, la urbanización y la variación climática.

El monitoreo de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en agua, como elemento integrador de los SEs nos puede brindar información sobre el grado de contaminación en los sistemas acuáticos, y proporcionar evidencia de la fuente potencial que origina su presencia como contaminantes en estos sistemas. Además pueden proveer una herramienta importante para la toma de decisiones en cuanto al manejo de los SEs y al cuidado de los servicios ecosistémicos que brindan, así como también para proponer acciones de control sobre las actividades humanas que en ellos se realizan o tienen influencia, a fin de controlar los efectos potenciales en la salud de los SEs.

Este trabajo es una oportunidad para poder contrastar e identificar algunos de los factores sociales y ambientales que afectan la calidad microbiológica del agua en dos SEs distintos, uno urbano y uno rural, con el fin de identificar sitios con condiciones potenciales de infección para el manejo de este tipo de sistemas; además identificar y en la medida de lo posible controlar el origen de la contaminación por patógenos y poder identificar elementos críticos que pueden evitar o disminuir la diseminación de enfermedades ocasionadas por la contaminación del agua con protistas patógenos.

3. Hipótesis

La asociación de las actividades humanas con los dos SEs es distinta (urbano vs rural), por lo tanto, las cargas y prevalencias de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*, así como los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en cada sistema serán diferentes.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Detectar y cuantificar los (oo)quistes de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en agua de dos SEs, el río Magdalena-Eslava, Ciudad de México, y el río Cuitzmala, Jalisco, comparando sus cargas parasitarias así como los distintos factores sociales y ambientales asociados con su transmisión y dispersión.

4.2 Objetivos particulares

- Detectar ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y quistes de *Giardia lamblia* en agua utilizando microscopía de inmunofluorescencia y anticuerpos monoclonales.
- Evaluar la concentración microorganismos indicadores coliformes fecales y enterococos fecales, así como su utilidad como indicadores de patógenos.
- Utilizar a los microorganismos indicadores, *C. parvum*, *G. lamblia* y parámetros fisicoquímicos, como herramienta para cuantificar los cambios en los SEs.
- Comparar los factores sociales y ambientales en cada uno de los SEs y su asociación con la transmisión de *C. parvum* y *G. lamblia*.
- Explorar el uso de la PCR en la detección de *C. parvum* y *G. lamblia* en muestras de agua.

5. Zonas de estudio

5.1 Río Magdalena-Eslava, Ciudad de México

El río Magdalena-Eslava es uno de los últimos ríos en relativamente buenas condiciones ambientales en la Ciudad de México, que aún no ha sido entubado. Debido a su contribución a las fuentes de abastecimiento de agua para la ciudad de México ($0.67 \text{ m}^3/\text{s}$) (Jujnovsky *et al.*, 2010; Mazari-Hiriart *et al.*, 2014) y el potencial de recuperar algunos de los servicios ambientales que proporciona éste SEs, hay un gran interés en la posibilidad de mejorar la calidad del agua en la zona baja de este sistema (Mazari-Hiriart *et al.*, 2014).

La cuenca del río Magdalena-Eslava se encuentra entre las coordenadas $19^\circ 18' 22.0'' \text{ N}$; $99^\circ 13' 50.2'' \text{ O}$ en su punto más alto y $19^\circ 21' 30.1'' \text{ N}$; $99^\circ 10' 12.6'' \text{ O}$ en su intersección con el río Churubusco. En este SEs existen dos regiones climáticas. La cuenca alta se encuentra entre los 3,640 y 2,800 msnm (Avila-Akenberg, 2002), tiene un clima semi-frío con lluvias en verano, y una temperatura promedio de entre 5 y 12°C (García, 1988). La cuenca baja se encuentra entre los 2,800 y 2,400 msnm, presenta un clima subhúmedo templado con lluvias en verano y una temperatura promedio entre 12 y 18°C .

El río Magdalena se encuentra ubicado en las delegaciones, Cuajimalpa, Álvaro Obregón y Magdalena Contreras, al suroeste de la Ciudad de México (Figura 3). Nace en el paraje conocido como Cieneguillas y es alimentado tanto por manantiales como afluentes, entre los que destacan el río Eslava, el Tepapatlapa y el Potrero. Tiene una longitud de 28.2 km de los cuales más de la mitad (14.8 km) se encuentran en un área natural bajo la denominación de Suelo de Conservación del Distrito Federal (SCDF), mientras que el resto (13.4 km) atraviesa un área urbana en la cual una parte del río está entubado, desembocando en la presa Anzaldo, hasta conectarse posteriormente con el río Churubusco. El río Eslava es su principal afluente con una extensión de 13.7 km de largo, de los cuales 10.96 km están dentro del SCDF y 2.74 km están dentro de una área urbana. Ambos ríos confluyen a 15 km dentro de la zona urbana (PUEC-UNAM, 2008).

El río Magdalena se encuentra ubicado en la Faja Volcánica Transmexicana. Su composición geológica consiste en afloramientos rocosos andesíticos y basálticos, cuya edad se registra en principios del Terciario, alcanzando el Terciario Superior (Ferrusquía-Villafranca, 1998).

Este SEs en la zona natural es un importante refugio de biodiversidad (Cantoral-Uriza *et al.*, 2009), presenta una cobertura vegetal predominantemente conservada y presta servicios

ecosistémicos a la ciudad de México, entre los que destacan los servicios de provisión y culturales (Jujnovsky, 2006). Es una región importante desde el punto de vista histórico, religioso y turístico, donde los fines de semana se llevan a cabo diversas actividades recreativas y funciona como un sistema agrosilvopastoril que sustenta la economía de diversas familias; además posee suelos con aptitud forestal. Sin embargo, la presión por parte de las actividades humanas amenazan su funcionamiento, de tal manera que en la zona urbana el río se trasforma en un drenaje con descargas de agua residual a éste, exponiendo a un peligro a la población humana y animal que entran en contacto con estas aguas (PUEC-UNAM, 2008; PUMA-UNAM, 2009, Mazari-Hiriart *et al.*, 2014).

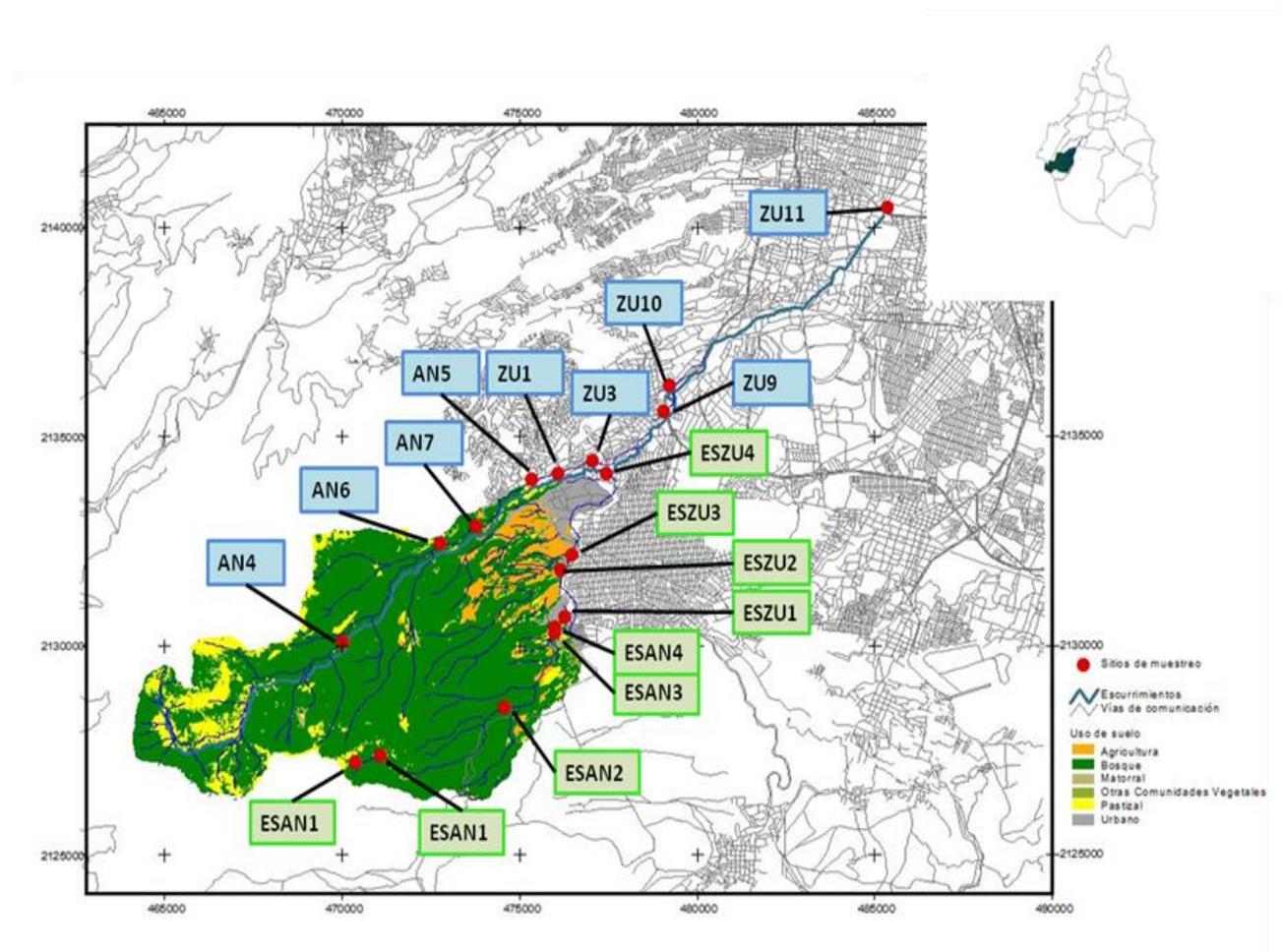


Figura 3. Ubicación de la cuenca y sitios de muestreo del río Magdalena y Eslava, Ciudad de México. Cartografía Digital: 1:50,000 (INEGI, 2008). Las abreviaturas se encuentran en la Tabla 2.

5.2 Río Cuitzmala, Jalisco

La cuenca del río Cuitzmala se localiza en la zona occidental del país en la vertiente del Océano Pacífico (Figura 4). Geográficamente se ubica al noroeste de la sierra Madre del Sur y las subprovincias de la sierra de la Costa de Jalisco y Colima, dentro de las coordenadas 19° 50' 27'' N; 104° 36' 34'' O en su punto más alto y 19° 21' 47'' N; 104° 59' 38'' O en la desembocadura al mar. Es una cuenca exorreica de aproximadamente 1,080 km² y su cauce principal es el río Cuitzmala de 85 km de extensión, el cual tiene su origen en el “Cerro Bramón” a 1,770 msnm y desemboca al mar. Políticamente la cuenca se localiza en los municipios de Villa Purificación y La Huerta con 62 y 32 localidades respectivamente (López-Tapia, 2008). El clima es tropical con una marcada estación de lluvias durante el verano siendo su temperatura media anual de 24.6°C (García-Oliva *et al.*, 2002)

La cuenca se encuentra dentro de la región biogeográfica Neotropical, correspondiente a las Selvas secas de Jalisco (Jalisco Dry Forest NT 0217) (WWF, 2000). Desde la perspectiva biológica es un área de una alta diversidad y debido a sus características biogeográficas es una zona con un gran número de endemismos (Ceballos y Miranda, 2000). En esta SEs se encuentran diferentes tipos de vegetación, desde selva tropical estacionalmente seca, bosque de pino-encino, bosque de encino, hasta vegetación de ribera y acuática en la zona de los humedales, los cuales son hábitat para aves migratorias de importancia mundial debido a su patrón de migración. Dentro de la cuenca se encuentra una porción de la “Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala”, un Área Natural Protegida (ANP) decretada en 1993 por decreto presidencial con 13,142 hectáreas (Ceballos *et al.*, 1999).

De acuerdo con Cotler *et al.* (2002) la cuenca se puede dividir en tres grandes zonas basado en la morfología regional y la altitud: 1) la zona de la costa (0 a 200 msnm), 2) la zona de lomeríos (200 a 1,000 msnm) y 3) la zona de sierra (1,000 a 2,400 msnm). Dentro de estas zonas las actividades económicas realizadas en la cuenca han generado cambios en el uso de suelo debido principalmente a la agricultura y ganadería, lo que reduce la superficie forestal y por tanto se modifica el ciclo hidrológico y se generan cambios en la calidad del agua, incrementando la incidencia de microorganismos patógenos (López-Tapia, 2008; Tapia-Palacios, 2012).

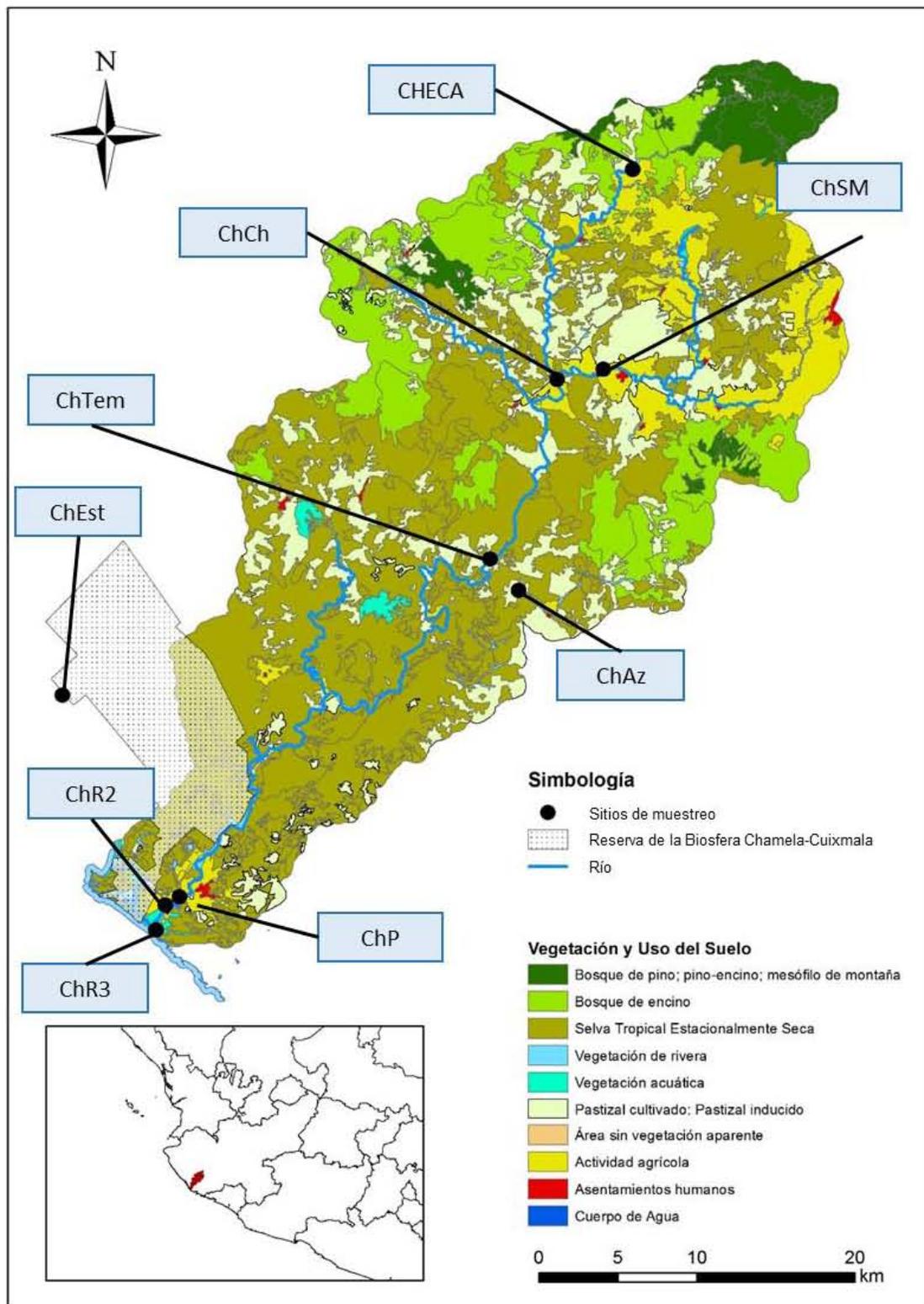


Figura 4. Ubicación de la cuenca y sitios de muestreo del río Cuitzamal, Jalisco. Cartografía Digital: 1:250,000 (INEGI, 2013). Las abreviaturas se encuentran en la Tabla 2.

6. Métodos

6.1 Métodos de campo

En el río Magdalena y su afluente el río Eslava se recolectaron muestras de agua superficial en un ciclo anual durante tres épocas distintas: lluvias (octubre de 2012 y 2013), fría-seca (febrero, 2013) y cálida-seca (abril, 2013). Para el río Cuitzmala las muestras se recolectaron en tres temporadas: fría-seca (enero 2014), cálida-seca (junio, 2014) y lluvias (septiembre, 2014) (ver Figuras 3 y 4 y Tabla 2).

Las muestras se recolectaron en botes de polipropileno de 10-20 L (Nalgene) esterilizados bajo condiciones estándar (autoclave 120°C/15-20 min) (APHA, 2005), o en algunos casos los botes se esterilizaron con cloro al 5% y se neutralizaron los residuos con tiosulfato de sodio (Tapia-Palacios, 2012), y en tubos de centrifuga estériles de 50 mL. Las muestras se mantuvieron en refrigeración de tres a cinco horas hasta su posterior procesamiento en el laboratorio (APHA, 2005). El número de muestras varió dependiendo de si hubo o no agua en las distintas temporadas, siendo el máximo cuatro muestras (una por cada temporada en cada sitio) para el río Magdalena y Eslava, y tres para el río Cuitzmala, sumando un total de 57 y 26 muestras respectivamente. El volumen de muestra varió entre 100 mL y 20 L usando como referencia un estudio previo de cuatro años de monitoreo de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos (Mazari-Hiriart *et al.*, 2014), y de un año de monitoreo de protistas patógenos (Tapia-Palacios, 2012). Los sitios de muestreo en el río Magdalena-Eslava y río Cuitzmala fueron seleccionados debido a la existencia de estudios previos que se han realizado en ambos SEs, y que brindan un mayor soporte de los datos presentados en esta tesis (PUEC-UNAM, 2008; PUMA-UNAM, 2009, Tapia-Palacios, 2012; Mazari-Hiriart *et al.*, 2014; Caro-Borrero *et al.*, 2015).

Utilizando una sonda multiparámetros YSI 6600-M (Yellow Spring, OH, EUA), en cada sitio se midieron parámetros fisicoquímicos como temperatura (°C), pH, conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y turbidez (UNT). Adicionalmente en cada sitio se colectó 1 L de agua por triplicado en frascos de polipropileno (Nalgene) estériles bajo condiciones estándar para el análisis bacteriológico de coliformes fecales (CF), estreptococos fecales (SF) y enterococos fecales (EF).

Tabla 2. Sitios de muestreo de los ríos Magdalena y Eslava, Ciudad de México y el río Cuitzmala, Jalisco.

Nombre del sitio	Clave	Vol. colectado (L)	No. de muestras	Coordenada UTM X	Coordenada UTM Y
Río Magdalena					
Cuarto dinamo	AN4	20	4	469065	2130102
Antes de planta potabilizadora	AN6	20	4	471399	2132466
Después de la planta potabilizadora	AN7	20	4	472265	2132875
Segunda planta potabilizadora	AN5	20	4	473584	2134007
Terminal de autobús/Benito Juárez	ZU1	2	3	474215	2134142
Río Magdalena antes de confluencia con el río Eslava	ZU3	0.3	2	475040	2134443
Confluencia de ríos Magdalena y Eslava	ZU5	0.3	2	475259	2134392
Hospital Ángeles	ZU9	0.3	4	476742	2135610
Presa Anzaldo	ZU10	0.3	4	476872	2136241
Viveros de Coyoacán	ZU11	0.3	4	482080	2140495
Río Eslava (afluente)					
Origen del río	ESANO	20	4	469362	2127247
Presa de gavión	ESAN1	20	2	469974	2127412
Truchero	ESAN2	20	4	472925	2128548
El Negro	ESAN3	20	2	474143	2130330
Caseta de vigilancia	ESAN4	20	2	474151	2130460
Inicio zona urbana	ESZU1	0.3	2	474382	2130729
Chichicaspa invernadero	ESZU2	0.3	2	474281	2131845
Chichicaspa casas	ESZU3	0.3	2	474564	2132191
Estación de policía	ESZU4	0.3	2	475378	2134129
Río Cuitzmala					
La Eca	ChECA	10	3	529149	2189125
San Miguel (afluente)	ChSM	10	3	527418	2176455
El Chino (confluencia Río Cuitzmala y San Miguel)	ChCh	10	3	524649	2175807
Tempisque	ChTem	10	3	520672	2164480
Agua Zarquita (afluente)	ChAZ	10	3	522389	2162506
Panteón de Francisco Villa	ChP	10	3	502056	2143105
Río 2 (bomba)	ChR2	10	3	501207	2142586
Río 3 (desembocadura)	ChR3	10	3	500653	2141007
Arroyo Zarco (cuenca 3, Estación de Investigación Biología Chamela)	ChEst	10	2	495065	2155824

6.2 Análisis bacteriológico

Para llevar a cabo el análisis bacteriológico se utilizó el método estándar de filtración a través de membrana y cultivo en medios selectivos para cada grupo bacteriano (APHA, 2005). Para su cuantificación se seleccionaron aquellas cajas que presentaron colonias visibles y de coloración correspondiente para cada grupo bacteriano: CF color azul oscuro (medio mFC, Difco, Sparks, MD, EUA), SF (medio KF Streptococcus, Difco, Sparks, MD, EUA) y EF (medio m Enterococcus, Difco, Sparks, MD, EUA) color rojo metálico. Los conteos se reportaron como Unidades Formadoras de Colonia por cada 100 mL (UFC/100 mL).

Con la finalidad de conocer el grado de contaminación fecal en los tres SEs se utilizó el sistema de clasificación de calidad del agua propuesto por Kavka *et al.* (2006).

6.3 Detección de protistas patógenos

6.3.1 Concentración de muestras de agua

Las muestras de 10-20 L fueron concentradas por el método de ultrafiltración (Hill *et al.*, 2005; Polaczyk *et al.*, 2008) adaptado por Tapia-Palacios (2012). Se utilizaron filtros de polisulfona F80A (Fresenius, Medical Care, Lexington, MA), con los cuales se montó un sistema de filtración de flujo tangencial. El cartucho fue bloqueado con 1g de NaPP/L por 30 minutos; con esto se evitó 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 (Polaczyk *et al.*, 2008). El volumen final de cada muestra concentrada fue aproximadamente 100 mL y separada en tubos de centrifuga de 50 mL.

Posteriormente las muestras fueron centrifugadas (las de 100 mL y las concentradas por ultrafiltración) a 3,000 rpm durante 15 minutos. El pellet obtenido se resuspendió con 5 mL de PBS estéril 1% y se separó en cinco tubos de 1.5 mL con aproximadamente 1 mL cada uno. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis (Tapia-Palacios, 2012).

6.3.2 Muestras control de *Cryptosporidium* y *Giardia*

Los controles positivos de *C. parvum* y *G. lamblia* fueron obtenidas de heces de pacientes del Hospital General Dr. Manuel Gea González, Ciudad de México, en septiembre y octubre de 2012. Las muestras fueron eluidas en 1 mL de PBS y guardadas a -20 °C hasta su manipulación.

6.3.3 Detección y cuantificación de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* por Inmunofluorescencia

Las muestras fueron cuantificadas por el método de inmunofluorescencia indirecta (IF) (Stibbs y Ongerth, 1986) en fase líquida (Rangel-Martínez, 2010 y 2014) adaptada por Tapia-Palacios (2012). El protocolo se describe a continuación:

1. Se descongela la muestra (1 mL) a temperatura ambiente.
2. Se prepara una muestra con 15 µL del control positivo de cada patógeno (*C. parvum* y *G. lamblia*) en tubos de 1.5 mL, resuspendidos en 500 µL de PBS estéril 1%.
3. Se centrifuga durante cinco minutos a 5,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
4. Se bloquea el concentrado con 500 µL de albumina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) (Amresco, Solon, Ohio, EUA) al 1% en PBS, se homogeniza y se incuba por 1.5 horas a temperatura ambiente.
5. Se centrifuga durante dos minutos a 5,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
6. Se agregan 500 µL del primer anticuerpo (mouse monoclonal IgG Anti-*Cryptosporidium parvum* 7631, mouse monoclonal IgG3 Anti-*Giardia lamblia* BDI27; Santa Cruz Biotechnology, Paso Robles, CA, EUA) 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 dos minutos a 5,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
8. Se agregan 500 µL de buffer de lavado 1x (Tween 80 al 0.05% con PBS), se homogeniza, y se centrifuga durante dos minutos a 5,000 rpm y se elimina el sobrenadante. A partir de este punto todos los siguientes pasos se hacen en obscuridad o lo más protegido de la luz que se pueda.

9. Se agregan 500 μL del segundo anticuerpo (anticuerpo conjugado con fluoresceína, AffiniPuse Rabbit Anti-mouse IgG, Jacobson Inmuno Research, West Grove, PA, EUA) en una concentración de 1:200 en PBS 1%, se homogeniza y se incuba a 37°C por 1.5 horas en obscuridad. Se centrifuga durante dos minutos a 5,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
10. Se agregan 500 μL de buffer de lavado, se homogeniza, y se centrifuga durante dos minutos a 5,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
11. Se agregan 500 μL de Ioduro de Propidio (Santa Cruz Biotecnology, Paso Robles, CA, EUA) en una concentración de 1:100 en PBS al 1%, se homogeniza e incuba a 37°C por 30 minutos.
12. Se centrifuga durante dos minutos a 5,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
13. Se realizan tres lavados con 500 μL de buffer de lavado, y uno con PBS, se homogeniza, y se centrifuga durante dos minutos a 5,000 rpm y se elimina el sobrenadante.
14. Las muestras se montan en su totalidad en portaobjetos, 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.

Los (oo)quistes fueron observados en un microscopio de fluorescencia Axiostar Plus (Carl Zeiss, Gottingen, Germany) a una longitud de onda de entre 494 a 520 nm. La identificación y cuantificación de los (oo)quistes se realizó con base en los criterios de inclusión de Smith y Rose (1990).

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

Las muestras fueron cuantificadas por triplicado para conocer la variación del método entre cada muestra.

6.4 Análisis molecular

6.4.1 Extracción de DNA

Para la ruptura de los (oo)quistes se utilizó un mililitro de cada muestra concentrada, la cual fue sometida a 3 ciclos de congelación-descongelación (-80°C x 30 min, +80°C x 30 min) y 15 min en agua hirviendo. Se extrajo el DNA total de un volumen de 400 µL de la muestra utilizando un kit de extracción para suelos (NucleoSpin Soil, Macherey-Nagel, Alemania), con una modificación al protocolo del fabricante: 1) incubación a 60°C por una hora con el buffer de lisis. El DNA extraído fue eluido con 50 µL con agua. Para verificar su pureza e integridad se midió 2 µL del extracto con un NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), considerando que la absorbancia de una unidad a 260 nm corresponde a 50µg/ml de DNA de doble cadena (Sambrook *et al.*, 1989)

6.4.2 Detección de *Cryptosporidium parvum* por PCR

Se utilizó un protocolo de PCR anidado para amplificar un fragmento de 435 pb del gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal o 18S rRNA (Nichols *et al.*, 2003). Los oligonucleótidos que se utilizaron para la primera amplificación fueron CPB-DIAGF 5'-AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG-3' y CPB-DIAGR 5'-TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG-3'; y para la segunda amplificación se utilizaron N-DIAGF2 5'-CAA TTG GAG GGC AAG TCT GGT GCC AGC-3' y N-DIAGR2 5'-CCT TCC TAT GTC TGG ACC TGG TGA GT-3'. Cada reacción consistió en 20 µL que contenía 200 nMol de cada oligonucleótidos, 200 µM dNTP, 3 mM de MgCl₂, 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0.8 µL de BSA (10 mg/mL) y 5 µL de DNA. La reacción primaria consistió en 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 68 °C por 60 s y 74 °C por 30 s y una extensión de 74°C por 10 min. Se utilizaron 5 µL del producto de PCR primario para la reacción secundaria. Las condiciones del PCR secundario fueron 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 60 s, 72 °C por 30 s, y una extensión de 72 °C por 10 min. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 2% por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

6.4.3 Detección de *Giardia lamblia* por PCR

Un protocolo de PCR anidado fue utilizado para amplificar un fragmento de 292 pb del gen 18S rRNA. Los oligonucleótidos de la primera amplificación fueron GiaF 5'-AAG TGT GGT GCA GAC GGA CTC-3' y GiaR 5'-CTG CTG CCG TCC TTG GAT GT-3', y para la segunda RH11 5'-CAT CCG GTC GAT CCT GCC-3', RH4 5'-AGT CGA ACC CTG ATT CTC CGC CAG G-3' (Appelbee et al., 2003). El volumen de reacción final fue de 20 μ L que contienen 200 nMol de cada oligonucleótidos, 200 μ M dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U de Taq DNA polimerasa y 0.8 μ L de BSA (10 mg/mL) y 5 μ L de DNA. La reacción primaria consistió en 40 ciclos de amplificación a 96 °C por 45 s, 55 °C por 30 s y 74 °C por 45 s, seguido por un ciclo de 4 min a 74 °C. Para la reacción secundaria se utilizaron 5 μ L del producto primario. Las condiciones de amplificación fueron 35 ciclos de amplificación a 96 °C por 45 s, 59 °C por 30 s y 74 °C por 30 s, seguido por un ciclo de 4 min a 74 °C. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 2% por electroforesis y tinción con bromuro de etidio.

6.5 Análisis de resultados

Los resultados fueron analizados con el programa Statgraphics Centurion XVI.I. Debido a que en los datos microbiológicos se presenta una gran variación, fue necesario transformarlos a logaritmo base 10 para el análisis. Se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis para evaluar la hipótesis nula de que las medianas en cada una de las muestras es la misma, esto fue realizado para hacer comparaciones entre sitios y temporadas para cada uno de los microorganismos. También se realizó una prueba de correlación de rangos de Spearman para conocer las relaciones entre las concentraciones de bacterias indicadoras, protistas patógenos y turbidez.

7. Resultados

7.1 Parámetros fisicoquímicos

Un resumen de los parámetros fisicoquímicos medidos en agua superficial del río Magdalena, río Eslava y río Cuitzmala, se presenta en la Tabla 3. Los datos se muestran con las principales medidas de tendencia central como son la media aritmética, la desviación estándar y el máximo y mínimo para cada grupo de variables por temporada de muestreo. Las diferencias en la cantidad de datos (n) se deben a condiciones externas de funcionalidad de la sonda multiparamétrica y a la disponibilidad de agua en cada uno de los ríos, la cual en ocasiones era nula debido a la desecación.

Con excepción de la temperatura y la turbidez en el río Magdalena, las mediciones presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre temporadas tanto en el río Magdalena como en el río Eslava. De manera general se observó un incremento en los parámetros fisicoquímicos entre la zona natural con respecto a la zona urbana.

En el río Cuitzmala la temporada cálida-seca presentó los valores más altos de temperatura y conductividad eléctrica en comparación con la temporada fría-seca y lluvias ($p < 0.05$). La temporada de lluvias presentó una turbidez significativamente mayor con respecto de las otras dos temporadas ($p < 0.05$); este incremento fue gradual para cada uno de los sitios pertenecientes a la cuenca, y entre temporadas.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos medidos en el río Magdalena y Eslava, Ciudad de México y río Cuitzmala, Jalisco.

Sitios	Temperatura (°C)	Turbidez (UNT)	pH	Conductividad eléctrica (µS/cm)
Río Magdalena				
Lluvias 2012				
MA	13	21	7	194
DE	3	21	0	175
Intervalo	9.7-17.0	2.6-63	6.7-7.3	67-555
n	30	30	30	30
Fría-seca 2013				
MA	12	75	7	1106
DE	4	65	0	908
Intervalo	5.7-16	0-170	6.4-7.3	225-2475
n	27	27	27	27
Cálida-seca 2013				
MA	14	45	7.8	374
DE	4	54	0	306
Intervalo	8.7-18	0-140	7.5-8.3	106-774
n	21	21	21	21
Lluvias 2013				
MA	13	16	7.6	179
DE	2	14	0	155
Intervalo	9.5-17	1.5-48	7.2-8.2	1.9-507
n	30	48	30	30
Río Eslava				
Lluvias 2012				
MA	12	53	6.9	515
DE	2	104	1	821
Intervalo	9.8-17	0-341	5.5-8	47-2489
n	27	27	27	27
Fría-seca 2013				
MA	8	1.1	6	202
DE	1	1	0	45
Intervalo	7.4-8.7	0-1.8	5.6-6.4	160-243
n	6	6	6	6
Cálida-seca 2013				
MA	8.4	2	8	80
DE	2	1	0	15
Intervalo	6.7-10	0-4.5	7.7-8.3	65-95
n	6	6	6	6
Lluvias 2013				
MA	12	27	7	154
DE	1	29	0	93
Intervalo	9.5-14	0-83	6.2-7.6	72-382
n	27	27	27	27

Tabla 3. Continuación

Sitios	Temperatura (°C)	Turbidez (UNT)	pH	Conductividad eléctrica (µS/cm)
Río Cuitzmala				
Fría-seca 2014				
MA	24	2.2	7.2	329
DE	3	4	0	162
Intervalo	18-28	0.3-12.2	6.1-7.7	66-670
n	27	27	27	27
Cálida-seca 2014				
MA	31	18	7.5	2676
DE	2	36	0	4466
Intervalo	25-33	1-112	6.5-8.2	196-14114
n	24	24	24	24
Lluvias 2014				
MA	26	99	7.5	143
DE	2	2	0	42
Intervalo	20-27	92-100	6.9-9	30-177
n	27	27	27	27

MA = media aritmética; DE = desviación estándar; intervalo = min-máx; n = número de observaciones

7.2 Parámetros microbiológicos

Los resultados del análisis espacial y temporal de CF y SF en el río Magdalena se presentan en la Figura 5. En ella se observa un incremento significativo ($p < 0.05$) a lo largo del río a partir de sitio ZU1 sobrepasando las 1,000 UFC por cada cien mililitros en los siguientes sitios de muestreo.

Con base en el análisis de Kruskal-Wallis la variación temporal en el río Magdalena no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$) para ninguna de las campañas de muestreo.

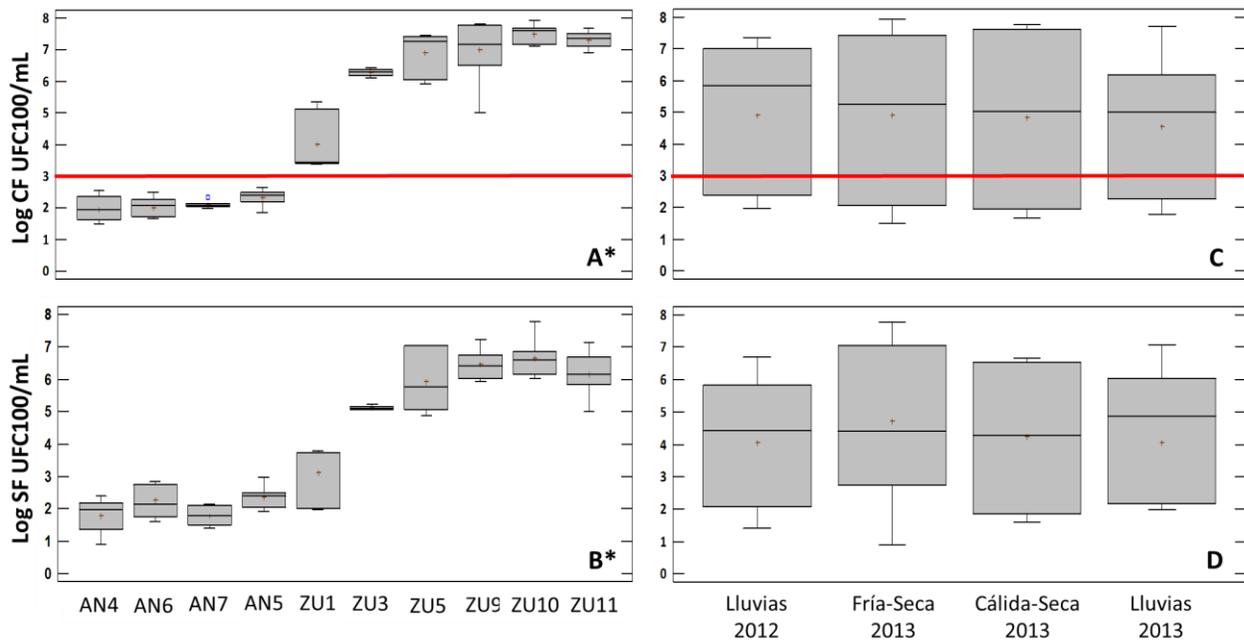


Figura 5. Variación espacial (A, B) y temporal (C, D) de coliformes fecales y estreptococos fecales en el río Magdalena, Ciudad de México. La línea roja representa el límite máximo permisible para CF en agua establecido por la NOM-001-ECOL-1996 (DOF, 1997). * $p < 0.05$.

Los resultados de la concentración de CF y SF en el río Eslava por sitio y temporada se muestran en la Figura 6. Tanto los CF como los SF presentaron un incremento significativo ($p < 0.05$) a partir de un sitio de transición (ESAN4) por encima de las 1,000 UFC/100mL, hasta su unión con el río Magdalena en la sección más baja.

La variación temporal de CF y SF en el río Eslava fue corroborada con el análisis de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), siendo ambas temporadas de lluvias (2012 y 2013) las que presentaron mayores conteos de estos microorganismos.

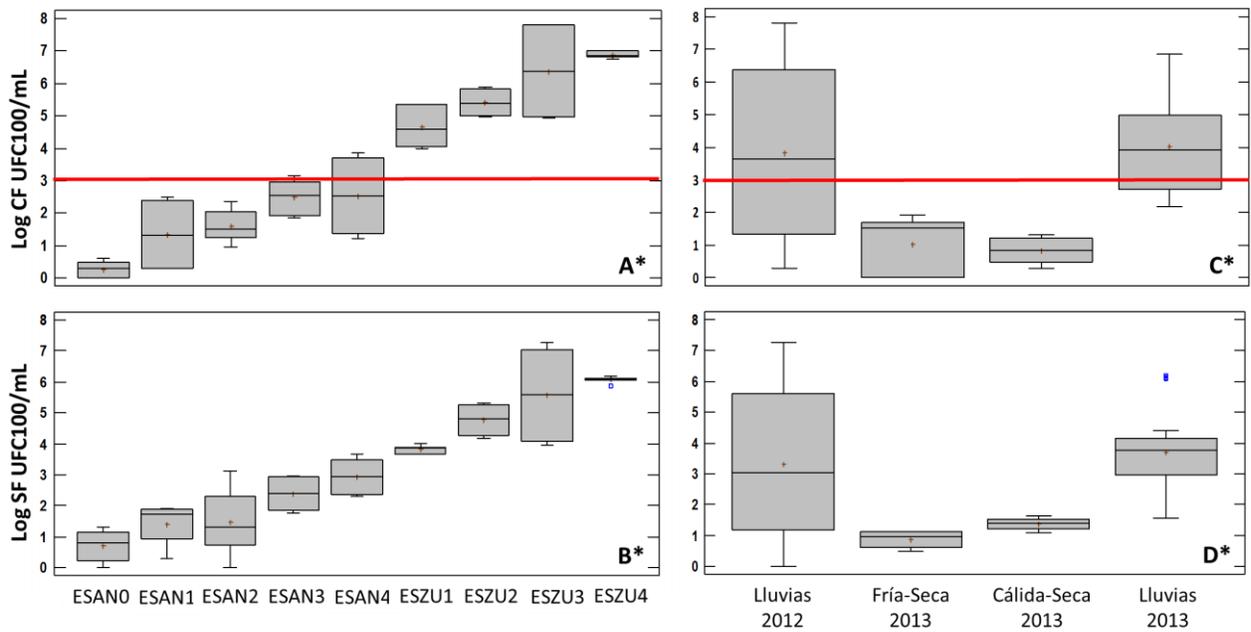


Figura 6. Variación espacial (A, B) y temporal (C, D) de coliformes fecales y estreptococos fecales en el río Eslava, Ciudad de México. La línea roja representa el límite máximo permisible establecido por la NOM-001-ECOL-1996 (DOF, 1997). * $p < 0.05$.

El análisis de la concentración por sitio y temporada de los microorganismos indicadores, CF, SF y EF para el río Cuitzmala se muestra en la Figura 7. En todos los sitios los valores de CF, SF y EF se mantuvieron alrededor de las 1,000 UFC por cada 100 mililitros, incluso en un sitio establecido como control (ChEst) que pertenece a otra cuenca distinta del río Cuitzmala.

El análisis mostró que la temporada de lluvias 2014 fue la época con mayor número de UFC para los tres tipos de microorganismos indicadores evaluados en el río Cuitzmala.

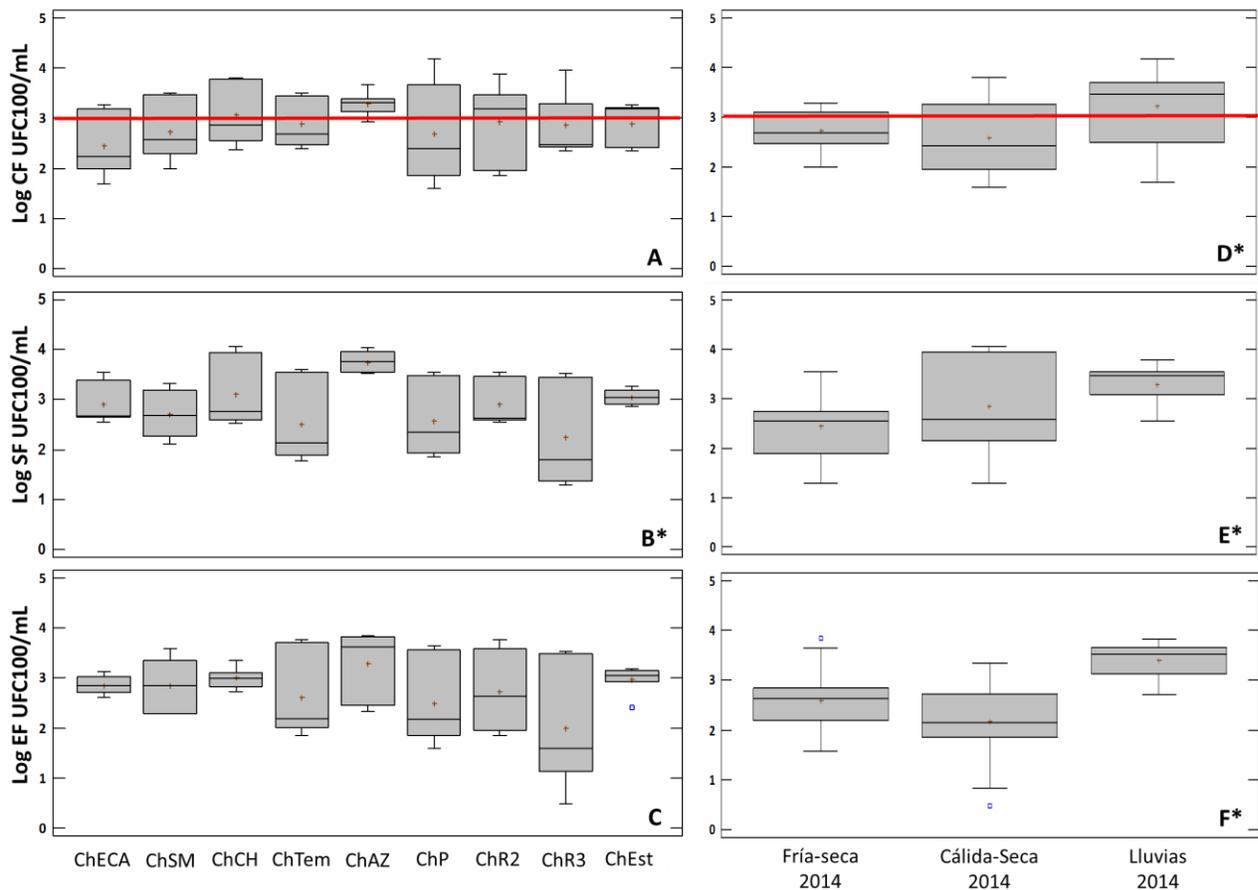


Figura 7. Variación espacial (A, B, C) y temporal (D, E, F) de coliformes fecales (CF), estreptococos fecales (SF) y enterococos fecales (EF) en el río Cuitzmala Jalisco. La línea roja representa el límite máximo permisible establecido por la NOM-001-ECOL-1996, de CF en aguas y bienes nacionales (DOF, 1997). * $p < 0.05$.

Con base en el sistema de clasificación de calidad del agua propuesto por Kavka *et al.* (2006) se encontró (Tabla 4) que tanto el río Magdalena y el río Eslava cambiaron el estado de contaminación de baja a excesiva conforme el cauce entra en contacto con la zona urbana (marcadas en los dos sistemas con una letra “Z”). En contraparte el río Cuitzmala mantiene un estado de contaminación media a crítica en solo dos de los sitios (ChCh y ChAZ).

Tabla 4. Sistema de clasificación de calidad del agua, basado en parámetros bacteriológicos según el grado de contaminación fecal en 100 mililitros (basado en Kavka *et al.*, 2006).

Parámetros	Clases				
	I Baja	II Media	III Crítica	IV Fuerte	V Excesiva
CF	≤100	>100-999	>1,000-9,999	>10 ⁵ -99,999	>10 ⁶
Río Magdalena					
AN4	+				
AN6		+			
AN7		+			
AN5		+			
ZU1				+	
ZU3					+
ZU5					+
ZU9					+
ZU10					+
ZU11					+
Río Eslava					
ESANO	+				
ESAN1	+				
ESAN2	+				
ESAN3		+			
ESAN4		+			
ESZU1				+	
ESZU2					+
ESZU3					+
ESZU4					+
Río Cuitzmala					
ChECA		+			
ChSM		+			
ChCh			+		
ChTem		+			
ChAZ			+		
ChP		+			
ChR2		+			
ChR3		+			
ChEst		+			

7.3 Protistas patógenos

Se detectó la presencia de *C. parvum* y *G. lamblia* en el 43% y 52% de las muestras respectivamente en los tres SEs. En el río Cuitzmala hubo una menor prevalencia de ambas especies con respecto a los ríos Magdalena y Eslava (Figura 8).

La prevalencia de *C. parvum* y *G. lamblia* en el río Magdalena fue de 56% para *C. parvum* y 69% para *G. lamblia* con un intervalo de 0-5,000 ooquistes por litro y 0-112,000 quistes/L respectivamente. Para el río Eslava la prevalencia fue similar entre los dos patógenos, 45% para *C. parvum* y 44% para *G. lamblia*, mientras que el intervalo varió de 0-18,000 ooquistes/L y 0-690,000 quistes/L respectivamente. En el río Cuitzmala la prevalencia fue de 23 y 33% respectivamente. El intervalo de (oo)quistes varió de 0-3.6 ooquistes/L para *C. parvum* y de 0-7.2 quistes/L para *G. lamblia*.

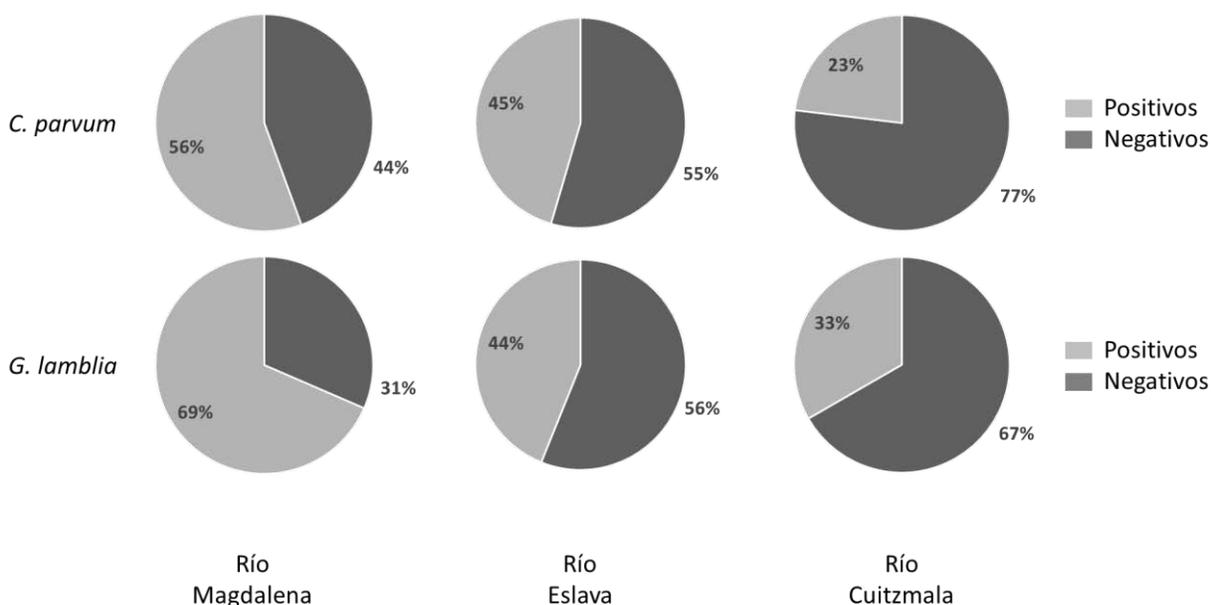


Figura 8. Prevalencia de (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia* en agua de los tres SEs.

Los resultados del análisis por sitio y temporalidad de *C. parvum* y *G. lamblia* en el río Magdalena se muestran en la Figura 9. *Cryptosporidium parvum* fue detectado en todos los sitios menos en el ZU5. Los conteos sobrepasaron los 1,000 ooquistes por litro a partir del sitio ZU3. El sitio ZU10 presentó los mayores conteos para ambas especies, 3.6 y 5 unidades logarítmicas

(>1,000 ooquistes/L y >100,000 quistes/L) para *C. parvum* y *G. lamblia* respectivamente. Las diferencias estadísticas entre los sitios fueron corroboradas con el análisis de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

La temporada cálida-seca 2013 fue la que presentó mayor número de (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia* (Figura 9C y 9D), sin embargo, no se logró observar una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) para ninguna de las dos especies.

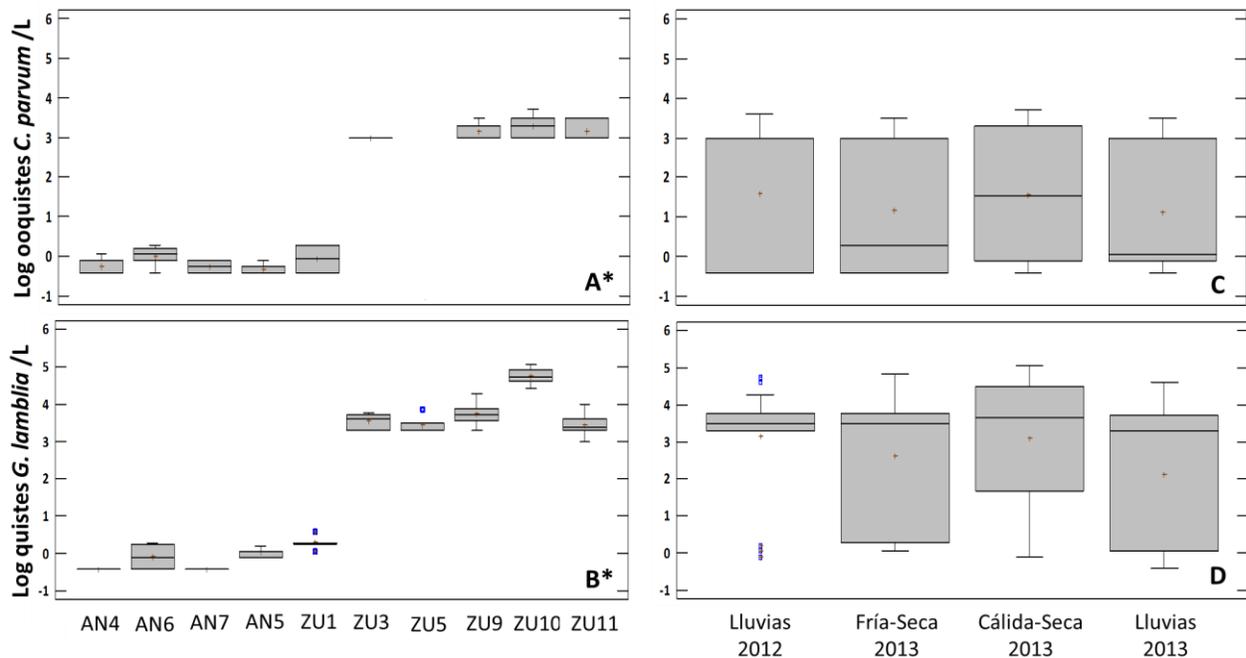


Figura 9. Variación espacial (A, B) y temporal (C, D) de *C. parvum* y *G. lamblia* en el río Magdalena, Ciudad de México. * $p < 0.05$.

El análisis por sitio y temporada para el principal tributario del río Magdalena, el río Eslava, se muestra en la Figura 10. *Cryptosporidium parvum* fue detectado en ocho de los nueve sitios (excepto ESAN1) por encima de los 1,000 ooquistes por litro a partir de ESZU1. En el caso de *G. lamblia* los quistes fueron detectados en siete de los nueve sitios por encima de los 10,000 quistes por litro. En éste río se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) a partir del sitio ESZU1. El sitio con mayor número de (oo)quistes fue ESZU3; en el caso de *C. parvum* se registró un incremento de 4.2 unidades logarítmicas (>10,000 ooquistes/L) mientras que para *G. lamblia* fue de 6 unidades (100,000 quistes/L).

La variación temporal de (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia* no fue estadísticamente significativa de acuerdo con el análisis de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), sin embargo, ambas temporadas de lluvias (2012 y 2013) fueron las que presentaron mayor concentración de (oo)quistes debido a la falta de agua durante la época fría-seca y cálida-seca.

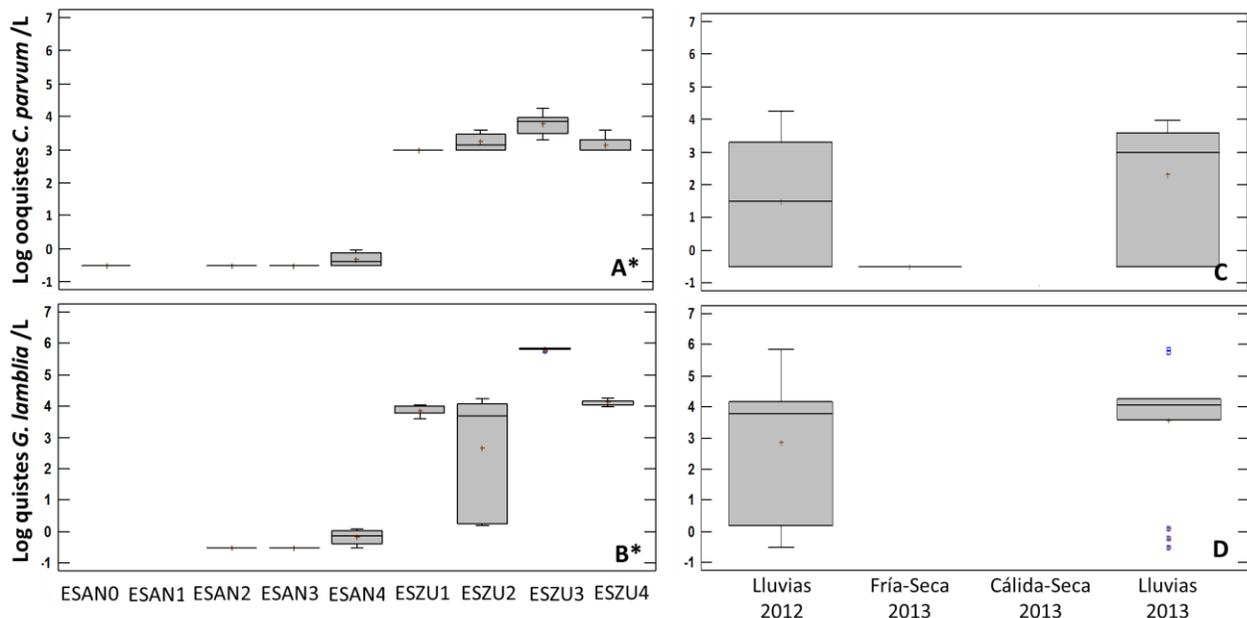


Figura 10. Variación espacial (A, B) y temporal (C, D) de *C. parvum* y *G. lamblia* en el río Eslava, Ciudad de México. * $p < 0.05$.

La variación espacial y temporal de (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia* en el río Cuitzmala se presenta en la Figura 11. *Cryptosporidium parvum* se detectó en todos los sitios, con excepción del sitio control (ChEst); en ningún sitio hubo un conteo mayor a cuatro ooquistes por litro. De manera similar *G. lamblia* se detectó en todos los sitios menos en dos de ellos, ChECA y ChAZ, y la cantidad de quistes se mantuvo por debajo de ocho quistes por litro.

Con respecto a la variación temporal de *C. parvum* y *G. lamblia* la temporada fría-seca presentó la concentración más baja de las tres temporadas evaluadas, aunque estos cambios no fueron significativos para ninguna especie ($p > 0.05$).

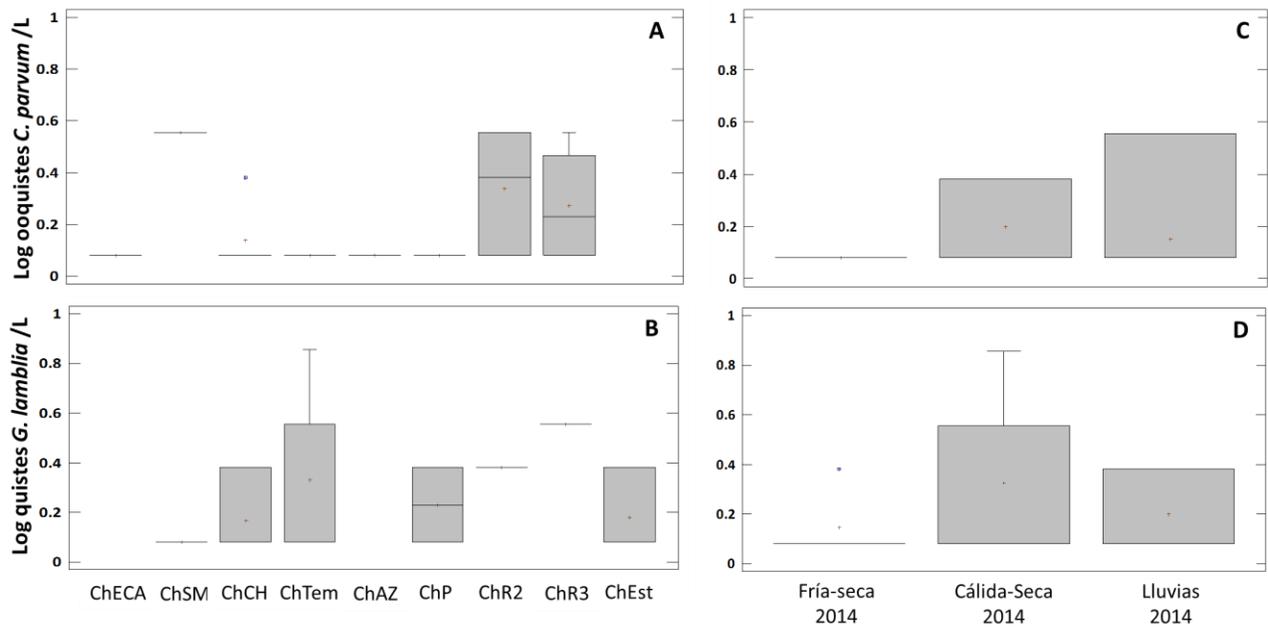


Figura 11. Variación espacial (A, B) y temporal (C, D) de *C. parvum* y *G. lamblia* en el río Cuitzmala, Jalisco.

7.4 Análisis de PCR

De los ensayos de PCR para la detección de *C. parvum* y *G. lamblia* se estandarizó y amplificó un segmento de ~435 y ~292 pb, respectivamente, de las muestras control (Figuras 12 y 13); sin embargo, aunque se llevaron a cabo múltiples ensayos para la estandarización de esta técnica, los cuales incluyeron gradientes de temperatura, concentración de magnesio y de diferentes concentraciones de DNA de muestras de agua, solo se obtuvo una muestra positiva a *Cryptosporidium* sp. en el sitio ZU10 del río Magdalena.

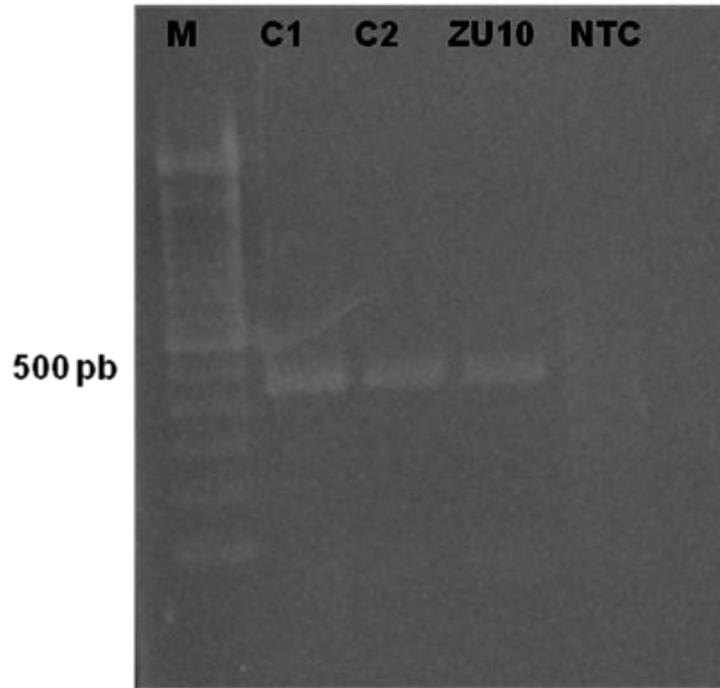


Figura 12. Producto de PCR anidado del gen de la 18S rRNA de *Cryptosporidium* sp. Líneas C1 y C2 controles positivos, línea ZU10 muestra positiva del río Magdalena, NTC control negativo.

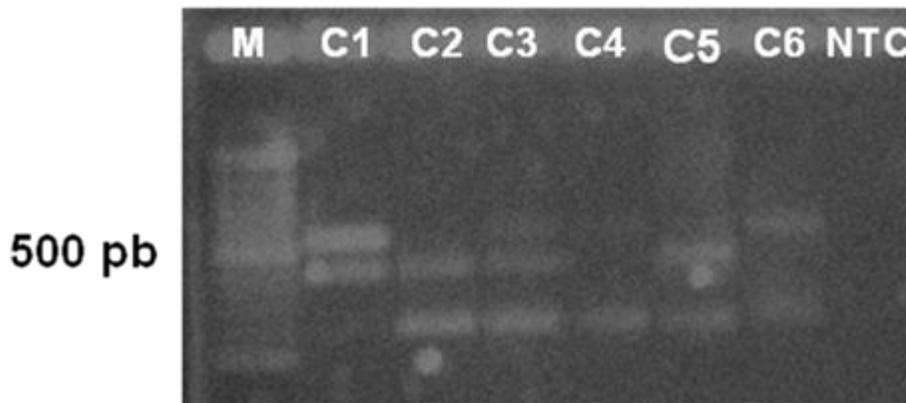


Figura 13. Producto de PCR anidado del gen de la 18S rRNA de *G. lamblia*. Carriles C1-C6 controles positivos, NTC control negativo.

7.5 Análisis de correlación

Los resultados del análisis de correlación de intervalos de Spearman entre la concentración de bacterias indicadoras, *C. parvum*, *G. lamblia* y turbidez se presenta en la Tabla 5.

De manera general el número de correlaciones entre bacterias indicadoras, protistas patógenos y turbidez fue menor en el río Cuitzmala a comparación con el río Magdalena y el río Eslava. Tanto

la turbidez como los CF fueron los principales parámetros que se relacionaron con los diferentes componentes evaluados.

La turbidez se relacionó con todos los microorganismos analizados en el río Magdalena ($r = 0.521-0.809$, $p < 0.01$); en el río Eslava esta relación se presentó con *C. parvum*, CF y SF ($r = 0.437-0.74$, $p < 0.05$); mientras que en el río Cuitzmala solo mostró relación con CF y SF ($r = 0.341-0.469$, $p < 0.01$).

La relación entre la concentración CF y SF fue significativa ($r = 0.699-0.940$, $p < 0.01$) en los tres SEs evaluados.

Los EF solo fueron evaluados en el río Cuitzmala, por lo que no fueron incluidos en este análisis, dado que el método proporciona un valor de correlación en función del peso que cada variable le confiera de manera independiente, por lo que los datos de EF fueron más bien exploratorios.

Tabla 5. Correlación de Spearman entre protistas parásitos, bacterias indicadoras y turbidez.

Río Magdalena	<i>C. parvum</i>	<i>G. lamblia</i>	CF	SF	Turbidez
<i>Giardia lamblia</i>	0.836**	-	0.790**	0.742**	0.5218**
N	42	-	74	73	74
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	0.836**	0.741**	0.837**	0.539**
N	-	42	58	58	59
CF	0.741**	0.790**	-	0.894**	0.809**
N	58	74	-	100	101
SF	0.837**	0.742**	0.894**	-	0.787**
N	58	73	100	-	101
Río Eslava					
<i>Giardia lamblia</i>	0.897**	-	0.604**	0.661**	0.191
N	20	-	29	29	29
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	0.897**	0.759**	0.751**	0.437*
N	-	20	29	29	29
CF	0.759**	0.604**	-	0.940**	0.614**
N	29	29	-	57	58
SF	0.751**	0.661**	0.940**	-	0.74**
N	29	29	57	-	56
Río Cuitzmala					
<i>Giardia lamblia</i>	0.316	-	-0.129	-0.298	0.219
N	6	-	23	26	19
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	0.3162	0.342	0.430	0.501
N	-	6	16	18	15
CF	0.342	-0.129	-	0.716**	0.469**
N	16	23	-	72	57
SF	0.430	-0.297	0.716**	-	0.211
N	18	26	72	-	60

Los valores de cada par de variables corresponden al coeficiente de correlación (r). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

8. Discusión

Evaluación de parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos evaluados en este trabajo son representativos de la calidad del agua en los ríos, y son una buena medida de los cambios rápidos en los SEs (Mazari-Hiriart *et al.*, 2014). En ambos SEs se observaron variaciones que pueden estar dadas por la influencia de diferentes actividades humanas en las cercanías o inmediaciones de cada sitio, por lo cual la desviación estándar se incrementó para cada conjunto de variables, y por las diferencias estacionales marcadas en cada uno de estos SEs (Tapia-Palacios, 2012; Mazari-Hiriart *et al.*, 2014; Caro-Borrero *et al.*, 2015).

Los parámetros fisicoquímicos evaluados tanto en el río Magdalena-Eslava como el río Cuitzmala se mantienen dentro de los Criterios Ecológicos de Calidad de Agua, bajo la clasificación de calidad para la protección de la vida acuática y como fuente de abastecimiento de agua potable (DOF, 1989), con excepción de aquellos sitios en la zona urbana del río Magdalena y río Eslava, y los sitios ChP, ChR2, ChR3 y del río Cuitzmala, en el cual tanto la turbidez como la conductividad eléctrica se incrementaron durante la época de lluvias.

En el caso del río Magdalena y Eslava los valores registrados de pH y conductividad eléctrica presentaron valores heterogéneos entre las distintas temporadas en el río Magdalena-Eslava ($p < 0.05$). Si bien en estos SEs se registró un patrón establecido en los parámetros fisicoquímicos dados por la estacionalidad propia del lugar, se logra observar cambios importantes en los sitios de transición entre el SCDF y la zona urbana en ambos SEs, lo que coincide con lo encontrado por Mazari-Hiriart *et al.* (2014) y Caro-Borrero *et al.* (2015).

Durante la época fría-seca y cálida-seca muchos de los sitios, principalmente en el río Eslava, no fueron medidos, debido a la falta de agua durante la temporada fría-seca y cálida-seca (Tabla 2). Lo anterior puede deberse a factores naturales como cambios en la precipitación y la temperatura que alteran la dinámica natural del flujo propia de éste río.

En el río Cuitzmala los valores de temperatura y conductividad eléctrica registrados se incrementaron durante la época fría-seca y cálida-seca, y disminuyeron en la temporada de lluvias. Este patrón es similar al observado por Tapia-Palacios (2012), donde los principales cambios observados de estos parámetros fueron explicados por la variación climática propia de la zona, que en el caso de la cuenca del río Cuitzmala es muy marcada (Ceballos *et al.*, 1999). Cabe

resaltar que en el sitio R3 la conductividad se incrementó en dos órdenes de magnitud debido principalmente al aporte de agua de mar que existe en este sitio. El incremento en la turbidez durante la temporada de lluvias puede deberse a un efecto de arrastre de sedimentos en la cuenca propiciado por la lluvia y por el cambio de uso de suelo en la zona de lomeríos (200, 1,000 msnm) (Figura 4).

Evaluación de parámetros microbiológicos

El análisis microbiológico de CF y SF para el río Magdalena mostró un incremento exponencial entre los sitios del SCDF y la zona urbana, sobrepasando lo permitido por la NOM-001-SEMARNAT-1996 (DOF, 1997) en más de cuatro unidades logarítmicas a partir del sitio ZU3 (Figura 5A y 5B). Estos resultados muestran tres zonas: cuatro sitios por debajo del límite máximo permitido denominado como (AN4, AN7, AN6 y AN5), un sitio de transición (ZU1) y cinco sitios cuyos conteos de UFC sobrepasan las siete unidades logarítmicas (ZU3, ZU5, ZU9, ZU10 y ZU11), lo que significa que existe un cambio en la capacidad de autodepuración en el sistema, o un aumento en la cantidad de descargas residuales que recibe el río; lo anterior fue observado por Montes *et al.* (2013) y Mazari-Hiriart *et al.* (2014). De estos últimos el sitio que registró mayor cantidad de UFC para ambos grupos de microorganismos fue ZU10, el cual corresponde a un vaso regulador conocido como “Presa Anzaldo”, donde se captan aguas residuales y superficiales de distintas zonas en el sur de la ciudad de México. Es importante mencionar que a pesar de que el sitio AN7 fue analizado durante las cuatro temporadas de muestreo, no se cuantificó CF y SF en la época fría-seca y cálida-seca, esto debido quizás a la existencia de residuos de cloro (notorio por el olor) vertidos al río por una planta potabilizadora, que opera en este sitio, y en la cual se trata el agua del río para abastecimiento público.

La variación temporal de la concentración de CF y SF muestra que la temporada fría-seca fue la que presentó mayores conteos de UFC para CF y SF (Figura 5A y 5B), sin embargo, no se observó ningún cambio estadísticamente atribuible a este factor, debido quizás al aumento de descargas urbanas en el río, que mantienen un flujo constante de agua y microorganismos entre las distintas temporadas, principalmente en la zona urbana.

Los resultados de CF y SF en el río Eslava muestran un incremento exponencial en cada uno de los sitios (Figura 6A y 6B), desde el sitio más elevado en la cuenca (ESAN0) hasta el sitio más

bajo antes de la unión con el río Magdalena (ESZU4). Al igual que en el río Magdalena los CF en el río Eslava exceden el límite máximo permitido estipulado en las normas mexicanas (DOF, 1997) a partir del sitio ESZU4. Esta disminución en la calidad fue observado también por Mazari-Hiriart *et al.* (2014), y se debió principalmente al incremento de descargas de aguas residuales por parte de los asentamientos urbanos a partir del sitio ESZU1.

En ambas épocas de lluvia (2012 y 2013) para el río Eslava hubo un incremento de la concentración de CF y SF de manera significativa (Figura 6C y 6D), debido a la falta de agua en algunos sitios del río por efecto de la dinámica propia del mismo.

El análisis de CF en todos los sitios del río Cuitzmala se mantuvo en límite máximo permisible estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 (DOF, 1997), el cual es de 1,000 Unidades Formadoras de Colonia por cada 100 mililitros (UFC/100mL) vertidos en cuerpos de agua nacionales (Figura 7A). Lo anterior significa que este SEs presenta impacto medio por parte de las comunidades que habitan en los alrededores de la zona (Kavka *et al.*, 2006) (Tabla 4). Solo el sitio ChP sobrepasó en una unidad logarítmica (de 1,000-10,000 UFC/100mL) el límite establecido en la norma. Si bien en los demás sitios se sobrepasa este límite, estos cambios son homogéneos a lo largo del río Cuitzmala, incluso en el sitio ChEst que se encuentra en una Área Natural Protegida (ANP) en la estación de Biología Chamela, y que forma parte de otra cuenca distinta (cuenca del arroyo Chamela) donde el impacto humano es menor, y que fue utilizado en este trabajo como sitio de comparación.

Con respecto a los SF y EF en el río Cuitzmala hubo un comportamiento similar al de los CF. Los conteos fueron homogéneos a lo largo del río y se mantuvieron alrededor de las tres unidades logarítmicas ($p > 0.05$), lo que significa que en este SEs la presión por las actividades antropogénicas está en transición (López-Tapia, 2008; Tapia-Palacios, 2012) y que el río mantiene su capacidad de autodepuración.

Las diferencias temporales en el río Cuitzmala fueron corroboradas con el análisis ($p < 0.05$), siendo la temporada de lluvias en el año 2014 donde se registró una concentración significativamente más alta de CF, EF y SF. En un estudio realizado por López-Tapia (2008) encontró también que la época de lluvias fue la que presentó mayor concentración en los conteos de microorganismos indicadores. Esta condición en el río puede estar acentuándose por un efecto de arrastre principalmente en la zona lomeríos, en donde el principal uso de suelo es la actividad agrícola y se presenta actividad pecuaria en sitios específicos.

Los SF y EF son microorganismos usados como indicadores complementarios de contaminación fecal (Gerba y Pepper, 2004). En este trabajo se exploró el uso de EF en el río Cuitzmala para ver si existen variaciones entre los CF y SF que no puedan ser detectados por los mismos, ya que cada grupo presenta límites de tolerancia distintos entre sí, propiciados por el ambiente. El resultado de esta comparación no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$) por lo que es necesario seguir investigando su potencial uso en distintos ambientes.

Tanto el río Magdalena-Eslava (específicamente en la SCDF) como el río Cuitzmala, en la comunidad de la ECA, son usados como fuente de agua para uso y consumo humano (PUEC-UNAM, 2008; Solórzano, 2008; PUMA-UNAM, 2009), para lo cual la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua (LFDMA, 2012) estipula el límite de 1,000 UFC/100mL. Debido a que los conteos de CF en ambos SEs sobrepasaron este límite es necesario que se le haga un tratamiento antes de su distribución para uso y consumo humano, más aún en zonas donde hay asentamientos irregulares, como sucede en la parte baja del río Magdalena y río Eslava, donde la población podría estar más expuesta a altos niveles de bacterias patógenas (López-Tapia, 2008; Mazari-Hiriart *et al.*, 2014); esto último es un factor de riesgo importante que debe de ser considerado por los tomadores de decisiones y la población de tal manera que los riesgos de los grupos vulnerables disminuyan.

Tanto los CF, SF y EF son microorganismos que se encuentran formando parte de la microbiota intestinal del humano y los animales homeotermos, son evacuados al ambiente a través de las heces, de ahí su importancia y utilidad en la evaluación de contaminación de origen fecal y la presencia de patógenos. Sin embargo, la utilidad de estos microorganismos como indicadores universales ha sido cuestionado debido a su capacidad de recrecer en estos ambientes en zonas tropicales (Byappanahalli *et al.*, 2003), por lo que los resultados mostrados en estos ambientes tienen que ser sometidos a una evaluación más profunda, que integre el uso de otros microorganismos indicadores e incorpore la evaluación de distintos tipos de patógenos que pueden ser tanto virus, bacterias como protistas.

Evaluación de protistas patógenos

De acuerdo con los resultados hubo una mayor prevalencia de *C. parvum* y *G. lamblia* en agua del río Magdalena-Eslava en comparación con el río Cuitzmala. Snel *et al.* (2009) mencionaron

que en sistemas rurales existe una predominancia de infecciones por *Cryptosporidium* sp. lo cual está relacionado con la densidad de animales de granja y la fuente de abastecimiento de agua sin tratamiento, y que en sistemas urbanos o semi-urbanos existe una relación significativa con la incidencia de *G. lamblia* con un origen antropogénico principalmente; en el río Magdalena la prevalencia fue similar a lo descrito por estos autores, y puede ser explicada por el aporte de agua residual producida por asentamientos humanos, donde *G. lamblia* fue más predominante en estas zonas. En contraparte, a pesar de que las principales actividades económicas en la cuenca del río Cuitzmala son la agricultura y la ganadería, la prevalencia esperada de *C. parvum* fue menor que la de *G. lamblia* y se contrapone con lo descrito por Snel *et al.* (2009).

Basado en el hecho de que la detección de *C. parvum* y *G. lamblia* fue de más del 23% en los tres SEs, significa que la población de animales y humanos que utilizan el agua para diversas actividades están expuestos a estos parásitos y, eventualmente podría haber un brote de enfermedades. Sin embargo, es importante considerar que la transmisión de enfermedades infecciosas no depende exclusivamente de la presencia del patógeno, sino de múltiples factores como son: 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).

La concentración de (oo)quistes *C. parvum* y *G. lamblia* en el río Magdalena se incrementó a partir del sitio ZU3, que corresponde a un lugar donde el río atraviesa la zona urbana de este SEs. De la misma manera Mazari-Hiriart *et al.* (2014) encontraron durante los años 2008 y 2009 un patrón similar en la concentración de (oo)quistes, y los conteos más elevados para las dos especies se presentaron a partir de la zona baja de la cuenca del río Magdalena, donde comienza la zona urbana, sin embargo, los conteos registrados en esta investigación sobrepasan en al menos una unidad logarítmica lo registrado por los autores. Esto último puede indicar dos cuestiones: la primera es que al aumentar la concentración de (oo)quistes se puede estar incrementando el riesgo de infección por *C. parvum* y *G. lamblia* en poblaciones humanas y animales que están expuestas a esta agua, y segunda que existen factores dentro de este SEs que se han modificado en los últimos 20 años (PUEC-UNAM, 2008, Caro-Borrero *et al.*, 2015) que pueden estar promoviendo el incremento de (oo)quistes de estas especies tanto en el río Magdalena como en el río Eslava.

Un patrón similar al registrado en el río Magdalena se registró en el río Eslava, donde a partir de la zona urbana (ESZU1) hubo un incremento en la concentración de (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia*. En éste río se registraron los mayores conteos de (oo)quistes de los tres SEs para ambas especies, lo anterior puede ser explicado por la falta de un flujo continuo de agua de las zonas SCDF durante la temporada fría-seca y cálida seca, lo que promueve solo el flujo de agua residual de los asentamientos humanos en la zona urbana.

Los cambios detectados en la concentración de (oo)quistes *C. parvum* y *G. lamblia* a lo largo del río Cuitzmala son homogéneos y no presentaron ninguna variación espacial y temporal significativa. Lo anterior puede deberse a que este SEs es heterogéneo y existe una baja presión por parte de las actividades socio-económicas y un bajo aporte de descargas residuales sobre el río. Tapia-Palacios (2012) mencionó que el principal aporte de *C. parvum* y *G. lamblia* está dado por las comunidades donde existe un manejo inadecuado de las aguas residuales, que en este caso serían los sitios ChSM (perteneciente al poblado de San Miguel) y ChP (se encuentra cerca del poblado de Francisco Villa), y a la fuerte actividad ganadera en la zona norte de la cuenca.

Bates *et al.* (2007) mencionaron que las diferencias en las prevalencias y cargas de estos patógenos en los distintos SEs está relacionado con la densidad poblacional, es decir, a mayor número de personas mayor carga de microorganismos y mayor número de casos positivos. Esto último se hace evidente al comparar la densidad poblacional y los cambios demográficos en ambas cuencas. La cuenca del río Cuitzmala, cuenta con poco más de 5,000 habitantes distribuidos a lo largo de todo este SEs (INEGI, 2011b), mientras que en el río Magdalena-Eslava solo de la delegación Magdalena Contreras existen más de 230,000 habitantes (INEGI, 2011a). Wilkes *et al.*, 2009 mencionaron que los cambios de uso de suelo para la agricultura y ganadería modifican el paisaje y la función de los ecosistemas acuáticos, como consecuencia se incrementan las cargas y dispersión de patógenos; esto último se ve reflejado en los resultados de la concentración de (oo)quistes en los SEs estudiados, donde el río Magdalena-Eslava presentan un paisaje completamente distinto entre el SCDF y la zona urbana, mientras que en el río Cuitzmala, tiene un paisaje menos urbanizado y marcado a lo largo de la cuenca en comparación con los otros dos SEs.

Cryptosporidium parvum y *G. lamblia* son dos patógenos que presentan bajas dosis infecciosas (Okhuysen *et al.*, 1999; Rendtorff, 1979), por lo que cuantificar las cargas de estos patógenos en el agua se vuelve necesario a fin de prevenir futuros brotes y tener un punto de referencia para

mejorar los sistemas de tratamiento de aguas, principalmente en aquellos sitios donde los conteos de ambas especies se incrementan drásticamente.

Debido a que estos ríos representan una fuente importante de agua superficial para el uso y consumo humano es necesario enfatizar que tanto *C. parvum* como *G. lamblia* son especies altamente resistentes al cloro, debido a las características de la estructura y composición de la pared del (oo)quiste (Korich *et al.*, 1990), y que no están incluidas dentro de la normatividad mexicana. Esto último implica que se debe trabajar en materia legislativa para mejorar el sistema de manejo, tratamiento y distribución de agua, a fin de mejorar el servicio y disminuir riesgos. Por otro lado es necesario hacer un manejo más adecuado de las aguas residuales, debido a que las cargas de estas especies en el agua superficial están relacionadas con el incremento poblacional y la falta de tratamiento de sus aguas de desecho, lo que podría desencadenar en una problemática de brotes epidémicos en las zonas más vulnerables de estos SEs.

Ensayos de PCR

De acuerdo con los resultados del análisis de PCR, se obtuvo una muestra positiva para *Cryptosporidium* sp. en el sitio ZU10. Este sitio corresponde a la “Presa Anzaldo”. Este sitio fue uno de los lugares con mayor concentración de (oo)quistes en los SEs evaluados. Sin embargo, la reproducibilidad del protocolo fue baja, probablemente relacionada con la pared de los (oo)quistes que al ser muy resistentes al daño físico (Mitschler *et al.*, 1994; Jarrol *et al.*, 1989; Korich *et al.*, 1990), su ruptura implica un reto para lograr la extracción del DNA (Polverino *et al.*, 2004). Otra causa de la baja reproducibilidad puede ser la presencia de inhibidores en el agua, que de acuerdo con Xiao *et al.* (2001) es uno de los principales obstáculos en la detección por PCR de *Cryptosporidium* sp. Para el caso de *G. lamblia*, el protocolo utilizado originalmente fue diseñado para muestras de heces, en las que la probabilidad de detección son más elevadas con respecto a las cargas en agua (Appelbee *et al.*, 2003), lo que dificulta su detección.

Con base en estos resultados, podemos mencionar que es necesario optimizar los protocolos de PCR para la detección de protistas patógenos en agua a fin de mejorar el monitoreo del agua en los SEs y de esta manera plantear nuevas estrategias en materia de sanidad y gestión del agua.

Relaciones entre turbidez, microorganismos indicadores y protistas patógenos

De acuerdo con Bastos *et al.* (2013) la turbidez funciona como un subrogado de la presencia de múltiples microorganismos (indicadores y patógenos) en plantas de tratamiento, sin embargo, esta relación no se cumple cuando las concentraciones de microorganismos disminuyen en el sistema (LeChevallier y Norton, 1992). Cuando se trata de materia orgánica particulada (especialmente de origen humano o animal), el cual es el caso de la zona urbana por toda la influencia de las aguas residuales que recibe el río Magdalena-Eslava, se vuelve más factible ésta relación entre la turbidez con los microorganismos indicadores (Lugo, 2006, comunicación personal). Bajo esta premisa podemos mencionar que la turbidez es un parámetro que a pesar de que presentó una buena relación con los microorganismos y patógenos debe de considerarse como complementario en la evaluación del estado de los SEs.

La relación entre CF y SF se pueden deber al origen fecal que ambos grupos de bacterias presentan, a que el periodo de permanencia en los ambientes acuáticos que ambos grupos es similar, a que los métodos para su detección son más sencillos, comparados por ejemplo con los métodos de detección de protistas patógenos o virus (Gerba y Pepper, 2004).

De acuerdo con el análisis se encontró que existe una relación entre la concentración de bacterias indicadoras *vs.* *C. parvum* y *G. lamblia*, aunque esto solo fue significativo en el río Magdalena-Eslava. Tapia-Palacios (2012) tampoco encontró una relación entre bacterias indicadoras y protistas patógenos en agua superficial del río Cuitzmala, sin embargo, cuando analizó el agua residual proveniente de las comunidades si se presentó una relación significativa. El río Magdalena y el río Eslava presentan un mayor aporte de agua residual provenientes de los asentamientos humanos en la zona urbana, lo que es coherente con lo reportado por Tapia-Palacios (2012). Las relaciones entre bacterias indicadoras, *C. parvum* y *G. lamblia* en agua superficial, pueden explicarse por diferentes procesos que afectan la actividad y transporte de cada microorganismo; estos procesos pueden ser hidrológicos, químicos y biológicos, por ejemplo: el flujo de agua, la afinidad a determinadas partículas, fenómenos de sedimentación y resuspensión, y sobrevivencia. Por ello, es necesario considerar estos procesos en futuras investigaciones con la finalidad de hacer una mejor evaluación del estado de los SEs y generar propuestas para su mitigación, tales como: mantener un programa de monitoreo de *C. parvum* y *G. lamblia* en los SEs con la finalidad de identificar zonas prioritarias para el manejo, así como la identificación de

la o las épocas donde la población es más vulnerable (Tapia-Palacios, 2008), que por ejemplo, en el río Eslava sería durante la época de lluvias.

Cryptosporidium parvum y *Giardia lamblia*, son dos patógenos con características biológicas similares, tanto en su ruta de infectividad como en su dispersión en el ambiente. Ambas especies son liberadas al ambiente en gran cantidad, $\sim 10^{10}$ ooquistes de *C. parvum* y ~ 1.4 quistes de *G. lamblia*. Su tiempo de permanencia en los ecosistemas acuáticos es similar, >2 meses suspendidos en el agua (Smith *et al.*, 1995). Estas similitudes podrían explicar las relaciones encontradas en este trabajo, tanto en el río Magdalena como en el río Eslava ($r = 0.836-0.897$, $p < 0.01$). En el caso del río Cuitzmala no se presentó ninguna relación entre estos dos patógenos. Esto último es similar a lo reportado por Tapia-Palacios (2012), donde tampoco pudo establecerse ningún tipo de relación entre estos dos patógenos. Con base en esto, podemos mencionar que el monitoreo de protistas patógenos en agua es una herramienta necesaria y complementaria para la evaluación del estado de los SEs y que debe de ser integrativo, considerando un mayor número de parámetros, tanto fisicoquímicos como microbiológicos ya que los resultados no son completamente concluyentes y es difícil establecer patrones compartidos en SEs contrastantes.

Contexto socio-ecológico de los socio-ecosistemas estudiados

Como se ha mencionado, muchos de los cambios en los patrones sociales, económicos y ambientales han modificado, en décadas recientes, la probabilidad de enfermedades infecciosas y su transmisión. Estos cambios incluyen la densidad poblacional, urbanización, pobreza, cambios de uso de suelo y factores naturales como cambio en los patrones climáticos (Lal, 2014).

Lal (2014), realizó una caracterización de los factores ambientales y socioeconómicos que inciden en la trasmisión y dispersión de *C. parvum* y *G. lamblia* en los SEs, esta comparación se presentan en la Tabla 6. La densidad poblacional, el número de viviendas y el uso de suelo para la agricultura, ganadería y asentamientos humanos son los factores que presentan un mayor cambio entre los SEs evaluados.

Tabla 6. Indicadores sociales y factores ambientales que inciden en la dispersión y transmisión de *C. parvum* y *G. lamblia* en los SEs estudiados. Elaboración propia basado en el trabajo de Lal, 2014.

Factores	Río Cuitzmala	Río Magdalena-Eslava	Referencia
Factores ambientales			
Precipitación (mm/año)	752-1400	1200-1500	García, 1988; García-Oliva <i>et al.</i> , 2002
Temperatura (°C/año)	19.5-30	12-18	García, 1988; García-Oliva <i>et al.</i> , 2002
Vegetación natural	80	96	Pérez-Escobedo, 2011; Galeana-Pizaña <i>et al.</i> , 2013
Factores sociales y económicos			
Uso de suelo para agricultura, ganadería y asentamientos humanos (%)	20	4	Pérez-Escobedo, 2011; Galeana-Pizaña <i>et al.</i> , 2013
Densidad poblacional (hab/km ²)	18	>3,700	INEGI, 2011a; 2011b
Viviendas particulares habitadas	>9,000	>63,000	
Edad 0-14 años (%)	<30	<24	INEGI, 2011a; 2011b
Vivienda con disponibilidad de agua entubada (%)	69	81	INEGI, 2011a; 2011b
Viviendas con servicio de drenaje (%)	87	99	INEGI, 2011a; 2011b

Para el río Magdalena-Eslava se utilizaron datos solo de la delegación Magdalena Contreras. Para el río Cuitzmala e utilizaron los datos completos del municipio de La Huerta y Villa Purificación.

Múltiples estudios mencionan que la variación climática es un factor ambiental que modifica las condiciones en los SEs de manera natural (Wilkes *et al.*, 2009; Caro-Borrero, *et al.*, 2015). La temperatura y los patrones de lluvia pueden tener repercusiones tanto en la dispersión como en la transmisión de *C. parvum* y *G. lamblia*. La temporalidad fue un factor importante que al parecer influyó en la concentración de bacterias indicadoras, principalmente en el río Cuitzmala, sin embargo, la concentración de protistas patógenos en el agua no fue dependiente de la estacionalidad en los SEs, con excepción del río Eslava donde la falta de agua durante la época de estiaje disminuye el efecto de dilución de las descargas de agua residual provenientes de las viviendas no regularizadas. Wilkes *et al.* (2009) encontraron que las cargas de (oo)quistes son dependientes de las épocas del año en que son evaluadas, sin embargo, en esta investigación el efecto de los cambios en la temperatura y la precipitación no fueron significativas ($p > 0.05$), incluso son similares.

Los eventos de lluvias abundantes pueden incrementar la carga de (oo)quistes en el agua y por lo tanto modificar su dispersión (Tryland *et al.*, 2011), por lo que se recomienda evaluar las concentraciones de estos microorganismos durante estos eventos y así hacer una mejor

evaluación de los factores ambientales que intervienen en la dispersión y transmisión de protistas patógenos a las poblaciones humanas y animales.

El uso de suelo para agricultura modifica el paisaje y la función de los SEs, como consecuencia se incrementan las cargas y dispersión de patógenos (Wilkes *et al.*, 2009). En la cuenca del río Cuitzmala el porcentaje de uso de suelo para agricultura y ganadería es más alto que en la cuenca río Magdalena-Eslava, sin embargo, en esta última la densidad poblacional y el número de viviendas es mayor, por lo que la incidencia de *C. parvum* y *G. lamblia* en agua superficial es denso-dependiente (Bates *et al.*, 2007).

Con respecto a lo anterior es importante mencionar que tanto *C. parvum* como *G. lamblia* son especies zoonóticas (Appelbee *et al.*, 2005) que no solo afectan la salud humana, sino que podrían generar problemas de salud en animales silvestres y domésticos, y en casos más graves generar pérdidas económicas por enfermedad o muerte de animales domésticos productivos (Koudela y Vitovec, 1998; Fayer *et al.*, 2000), por lo que su presencia en el agua aún en concentraciones bajas, como fue el caso de SCDF del río Magdalena-Eslava y el río Cuitzmala, podría significar un peligro para los organismos expuestos, más aún cuando se modifica el uso de suelo y cambian la estructura y función de los SEs.

Cifuentes *et al.* (2000) mencionaron que existen características socio-económicas particulares que están involucrados en el incremento del riesgo de infecciones diarreicas como la giardiosis. El porcentaje de niños entre 0-14 años, la disponibilidad de agua entubada y el drenaje en las viviendas son algunos indicadores socioeconómicos caracterizados tanto en la cuenca del río Cuitzmala como en la cuenca del Magdalena-Eslava. Estos indicadores nos proporcionan idea de la importancia de evaluar con mayor profundidad los factores de riesgo de infección con *C. parvum* y *G. lamblia* con la finalidad de proporcionar evidencia para los tomadores de decisiones y mejorar el servicio, la distribución y calidad del agua con un enfoque integrativo enfocado principalmente a los grupos de poblaciones más vulnerables.

La evaluación integral de factores socio-ambientales y el monitoreo de microorganismos tanto indicadores como patógenos, en los SEs, es un tema que ha sido poco estudiado en México, sin embargo, los alcances que esto podría generar van desde una mejora en las políticas públicas de manejo de agua hasta mejoras en los sistemas de prevención de salud.

Este trabajo puede ser un punto de partida para explorar con mayor profundidad los factores socio-ambientales en los SEs que modifican la dispersión y transmisión de *C. parvum* y *G. lamblia* a fin de mejorar el monitoreo y la gestión integral del agua.

9. Conclusiones

- Los parámetros fisicoquímicos del agua se mantuvieron dentro de los criterios ecológicos que permiten la sobrevivencia de especies dependientes del agua. Los principales cambios detectados obedecen a las variaciones propias de cada SEs. Solo en los sitios donde las descargas residuales fueron más evidentes, como en la zona urbanizada tanto en el río Magdalena como en el río Eslava, se detectaron cambios importantes en la conductividad eléctrica, los sólidos disueltos totales la turbidez, por encima de los valores guía establecidos en éstos criterios.
- La evaluación de la concentración de microorganismos indicadores en agua es un buen parámetro de los posibles efectos de los cambios que se presentan en los SEs. El río Cuitzmala presentó niveles bajos de CF y SF en comparación con la zona urbana del río Magdalena-Eslava. Tanto la variación temporal como espacial fueron claves en la concentración de CF y SF en ambos SEs.
- La cuantificación de (oo)quistes de *C. parvum* y *G. lamblia* en agua es clave para evaluar los factores de riesgo del uso del agua en los SEs. Tanto en los ríos Magdalena-Eslava como en el río Cuitzmala se detectó la presencia de protistas patógenos. La prevalencia de (oo)quistes en el río Magdalena-Eslava fue mayor en comparación con el río Cuitzmala. La concentración de (oo)quistes de ambas especies en el río Cuitzmala fueron similares a las encontradas en la SCDF de los ríos Magdalena y Eslava, en estos últimos el número de (oo)quistes se incrementó en los sitios de la zona urbana, por lo que los procesos intrínsecos y extrínsecos de transmisión y dispersión deben de ser evaluados a mayor profundidad en estas zonas, con la finalidad de disminuir el peligro para la población expuesta.
- La variación temporal de (oo)quistes solo fue evidenciada en el río Eslava, donde la falta de agua durante las épocas de estiaje (fría-seca y cálida-seca) disminuye el aporte de agua residual proveniente de asentamientos irregulares que descargan sobre el río Magdalena, y por lo tanto, no se incrementa la cantidad de (oo)quistes en este último.
- Aunque los ensayos de PCR son una herramienta que podría proporcionar información del origen de la contaminación y de los genotipos/ensambles que pueden ser patogénicos a los humanos y otros animales; es necesario continuar con la optimización de los protocolos a fin de poder detectar tanto a *C. parvum* y *G. lamblia* en muestras de agua, y de esta manera

mejorar las estrategias de monitoreo y su repercusión en la gestión del agua y la salud ambiental.

- La turbidez es buen indicador de la presencia de microorganismos en el agua. La evidencia apunta a que existe una buena correlación entre este, CF, SF, *C. parvum* y *G. lamblia* en agua donde las concentraciones de protistas patógenos son elevadas, sin embargo, cuando la materia particulada disminuye y por lo tanto disminuye la turbidez, estas relaciones se vuelven débiles y no significativas. Por lo que se recomienda que tanto este como otros parámetros fisicoquímicos se monitoreen de forma complementaria.
- Las correlaciones entre CF, SF, *C. parvum* y *G. lamblia* fueron significativas en el río Magdalena-Eslava, sin embargo, estas relaciones se deben principalmente al aporte de agua residual en las zonas urbanas y al origen fecal de los microorganismos aportados principalmente por desechos humanos, por lo que la correlación de estos parámetros en los SEs rurales, donde los aportes no tienen un origen claro no son significativas.
- La caracterización socio-ambiental de los SEs, brinda un mejor entendimiento de los cambios en los patrones de dispersión y transmisión de *C. parvum* y *G. lamblia*. La densidad poblacional es un factor clave en la dispersión de protistas patógenos en el agua, así como la evaluación de factores de riesgo como son la edad, el acceso a servicios de agua entubada y drenaje. Por lo que se recomienda incluir éstos factores en la evaluación del estado del agua en los SEs.

10. Perspectivas y recomendaciones

El estudio de la calidad del agua en los SEs es un tema multifactorial que utiliza distintos enfoques; por un lado un enfoque para el monitoreo de la salud del ecosistema acuático, que involucra la evaluación de parámetros fisicoquímicos, microorganismos tanto indicadores como patógenos y, por otro lado, un enfoque socio-ambiental que permita entender la dinámica de los cambios que se presentan en estos SEs y que repercuten en la incidencia de patógenos en el ambiente.

La presencia de animales de granja como vacas, borregos, cerdos, caballos, gallinas y patos en los SEs evaluados significa que existe un mayor número huéspedes intermediarios y/o reservorios de diversos parásitos que potencialmente podrían transmitirse al hombre, por lo que la cuantificación de las cargas parasitarias en estos organismos y su aporte en la transmisión de patógenos a través de agua deberían de ser evaluadas en estudios posteriores.

La presencia de infraestructura hidráulica como son las presas, derivaciones del caudal hacia trucheros, acequias para el riego y los sistemas de descargas de desechos humanos (drenaje, lagunas de oxidación y fosas sépticas) pueden ser obras que intervengan en la transmisión, acumulación y dispersión de *C. parvum* y *G. lamblia* en los SEs, por lo que su evaluación podría mejorar el entendimiento de la dinámica de la infección de estas especies en los SEs.

Los métodos moleculares como la PCR son herramientas que debido a su sensibilidad y especificidad, mejorarían el monitoreo de *C. parvum* y *G. lamblia* en agua de los SEs, ya que proporcionan información adicional a la obtenida por IF. Por esta razón se sugiere continuar con la optimización de los ensayos de PCR y la implementación de técnicas de secuenciación en muestras de agua de los SEs.

Un planteamiento integral de la evaluación del agua en los SEs que incorpore el monitoreo de la calidad del agua, incluyendo la dimensión de salud, dentro de lo cual se incluye la detección de patógenos y, una visión holística de los factores socio-ambientales, mejoraría en gran medida los alcances de la investigación en materia de agua, salud y saneamiento, y proporcionaría información complementaria del estado de los SEs.

Bibliografía

- Ahern, M., R.S. Kovats, P. Wilkinson, R. Few y F. Matthies. 2005. Global Health Impacts of Floods: Epidemiologic Evidence. *Epidemiological Reviews*. 27: 36-46.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association y Water Environment Federation. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*. 21st Edition. Editorial Centennial. Baltimore, EUA.
- Appelbee, A.J., L.M. Frederick, T.L. Heitman y M.E. Olson. 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology*. 112: 289–294.
- 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(8): 370-376.
- Avila-Akenberg, V.D. 2002. La vegetación de la Cuenca alta del río Magdalena: un enfoque florístico, fitosociológico y estructural. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Baldursson, S. y P. Karanis. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – an update 2004-2010. *Water Research*. 45: 6603-6614.
- Bastos, R.K.X., B.D. Viana y P.D. Bevilacqua. 2013. Turbidity as a surrogate for *Cryptosporidium* removal by filtration in drinking-water QMRA models. *Water Science and Technology: Water Supply*. 13(5): 1209-1219.
- Bates, S.J., J. Trostle, W.T. Cevallos, A. Hubbard y J.N.S. Eisenberg. 2007. Relating diarrheal disease to social networks and the geographic configuration of communities in rural Ecuador. *American Journal of Epidemiology*. 166(9): 1088-1095.
- Bertrand, I. y J. Schwartzbrod. 2007. Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: relation between assemblages and fecal contamination origin. *Water Research*. 41: 3665-3682.
- Byappanahalli, M.N., D.A. Shively, M.B. Nevers, M.J. Sadowsky y R.L. Whitman. 2003. Growth and survival of *Escherichia coli* and enterococci populations in the macro-alga *Cladophora* (Chlorophyta). *FEMS Microbiology Ecology*. 46: 203-211.
- Cantoral-Uriza, E.A., L. Almeida-Leñero, L. Cifuentes-Blanco, L. Paniagua-León y M.A. Luis-Martínez. 2009. La diversidad de una cuenca en la Ciudad de México. *Ciencias*. 94: 28–33.

- Caro-Borrero, A., J. Carmona-Jiménez, T. González-Martínez, y M. Mazari-Hiriart. 2015. Hydrological evaluation of a peri-urban stream and its impact on ecosystem services potential. *Global Ecology and Conservation*. 3: 628-644.
- Castro-Hermida, J.A., I. García-Presedo, A. Almeida, M. González-Warleta, J.M. Corriera Da Costa y M. Mezo. 2009. Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in surface water: a health risk for humans and animals. *Water Research*. 43: 4133-4142.
- 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, SEMARNAP, México, D.F.
- Ceballos, G. y A. Miranda. 2000. Guía de campo de los mamíferos de la costa de Jalisco, México. Fundación Ecológica de Cuixmala, A.C.-Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología/Instituto de Biología. México, D.F.
- Cifuentes, E., M. Gómez, U. Blumenthal, M.M. Tellez-Rojo, I. Romeiu, 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(3): 388-392.
- Corvalan, C., S. Hales, y A. McMichael (Eds.). 2005. Ecosistemas y bienestar humano: Síntesis sobre salud. Un informe de la Evaluación de los Ecosistemas del Milenio. Organización Mundial de la Salud. Francia. Disponible en: <http://www.who.int/globalchange/ecosystems/ecosystems05/en/>
- Cotler, H., E. Durán y C. Siebe. 2002. Características morfoedafológicas y calidad de sitio de un bosque tropical caducifolio. En: Noguera, F.A., J.H. Vega Rivera, A.N. García-Aldrete y M. Quesada Avendaño (Eds.). *Historia Natural de Chamela*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Editorial Jiménez. México.
- 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(6): 886-888.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 1989. Acuerdo por el que se establecen los Criterios Ecológicos de Calidad de Agua CE-CCA-001/89. 13 de diciembre, 1989. México D.F.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-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.

- Fayer, R., J. Trout y T. Nerad. 1996. Effects of a Wide Range of Temperatures on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 43(5): 64S.
- Fayer, R., U. Morgan y S.J. Upton. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*. 30: 1305–1322.
- Ferrusquía-Villafranca, F. 1998. Geología de México: una sinopsis. En: Ramamoorthy, T.P., R. Bye, A. Lot, J. Fa, (Eds.). *Diversidad Biológica de México. Orígenes y Distribución*. Instituto de Biología, UNAM, México.
- Galeana-Pizaña, J.M., J.A.B. Ordóñez-Díaz y N. Corona-Romero. 2013. Estimación de contenido de carbón en la cuenca del río Magdalena, México. *Madera y Bosques*. 19(1): 53-69.
- Gallopín, G. 1994. Impoverishment and sustainable development. A system approach. International Institute for Sustainable Development Press. Manitoba, Canada.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, UNAM, México.
- García-Oliva, F., A. Camou y J.J. Maass. 2002. El clima de la región central de la costa del Pacífico Mexicano. En: Noguera, F.A., J.H. Vega-Rivera, A.N. García-Aldrete y M. Quesada-Avendaño (Eds.). *Historia Natural de Chamela. Instituto de Biología*. Universidad Nacional Autónoma de México. Editorial Jiménez. México.
- Gerba, C.P. e I.L. Pepper. 2004. Microbial Contaminants. En: Artioloa J.F., I.L. Pepper y M. Brusseau (Eds.). *Environmental Monitoring and Characterization*. Elsevier Academic Press. San Diego, USA.
- Guerrant, R.L., J.M. Hughes, N.L. Lima y J. Crane. 1990. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Reviews of Infectious Diseases*. 12(1): S41-S50.
- Harris, S. A. 2004. A socio-ecological autopsy of the *E. coli* O157:H7 outbreak in Walkerton, Ontario, Canada. *Social Science and Medicine*. 58: 2601–2612.
- Hill, V. R., A.L. Polaczyk, D. Hahn, J. Narayanan, T.L. Cromeans, J.M. Roberts, y J. E. Amburgey. 2005. Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11): 6878-6884.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2008. Conjunto de datos vectoriales. Cartografía Digital. Escala 1:50,000

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2011a. Censo de población y vivienda 2010: Panorama Sociodemográfico del Distrito Federal. Ed. INEGI. Aguascalientes, México.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2011b. Censo de población y vivienda 2010: Panorama Sociodemográfico de Jalisco. Ed. INEGI. Aguascalientes, México.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2013. Conjunto de datos vectoriales. Cartografía Digital. Escala 1:250,000
- Jarrol, E.L., P. Manning, D.G. Lindmark, J.R. Coggings y S.L. Erlandsen. 1989. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamina. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 32: 121-131.
- Jujnovsky, J. 2006. Servicios ecosistémicos relacionados con el recurso agua en la cuenca del río Magdalena, Distrito Federal, México. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jujnovsky, J., L. Almeida-Leñero, M. Bojorge-García, Y.L. Monges, E. Cantoral-Urisa y M. Mazari-Hiriart. 2010. Hydrologic Ecosystem Services: water quality and quantity in the Magdalena River, México City. *Hidrobiológica*. 20(2): 113-126.
- 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. En: Austrian Committee Danube Research/IAD of IAD. *Proceedings 36th International Conference*, Vienna. Pp. 415–421.
- Korich, D.G., J.R. Mead, M.S. Madore, N.A. Sinclair y C.R. Sterling. 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(5): 1423-1428.
- Koudela, B. y J. Vitovec. 1998. Experimental Giardiasis in goat kids. *Veterinary Parasitology*. 74: 9–18.
- Lal, A. 2014. Evaluating the Environmental and Social Determinants of Enteric Disease in New Zealand. Tesis de Doctorado. University of Otago, New Zealand.
- Lanata, C. 2003. Studies of food hygiene and diarrheal disease. *International Journal of Environmental Health Research*. 13: S175-S183.
- Lane, S. y D. Lloyd, 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(2): 123-147.

- LeChevallier, M.W., W.D. Norton y R.G. Lee. 1991. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Surface Water Supplies. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(9): 2610-2616.
- LeChevallier, M.W. y Norton, W.D. 1992. Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity. *Journal of the American Water Works Association*. 84(12): 54–60.
- Ley Federal de Derechos en Materia de Agua (LFDMA). 2012. Ley Federal en Materia de Agua. México.
- 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. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mac Kenzie, R.W., N.J. Hoxie, M.E. Proctor, M.S. Gradus, K.A. Blair, D.E. Peterson, J.J. Kazmierczak, D.G. Addiss, K.R. Fox, J.B. Rose, 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(3): 161-167.
- Mazari-Hiriart, M., G. Pérez-Ortiz, M.T. Orta-Ledesma, R. Solano-Ortiz, M.A. Tapia, M.A. Silva, F. Armas-Vargas, I. Yañez-Noguez, Y. López-Vidal y C. Díaz-Ávalos. 2014. Last chance to rehabilitate an urban river as a water source for Mexico City. *Plos One*. 9(7): 1-17.
- Millenium Ecosystem Assessment (MA). 2005. Synthesis. Island Press, Washington, DC Available online at: <http://www.millenniumassessment.org/>
- Mitschler, R.R., R. Welti y S.J. Upton. 1994. A comparative study of lipid compositions of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) and Madin-Darby bovine kidney cells. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 41(1): 8–12.
- Montes, R.T., I. Navarro, R. Domínguez y B. Jiménez. 2013. Modificación de la capacidad de autodepuración del río Magdalena ante el Cambio Climático. *Tecnologías y Ciencias del Agua*. 4(5): 71-83.
- Moe, C. L. 2007. Waterborne Transmission of Infectious Agents. En: Hurst, C.J; R. L. Crawford, J. L. Garland, D. A. Lipson y A. L. Mills (Eds.). *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press. Washington, D.C., EUA.

- Nichols, R.A., B.M. Campbell y H.V. Smith. 2003. Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in United Kingdom noncarbonated natural mineral waters and drinking waters by using a modified nested PCR-restriction fragment length polymorphism assay. *Applied Environmental Microbiology*. 69(7): 4183-4189.
- Okhuysen, P.C., C.L. Chappell, J.H. Crabb, C.R. Sterling y H.L. Dupont. 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *The Journal of Infectious Diseases*. 180: 1275-81.
- Ostrom, E. 2009. A general framework for analyzing sustainability of social-ecological systems. *Science*. 325: 419-422.
- Pérez-Escobedo, H.M. 2011. Necesidades de información para el manejo de los socio-ecosistemas en la región Chamela-Cuixmala, Jalisco. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Ecosistemas, UNAM, Morelia, México.
- Plutzer, J., P. Karanis, K. Domokos, A. Törökné y K. Márialigeti. 2008. Detection and characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. *International Journal Hygiene Environmental Health*. 211 (5-6): 524-533.
- Plutzer, J., J. Ongerth y P. Karanis. 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal Hygiene Environmental Health*. 213: 321-333.
- Polaczyk, A.L., J. Narayanana, 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.
- Polvorino, D., N.B. Molina, M.C. Minvielle, M.E. Lozano y J.A. Basualdo. 2004. Técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp. *Revista Argentina de Microbiología*. 36: 97-100.
- Programa Universitario de Estudios sobre la Ciudad (PUEC-UNAM). 2008. Plan Maestro de Manejo Integral y Aprovechamiento Sustentable de la Cuenca del Río Magdalena. Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal.
- Programa Universitario de Medio Ambiente (PUMA-UNAM). 2009. Sistema de indicadores para el rescate de los ríos Magdalena y Eslava. Informe Técnico de la Universidad Nacional Autónoma de México a la Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal. http://www.sma.df.gob.mx/sma/links/download/biblioteca/diagnostico_integral.pdf.

- Prüss-Üstün, A., D. Kay, L. Fewtrell y J. Bartram. 2004. Unsafe water, sanitation and hygiene. En: Ezzati, M., A.D. Lopez, A. Rodgers y C.J.L. Murray (Eds.). Comparative quantification of health risks global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. Volume 2. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Prüss-Üstün, A., y C. Corvalan. 2006. Preventing Disease through Healthy Environments: Towards an Estimate of the Environmental Burden of Disease. World Health Organization Press, Francia.
- Rangel-Martínez, C. 2010. Identificación de *Blastocytis hominis* en muestras de agua obtenidas de Ciudad Universitaria en la Ciudad de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Simón Bolívar. México D.F.
- Rangel-Martínez, C., D.E. Jiménez-González, J. Martínez-Ocaña, M. Romero-Valdovinos, G. Castillo-Rojas, A.C. Espinosa-García, Y. López-Vidal, M. Mazari-Hiriart y P. Maravilla. 2014. Identification of opportunistic parasites and helminth ova in concentrated water samples using a hollow-fibre ultrafiltration system. *Urban Water Journal*. 12(5): 440-444.
- Rendtorff, R.C. y C.J. Holt. 1954. The experimental transmission on human intestinal protozoan parasites. IV. Attempts to transmit *Entamoeba coli* and *Giardia lamblia* cysts by water. *American Journal of Epidemiology*. 60(3): 327-338
- Rendtorff, R.C. 1979. The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteer subjects. En: Jakubowski, W. y J.C. Hoff (Eds.). Waterborne Transmission of Giardiasis. Report No. EPA-600/9-79-001. U.S. Environmental Protection Agency; Environmental Research Centre, Cincinnati.
- Rose, J.B. y T.R. Slifko. 1999. *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Cyclospora* and their impact on foods: a review. *Journal of Food Protection*. 62(9): 1059-1070.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y Tom Maniatis (Eds.). 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2da. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Slapeta, J. 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty colour rainbow? *International Journal for Parasitology*. 43: 957-970.
- Slifko, T., H. Smith y J. Rose, 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*. 30: 1379-1393.
- Smith, H. V. y J. B. Rose. 1990. Waterborne Cryptosporidiosis. *Parasitology Today*. 6(1): 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(4): 160-167.
- Snel, S. J., M.G. Baker, V. Kamalesh, N. French y J. Learmonth. 2009. A tale of two parasites: the comparative epidemiology of cryptosporidiosis and giardiasis. *Epidemiology and Infection*. 137: 1641-1650.
- Solórzano-Murillo, L.S. 2008. Percepciones sobre servicios ecosistémicos relacionados con el agua en comunidades rurales de la cuenca del río Cuitzmala, Jalisco. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones en Ecosistemas. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Stibbs, H. y J. Ongerth, 1986. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocyst in fecal smears. *Journal of Clinical Microbiology*. 24(4): 517-521.
- Tapia-Palacios, M.A. 2012. Detección de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en agua del río Cuitzmala, Jalisco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Tryland, I., L. Robertson, A.G.B. Blankenberg, M. Lindholm, T. Rohrlack y H. Liltved. 2011. Impact of rainfall on microbial contamination of surface water. *International Journal of Climate Change Strategies and Management*. 3(4): 361-373.
- United States Environmental Protection Agency. 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by Filtration/IMS/FA. U.S. EPA, Cincinnati, Ohio.
- Xiao, L., A. Singh, J. Limor, T.K. Graczyk, S. Gradus, y A. Lal. 2001. Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(3): 1097-1101.
- Xiao, G., Z. Qiu, J. Qi, J. Chen, F. Liu, W. Liu, J. Luo y W. Shu. 2013. Occurrence and potential health risk of *Cryptosporidium* and *Giardia* in the Three Gorges Reservoir, China. *Water Research*. 47: 2431-2445.

- 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). Noviembre, 2015. Consulta en línea <http://www.who.int>.
- World Bank. 2008. Poverty and the Environment: Understanding Linkages at the Household Level. World Bank Press. Washington, DC. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/nutricion/ref8.pdf>
- World Wild Foundation (WWF). 2000. Terrestrial ecoregions of the world. WWF, Washington D.C., EUA.