



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LOS GÉNEROS BACTERIANOS *Escherichia* Y
Pseudomonas COMO INDICADORES DE LA CALIDAD DEL AGUA
RESIDUAL TRATADA EN UNA DEPURADORA**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:

MARTÍNEZ HERNÁNDEZ SYLVIA

DIRECTOR:
M. EN C. CLAUDIA CORONEL OLIVARES

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

2006

ÍNDICE

Índice de cuadros y figuras	3
Resumen	4
1. Introducción	5
1.1 El agua como recurso	5
1.1.1 Distribución del agua a nivel mundial	5
1.1.2 Distribución del agua en México	6
1.1.3 Distribución del agua en el Estado de Hidalgo	7
1.2 Usos y tratamientos	8
1.2.1 Definición de planta de tratamiento y su funcionamiento	10
1.2.2 Plantas de tratamiento en México y el Estado de Hidalgo	12
1.2.3 Planta de tratamiento del I. T. E. S. M., campus Hidalgo	15
1.3 Calidad del agua: parámetros físicos, químicos y biológicos	18
1.3.1 Indicadores	21
1.4 Especies de microorganismos presentes en el agua	23
1.4.1 Bacterias	26
1.4.2 Clasificación de <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	27
1.4.3 El género <i>Escherichia</i>	28
1.4.4 El género <i>Pseudomonas</i>	30
1.4.5 Reportes epidemiológicos de <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	33
2 Justificación	37
3 Objetivos	38
4 Metodología	39
4.1 Muestreo	39

4.2 Diluciones	41
4.3 Conteo de colonias	42
4.4 Filtración por membrana	43
4.5 Medios de cultivo selectivos	43
4.6 Pruebas bioquímicas	45
4.6.1 IMViC utilizada para la identificación de <i>Escherichia</i>	46
4.6.2 Oxidación Fermentación	48
4.6.3 Hidrólisis de gelatina	49
4.6.4 Prueba de catalasa	50
4.7 Pruebas de resistencia de los microorganismos de interés al hipoclorito de sodio	51
5 Resultados	53
6 Discusión	67
7 Conclusiones	71
8 Perspectivas	72
9 Referencias bibliográficas	73
10 Anexo. Composición química de agares y soluciones.	79
11 Glosario	83
12 Abreviaturas	85
13 Organigrama	86

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURAS		Pág.
1	Ciclo del agua	5
2	Cuencas hidrológicas de Hidalgo	7
3	Principales procesos de tratamiento de las AR	13
4	Esquema de la planta depuradora de aguas residuales del I.T.E.S.M. campus Hidalgo	16
5	Filtro verde	17
6	Micrografía electrónica de <i>E. coli</i>	28
7	Micrografía electrónica de <i>P. aeruginosa</i>	31
8	Aislamiento de microorganismos por el método de dilución	41
9	Descripción de los pasos de la prueba de desinfección con hipoclorito de sodio al 11%.	52
10	Promedio de crecimiento de UFC de <i>E. coli</i> al ser analizadas con las pruebas bioquímicas	62
11	Promedio de crecimiento de UFC de <i>P. aeruginosa</i> al ser analizadas con las pruebas bioquímicas	63
12	Resistencia de microorganismos aislados del género <i>Escherichia</i> a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio	65
13	Resistencia de microorganismos aislados del género <i>Pseudomonas</i> a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio	66
CUADROS		
I	Disponibilidad de las aguas subterráneas en México	6
II	Usos consuntivos del agua en México	8
III	Cifras de la CNA (2005) en México, referentes a las descargas de agua residual según su procedencia al año 2003	10
IV	Depuradoras de ART en el Estado de Hidalgo	14
V	Límites máximos permisibles para contaminantes básicos en las descargas de aguas residuales	18
VI	Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros en las descargas de aguas residuales	19
VII	Contaminantes considerados por la NOM-003 (aceites, DBO ₅ , grasas y sólidos suspendidos totales, microorganismos, quistes y huevos de parásitos)	21
VIII	Patógenos transmitidos por el agua	24
IX	Algunos mecanismos de transmisión y la enfermedad que ocasionan	25
X	Clasificación de <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	27
XI	Causas de mortalidad específicas contra cuadros infecciosos diarreicos.	34
XII	Casos de enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo.	36
XIII	Reacciones de <i>E. coli</i> teóricas, esperadas para la confirmación en las pruebas bioquímicas	48
XIV	Reacciones de <i>P. aeruginosa</i> teóricas, esperadas para la confirmación en las pruebas bioquímicas	50
XV	Características fisicoquímicas del agua obtenidas en el muestreo	53
XVI	Número total de UFC	55
XVII	Número promedio de UFC que crecieron en agar cuenta estándar	56
XVIII	Colonias presuntivas de <i>Escherichia</i> y <i>Pseudomonas</i> por el método de filtración por membrana	58
XIX	Pruebas bioquímicas	61
XX	Valores estadísticos obtenidos para las UFC de <i>E. coli</i>	64
XXI	Valores estadísticos obtenidos para las UFC de <i>P. aeruginosa</i>	64

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la calidad del agua residual tratada de la depuradora del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores Monterrey (I.T.E.S.M.), campus Hidalgo, utilizando como bioindicadores de la calidad del agua a microorganismos de los géneros bacterianos *Escherichia* y *Pseudomonas*. El estudio se realizó en dos fases del año (lluvia y sequía) comprendiendo 20 muestreos, realizados en tres sitios diferentes de la depuradora (afluente, efluente y tanque secundario sin clorar) con la finalidad de analizar la carga biológica del agua residual antes del tratamiento, posterior a este y sin el efecto del desinfectante. En cada uno de los muestreos se tomaron medidas *in situ* de temperatura y pH. El análisis microbiológico de cada muestra de agua se realizó en los laboratorios de docencia de la Licenciatura en Biología y el laboratorio de Ciencias Ambientales del Centro de Investigaciones Químicas. Consistió en realizar diluciones decimales seriadas, cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) en agar cuenta estándar, filtración por membrana usando agar MaConkey para el género *Escherichia* y agar AP para *Pseudomonas*. Finalmente, se realizaron pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *E. coli* usando IMViC y para *P. aeruginosa* oxidación fermentación (OF), catalasa y gelatinasa. El agua residual tratada por la técnica de lodos activados que realiza la planta depuradora contenía UFC tanto de *E. coli* como de *P. aeruginosa*. Adicionalmente, para conocer los efectos del desinfectante sobre los microorganismos bajo estudio, se realizaron pruebas con hipoclorito de sodio en el agua residual. Se encontró que los organismos pertenecientes al género *Pseudomonas* son más resistentes al desinfectante que los correspondientes al género *Escherichia*.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El agua como recurso

El ciclo del agua inicia cuando el vapor de la atmósfera se condensa para luego precipitarse como nieve o lluvia. Cuando llega al suelo una pequeña parte queda estancada, lo que se le llama almacenamiento superficial; otra porción se acumula en los ríos y arroyos por escorrentía superficial, el resto se infiltra en la tierra. El camino que sigue esta porción de agua puede ser utilizada por los seres vivos, evaporarse o penetrar más y formar los mantos freáticos que aflorarán en manantiales como se ilustra en la figura 1.

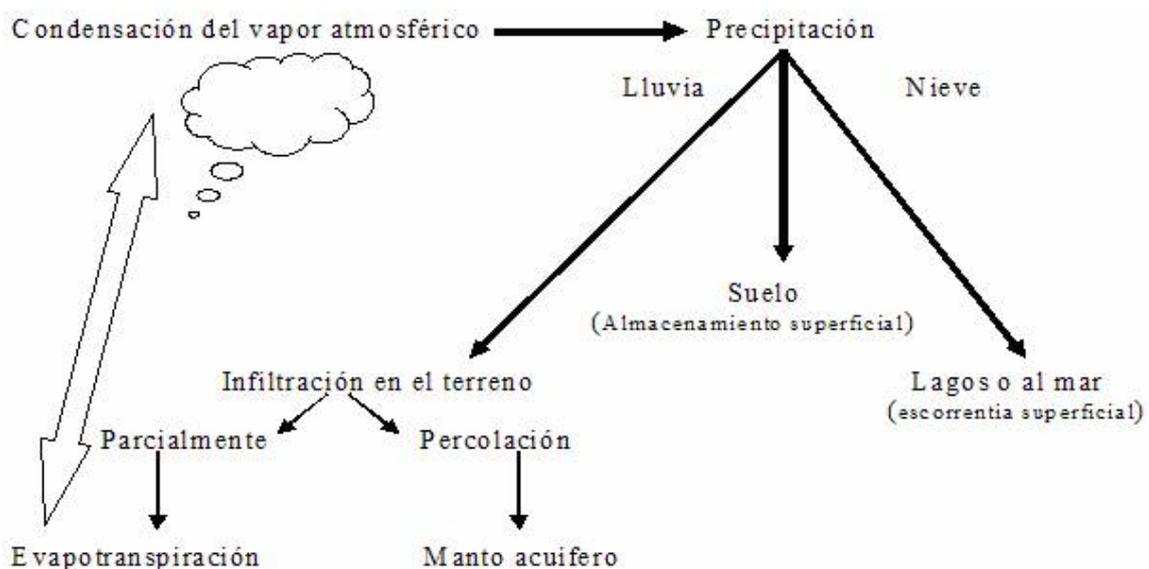


Figura 1. Ciclo del agua. Modificado de Pérez y colaboradores (1999).

1.1.1 Distribución del agua a nivel mundial

El agua se distribuye en océanos y aguas terrestres (forma líquida), hielos y nieve (forma sólida) y atmósfera (forma gaseosa). Se sabe que del total de agua sólo un 0.5 % está disponible para consumo, mientras que el 97.6 % está repartida en los océanos y el 1.9 % corresponde a los casquetes polares y glaciares (Pérez y

colaboradores, 1999). Los factores socioeconómicos y climatológicos influyen sobre la cantidad de agua que es consumida por la población humana. De tal manera que, la demanda de agua potable está en continuo aumento a nivel mundial, lo que ha llevado a que exista una presión sobre el recurso hídrico en el planeta (CNA, 2003). En la actualidad una gran parte del agua dulce es destinada para el abastecimiento humano, lo cual se debe a que es un elemento indispensable para la vida.

1.1.2 Distribución del agua en México

En México el manejo del recurso hídrico se encuentra a cargo de la Comisión Nacional del Agua (CNA) que es un organismo público descentralizado, que a su vez forman parte de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

En la región norte y centro del país se da la mayor escasez del líquido mientras que en el sur es abundante. Del total de la lluvia el 73 % se evapora, el resto sufre una esorrentía superficial anual media de 410 km³ en comparación con 53 km³ de la recarga natural. Se presupone una disponibilidad de recurso de 4900 m³/hab/año (CNA, 2000a).

Cuadro I. Disponibilidad de las aguas subterráneas en México. Según la CNA (2000a).

Agua subterránea	No. de acuíferos	Recarga natural km ³ /año	Recarga total km ³ /año	Suministro total %	Suministro agrícola %	Extracción %	Acuíferos sobreexplotados
	653	53	68	70	57	53	100

Por otro lado, la CNA reporta para México que sólo se almacenan 150 km³, que a su vez son distribuidos en diferentes volúmenes por actividad (CNA, 2000a).

1.1.3 Distribución del agua en el Estado de Hidalgo

En el país existen 13 regiones administrativas, que a su vez se dividen en 37 regiones hidrológicas. Hidalgo pertenece en un 56 % a la región IX (Golfo norte), en un 39 % a la región XIII (Valle de México) y en un 5% a la región X (Golfo Centro) (CNA, 2003). En Hidalgo existen cuatro cuencas hidrológicas (R. Moctezuma, R. Tecolutla, R. Cazonas y R. Tuxpan) que abarcan las regiones de Pánuco y Tuxpan-Nautla comprendiendo el 100 % de la superficie del estado, como se muestra en la figura 2 (INEGI, 2006).



Fig. 2. Cuencas hidrológicas de Hidalgo.

En el Estado de Hidalgo el órgano encargado de la gestión del agua potable es la Comisión de Agua y Alcantarillado de Sistemas Intermunicipales (CAASIM).

1.2 Usos y tratamientos

Cuando se destina este recurso para satisfacer necesidades de consumo agrícola e industrial se deben tener en cuenta ciertos requerimientos para que este sea de calidad (Pérez y colaboradores, 1999).

En México los usos del agua se dividen en dos tipos (CNA, 2005):

- Consuntivo (cuadro II). Cuando el agua se transporta del lugar de origen al sitio donde será usada y por lo general no regresa al cuerpo de origen.
- No consuntivo. El uso del agua se realiza en el mismo cuerpo de origen.

En México durante el año 2000 el porcentaje de agua destinada al abastecimiento público era de 17 % y para el 2004 se redujo a un 14 % (CNA, 2000a y CNA, 2005).

Cuadro II. Usos consuntivos del agua en México. Volúmenes de agua concesionados para usos fuera del cuerpo de agua, de acuerdo a las cifras acumuladas a diciembre de 2004 (km³ anuales). Tomado de CNA (2005).

Uso	Origen km ³		Volumen total km ³ /año	Porcentaje de extracción
	Superficial	Subterráneo		
Agropecuario ^{a*}	38.7	18.7	57.4	76
Abastecimiento público ^b (incluye industria conectada a la red)	3.9	6.8	10.7	14
Industria autoabastecida ^c (incluye termoeléctricas)	5.6	1.7	7.3	10
Total nacional	48.2	27.2	75.4	100

Notas: * En el uso agropecuario se incluyen volúmenes de agua que se encuentran en proceso de regularización. ^a Incluye los usos agrícola, pecuario, acuicultura, múltiples y otros. ^b Incluye los usos público urbano y doméstico. ^c Incluye los usos industria autoabastecida, agroindustria, servicios, comercio y termoeléctricas.

Las aguas residuales tratadas se pueden destinar a las actividades donde no se requiera agua potable, por ejemplo, en la agricultura, permitiendo así el riego de ciertos cultivos tales como maíz, frijol, alfalfa, ajonjolí, cebada y algodón, en el riego de áreas verdes y en el llenado de lagos recreativos. En México se reutiliza esta agua en un volumen aproximado de 2.9 km³/año. De este total el mayor porcentaje se ocupa en agricultura (82.8 %), uso público (7.23 %) y el industrial con un 9.89 % (CNA, 2000a). Un ejemplo importante del reuso del agua residual generada por la Ciudad de México se da en el Valle del Mezquital, donde 45,000 familias siembran anualmente 70,000 ha con maíz, trigo, alfalfa y otros forrajes. La forma en que se realiza es mediante un caudal de 70 m³/s que llega al Valle del Mezquital (CNA, 2000a).

Las aguas de origen residuales o domésticos contienen partículas de diversos tamaños y sustancias solubles o coloidales las cuales no son eliminadas por filtración o sedimentación. En esta agua, las sustancias sólidas llevan carbohidratos, grasas, proteínas y microorganismos, donde la mayoría son bacterias intestinales como *E. coli*. En el caso de las aguas residuales industriales su carga dependerá del ramo de la industria de que provengan pero se ha encontrado que pueden contener sustancias y residuos peligrosos (Carpenter, 1969).

Cuadro III. Cifras de la CNA (2005) en México, referentes a las descargas de agua residual según su procedencia al año 2003 son:

	Centros urbanos (descargas municipales)	Industriales
Aguas residuales	8.04 km ³ /año (255 m ³ /s)	8.14 km ³ /año (258 m ³ /s)
Se recolectan en alcantarillado	6.41 km ³ /año (203 m ³ /s)	NE
Se generan	2.17 millones de toneladas de DBO ₅ al año	9.5 millones de toneladas de DBO ₅ al año
Se recolectan en alcantarillado	1.73 millones de toneladas de DBO ₅ al año	NE
Se remueven en los sistemas de tratamiento	0.51 millones de toneladas de DBO ₅ al año	1.01 millones de toneladas de DBO ₅ al año

NE= no especificado. DBO₅ = demanda bioquímica de oxígeno.

1.2.1 Definición de planta de tratamiento y su funcionamiento

Una planta de tratamiento de aguas residuales, también denominada depuradora, es un sistema de ingeniería ambiental que modifica las características de contaminación fisicoquímica y biológica de las aguas residuales, según criterios y parámetros de calidad establecidos por la NOM-003-SEMARNAT-1997 (Pág. 19 y 21).

Existen diversos sistemas de tratamiento que se aplican para recuperar biológicamente las aguas residuales. Los más conocidos por ser efectivos en la remoción de contaminantes y de fácil aplicación son: el sistema de lagunas de estabilización u oxidación, donde se biodegradan las aguas de manera natural y el sistema de lodos activados, donde se desinfectan las aguas con ayuda de microorganismos (CNA, 2000b).

Los procesos o métodos de tratamiento que se emplean, se designan; primario si el tratamiento solo es físico, secundario si el tratamiento es biológico y terciario si se da un tratamiento químico.

Básicamente los procesos de depuración de una planta son los siguientes:

1. Desbaste. Separa las impurezas flotantes como plásticos y botes, mediante un sistema de rejillas y tamices.
2. Desarenado y desengrasado. Los sólidos como arenas, limos y arcillas que lleva el agua residual son separados, usando depósitos en los cuales se disminuye la velocidad del agua y se aumenta el tamaño del caudal para que por su peso se depositen en el fondo. Las grasas se retiran sobre la superficie a través de una rasqueta.
3. Decantación primaria. Se eliminan sólidos sedimentables.
4. Depuración biológica.
 - a) Convencional (lodos activados). El agua residual es sometida por un periodo a la inyección de aire (procesos biológicos aerobios), los microorganismos degradan la materia orgánica.
 - b) Lechos bacterianos. Ocurre mediante la oxidación que se produce al hacer circular aire través de un medio poroso junto al agua residual. La materia orgánica es degradada en una película biológica compuesta de microorganismos (Hernández, 2001).
5. Desinfección. Se destruyen o inactivan microorganismos patógenos del agua, existen tres formas de desinfección:

- a) Mecánica. Se usan filtros de materiales diversos, en la actualidad el más eficaz es de membranas celulósicas ya que el tamaño del poro es controlado. Como mencionan Pérez y colaboradores (1999).
- b) Física. Aquí se encuentra la forma más antigua de desinfección, el calor (ebullición del agua), también se usa la energía ultrasónica mayor a 400 Kc/seg. y la radiación ultravioleta UV, al ser la de menor longitud de onda del espectro contiene una alta energía que le da el poder germicida.
- c) Química. Es la más usada ya que la mayoría de los compuestos químicos destruyen a los microorganismos patógenos, tienen un tiempo de desinfección corto, son inocuos para los humanos, fáciles de manipular y almacenar, son de detección sencilla en el agua y baratos. Algunos desinfectantes químicos son cloro, ácido hipocloroso, ión hipoclorito, bromo, yodo y ozono (Pérez y colaboradores, 1999).

1.2.2 Plantas de tratamiento en México y el Estado de Hidalgo

En el país según el inventario nacional de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) existen 1,579 plantas en operación. En la figura 3 se muestran los principales procesos de tratamiento de aguas residuales municipales de las que hay 1,182 en operación (CNA, 2003 y CNA 2005).

Los principales procesos de tratamiento de aguas residuales municipales son:

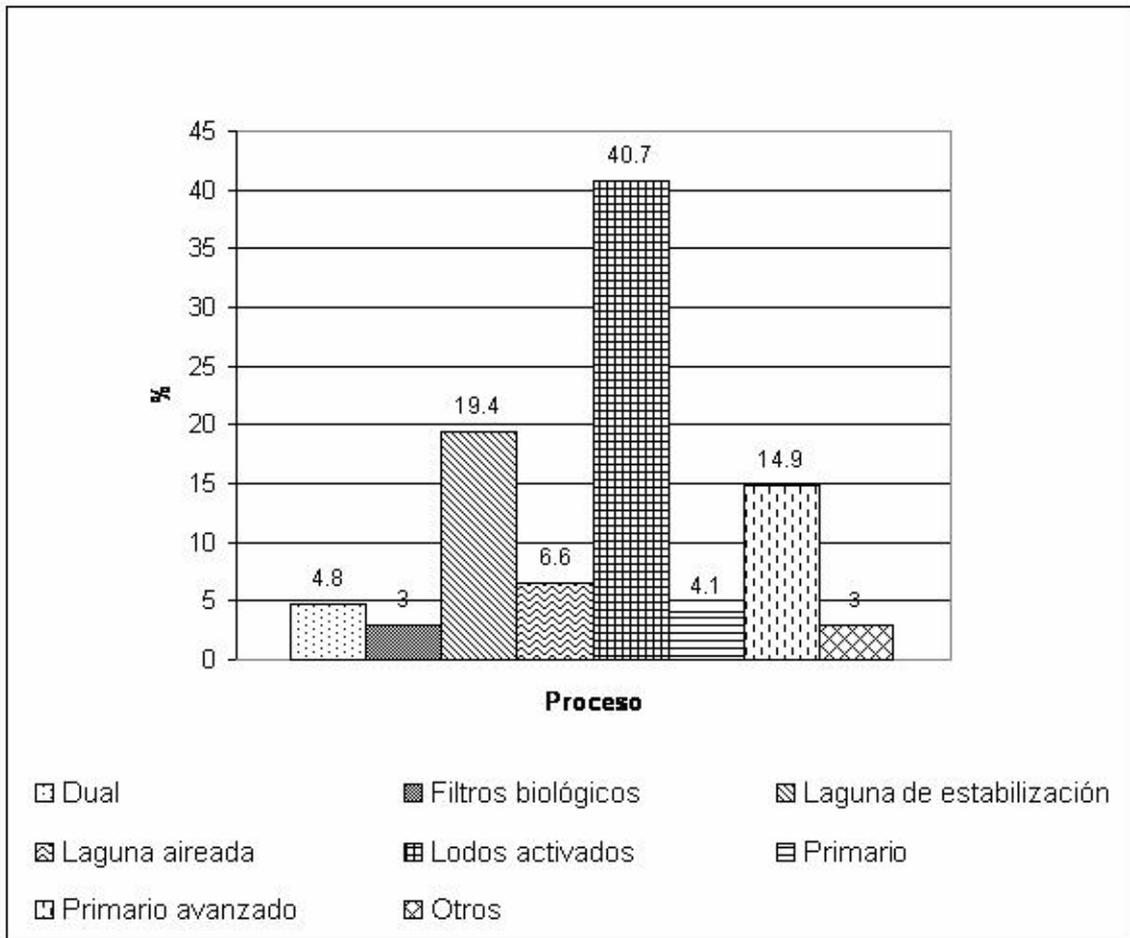


Figura 3. Principales procesos de tratamiento de las AR. Tomado de la CNA (2003 y CNA 2005).

En el Estado de Hidalgo hay 44 plantas, de las cuales sólo están en operación 41. El cuadro IV muestra algunas plantas de tratamiento de aguas residuales municipales en Hidalgo, así como el proceso que realizan y el reuso que se le da al agua tratada (CNA gerencia estatal de Hidalgo, 2000; CNA, 2003 y CNA 2005).

Cuadro IV. Depuradoras de ART en el Estado de Hidalgo. Tomado de CNA gerencia estatal de Hidalgo (2000).

Municipio	Localidad	Proceso	Calidad del agua		Cuerpo receptor o reuso
			Coliformes fecales NMP/100ml	Huevos de helminto org/l	
Actopan	Actopan	Biodiscos	1,91E+19	ND	Río Chicavasco
Calnali	Papatlata	Primario	ND	ND	Río Atempa
Epazoyucan	Xochihuacan	Tanque séptico	ND	ND	Riego agrícola
Lolotla	Ayotetla	Tanque IMHOFF	ND	ND	Arroyo Tlaltepingo
Mineral del Monte	Mineral del Monte	Wetland	ND	ND	Arroyo el Manzano
Pachuca de Soto	San Antonio el Desmonte	Rafa y Tanque séptico	ND	ND	Riego agrícola y Río de las Avenidas
Tulancingo	Napateco	Anaerobio	ND	ND	Río Tulancingo
	Sta. María Asunción	Reactor enzimático	ND	ND	Río Tulancingo
Valle de Tezontepec	Col. Guadalupe	Tanque séptico	ND	ND	Riego agrícola
	Valle de Tezontepec	Laguna de estabilización	ND	ND	Río de las avenidas

ND = no determinado.

1.2.3 Planta de tratamiento del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, campus Hidalgo

Es una planta biológica que sigue el proceso de lodos activados por aireación extendida. Sus elementos básicos son: cárcamo de llegada, reactor biológico, sedimentador secundario, sistema de desinfección, filtro verde, estanque para peces y lecho de secado de lodos (figura 4). Su flujo máximo es de 2.5 l/s (actualmente se maneja un caudal promedio de 1.5 l/s), el reactor biológico tiene una capacidad de 136 m³.

Su porcentaje de remoción es entre el 90-95 % en carga orgánica (DBO₅, DQO), sólidos suspendidos y turbidez. En la remoción de nutrimentos (P y N) el porcentaje es bajo, del orden de 30-60 % (Engel *et al.*, 2002).

Durante los diez meses de muestreo en la planta depuradora, se obtuvieron los siguientes valores promedio, que fueron analizados por el personal de la misma (Engel *et al.*, 2002):

Producción total de agua (10 meses): 27 059 m³

Gasto promedio: 1.04 l/seg.

DBO agua de entrada: 528.18 mg/l

DBO agua de salida: 20.18 mg/l

DQO agua de entrada: 909.2 mg/l

DQO agua de salida: 52.2 mg/l

SS agua de entrada: 380 mg/l

SS agua de salida: 7.87 mg/l

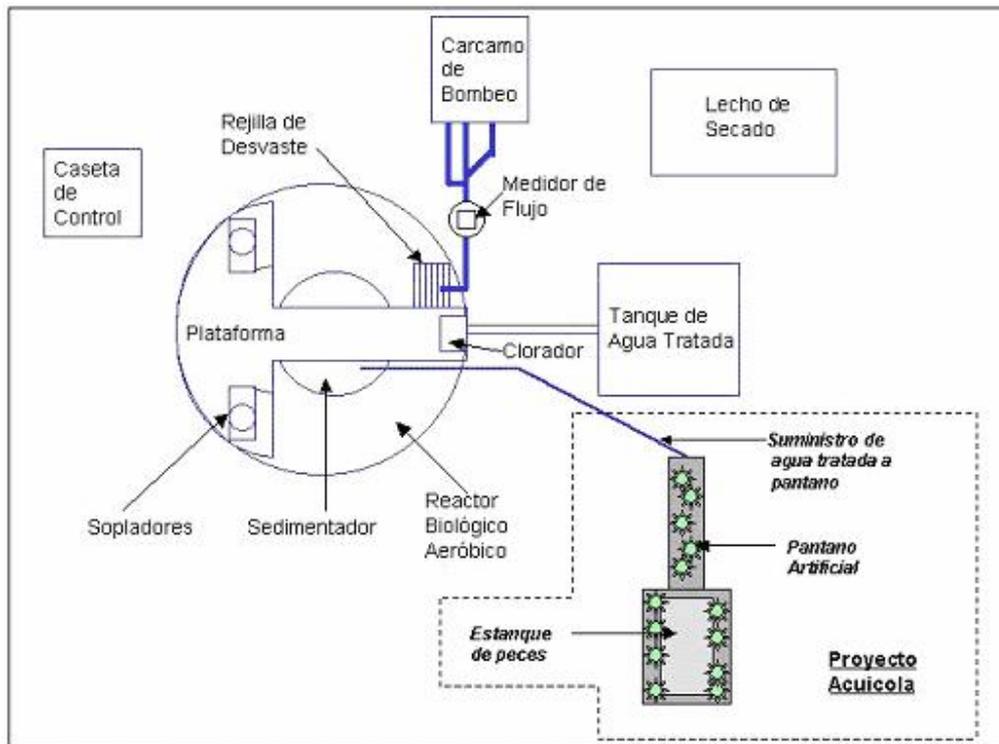


Figura 4. Esquema de la planta depuradora de aguas residuales del I.T.E.S.M. campus Hidalgo. Tomado de Engel y colaboradores (2002).

Para el tratamiento terciario se emplea hipoclorito de sodio como desinfectante, garantizando un residual de 5 ppm del desinfectante en el ART (Engel *et al.*, 2002).

En la zona del filtro verde se sembraron espadañas (*Thypha sp.*), juncos (*Phragmites australis*) o carrizos (*Scyrpus sp.*), como se ilustra en la figura 5. La función de sembrar plantas es que éstas degraden la materia orgánica que aún haya en el agua residual tratada (Engel *et al.*, 2002).

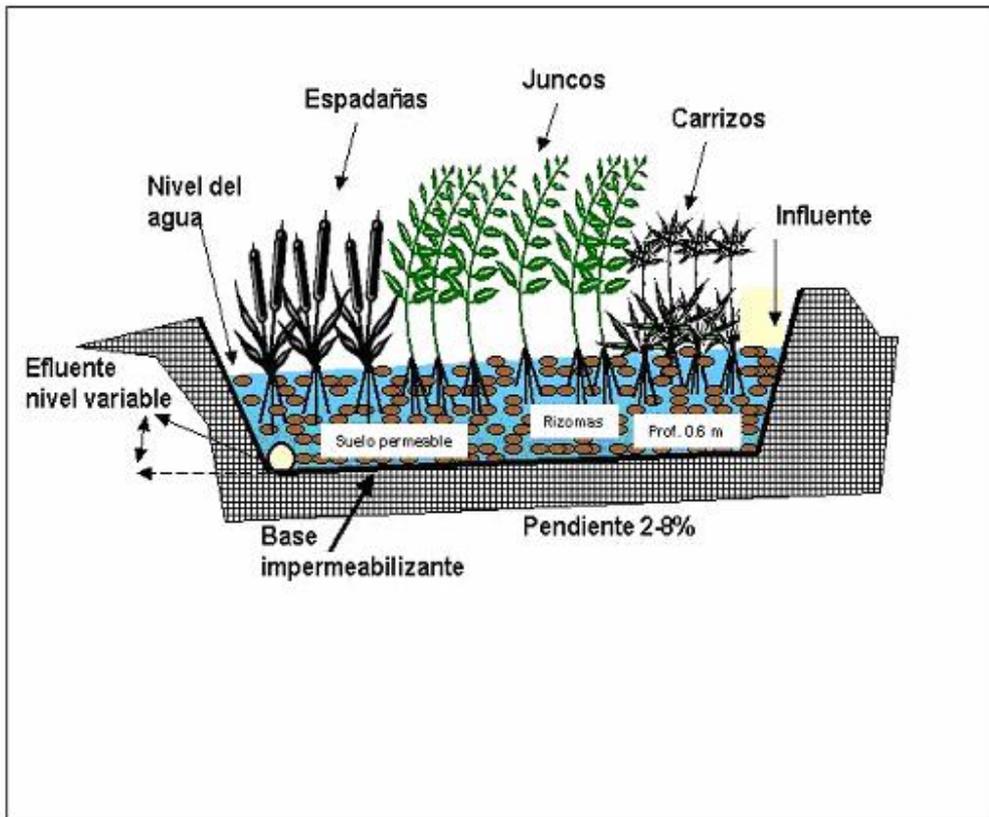


Figura 5. Filtro verde con espadañas, juncos y carrizos, usado en la PTAR del I.T.E.S.M., campus Hidalgo Tomado de Engel y colaboradores (2002).

1.3 Calidad del agua: parámetros físicos, químicos y biológicos

Para conocer la calidad de un agua determinada se deben tomar en cuenta tres factores: lo que contiene, en qué cantidad y el uso que se le dará (e. g., consumo humano o riego). Así, la calidad del agua estará dada por distintos criterios como pueden ser parámetros fisicoquímicos o biológicos (Poch, 1999)

Los parámetros físicos, químicos y biológicos para que el agua pueda considerarse de calidad están establecidos en la Norma Oficial Mexicana -001-SEMARNAT-1996.

Cuadro V. Límites máximos permisibles para contaminantes básicos en las descargas de aguas residuales (promedio diario). Modificado de NOM-001-SEMARNAT-1996.

Parámetros*	Ríos		Embalses	
	Uso agrícola	Uso público urbano	Uso agrícola	Uso público urbano
Temperatura ° C	N. A.	40	40	40
Grasas y aceites	25	25	25	25
Materia flotante	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Sólidos sedimentables ml/l	2	2	2	2
SST	200	125	125	60
DBO ₅	200	150	150	60
Nitrógeno total	60	60	60	25
Fósforo total	30	30	30	10

*= mg / l excepto cuando se especifique, SST= sólidos totales, DBO₅ = demanda bioquímica de oxígeno.

Cuadro VI. Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros en las descargas de aguas residuales. Modificado de NOM-001-SEMARNAT-1996.

Parámetros (*) (miligramos/litro) mg/l	Ríos		Embalses	
	Uso agrícola	Uso público urbano	Uso agrícola	Uso público urbano
Arsénico	0.4	0.2	0.4	0.2
Cadmio	0.4	0.2	0.4	0.2
Cianuros	3	2	3	2
Cobre	6	6	6	6
Cromo	1.5	1	1.5	1
Mercurio	0.02	0.01	0.02	0.01
Níquel	4	4	4	4
Plomo	1	0.4	1	0.4
Zinc	20	20	20	20

(*) Medidos de manera total.

Según la CNA (2000a) en México los principales contaminantes del agua son los coliformes fecales, grasas, aceites, ortofosfatos, sólidos disueltos y detergentes.

En México la norma oficial que tiene carácter de obligatoria para las entidades públicas responsables del tratamiento y reuso de las aguas residuales tratadas es la que se refiere a la NOM-003-SEMARNAT-1997, que tiene como objetivo establecer los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público, para proteger el medio ambiente y la salud de la población (NOM, 1997).

Para efectos de esta norma, el reuso del agua residual tratada puede ser destinado a:

1) servicios de contacto directo con el público mediante actividades donde los usuarios estén en contacto físico o expuestos directamente como en el caso de llenado de lagos, canales artificiales recreativos con paseos en lancha, remo, esquí y canotaje; lavado de vehículos, riego de parques y también jardines y fuentes de ornato.

2) servicios de contacto indirecto u ocasional con el público (en donde la exposición es indirecta o en contacto físico incidental) y de acceso restringido, por personal de vigilancia o barreras físicas. Destaca el riego de jardines y camellones en autopistas, fuentes de ornato, camellones en avenidas, lagos artificiales no recreativos, campos de golf, barreras hidráulicas de seguridad, abastecimiento de hidrantes de sistemas contra incendios y panteones (NOM-003-SEMARNAT-1997).

Cuadro VII. Contaminantes considerados por la NOM-003-1997, que abarca únicamente aquellos que se pueden estabilizar o remover usando procesos convencionales (aceites, DBO₅, grasas y sólidos suspendidos totales), así como los contaminantes patógenos y parasitarios (microorganismos, quistes y huevos de parásitos) que significan un riesgo de salud humana, así como, a la flora y fauna (NOM-003-SEMARNAT-1997).

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE CONTAMINANTES					
Tipo de reuso	Promedio mensual				
	Coliformes fecales NMP/100 ml	Huevos de Helminto (h/l)	Grasas y aceites mg / l	DBO ₅ mg / l	SST mg / l
Servicios al público con contacto directo	240	≤ 1	15	20	20
Servicios al público con contacto indirecto u ocasional.	1,000	≤ 5	15	30	30

NMP: número más probable por cada 100 ml, h / l: huevos por litro, DBO₅= demanda bioquímica de oxígeno y SST = sólidos suspendidos totales.

1.3.1 Indicadores

Debido a que la cantidad de microorganismos patógenos y no patógenos presentes en el agua es muy elevada, determinar su calidad biológica identificando y cuantificando a cada uno, sería un proceso lento y de alto costo. Por ello, en su lugar se usan indicadores biológicos (RIPDA, 2004). Por que los organismos vivos son susceptibles a cambios físicos y químicos ocasionados por

el hombre o la propia naturaleza. Cuando ocurre una perturbación o cambio en las condiciones ambientales, los organismos se ven afectados en cantidad y distribución, lo que permite medir la calidad del agua por la presencia o ausencia de bioindicadores específicos. Para los análisis de calidad ambiental se pueden usar los organismos de una especie dada o que representen a un grupo taxonómico superior. La información que proporciona un indicador biológico no sustituye a los parámetros físicos y químicos al momento de definir la calidad del agua (de la Lanza, 2000).

No todas las especies de microorganismos sirven para un programa de muestreo, es por eso que se deben definir las características del indicador para los propósitos determinados. Algunos de los criterios para la selección del indicador son: a) contar con relevancia biológica y social, que sea sensible a estresores, aplicable a muchos estresores y lugares y b) contar con un diagnóstico de cómo responde a un estresor específico que pueda ser el causante del problema (de la Lanza, 2000).

Las características que deben reunir los microorganismos para que puedan tomarse como indicadores ideales para evaluar la contaminación fecal son:

- Encontrarse de manera abundante en la materia fecal.
- Responder a las condiciones naturales ambientales y a los procesos de tratamiento, de un modo similar a los patógenos de interés.
- Detectarse y cuantificarse fácilmente por métodos sencillos y baratos de laboratorio con resultados precisos.
- Tener una relación elevada de indicador/patógeno.
- No ser patógeno.

- Encontrarse en gran número en las heces de los humanos y los animales de sangre caliente.
- Capaz de presentarse en todos los tipos de agua.
- Encontrarse en agua potable y agua contaminada aún cuando no haya organismos patógenos.
- Ser habitantes normales de la biota intestinal de individuos sanos.
- Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de los organismos patógenos (su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal).

Debe aclararse que, hasta la fecha no se ha detectado ningún tipo de microorganismo indicador que responda simultáneamente a todos los criterios para cuantificar la contaminación fecal del agua (Fawell, 1995; Poch, 1999; Cohn, *et al.*, 2002; Nigel, 2003 y RIPDA, 2004).

1.4 Especies de microorganismos presentes en el agua

En el agua están presentes una gran cantidad de microorganismos de muchas especies. Por una parte se encuentran los autóctonos, es decir, aquellos que están de forma constante en las aguas y que en ningún caso causan enfermedades en el hombre y los alóctonos que son transportados por las aguas residuales urbanas y son patógenos para el hombre. La mayoría de estos microorganismos provienen de las heces humanas, contaminando el agua e infectando posteriormente a nuevos hospederos (Ingraham *et al.*, 1998).

Algunas de las especies de patógenos humanos transmitidos por el agua y las enfermedades que causan se presentan a continuación en el cuadro VIII.

Cuadro VIII. Patógenos transmitidos por el agua. Modificado de (Ingraham *et al.*, 1998).

Grupo	Especie de patógeno	Enfermedad
Bacterias	<i>Salmonella typhi</i>	Fiebres tifoideas
	<i>Salmonella sp.</i>	Salmonelosis (gastroenteritis)
	<i>Escherichia coli</i>	Diarrea
	<i>Legionella pneumophila</i>	Legionelosis
	<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Enterocolitis (diarrea)
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Cuadros clínicos diarreicos
Virus	Hepatitis A	Hepatitis A (infecciosa)
	Hepatitis E	Hepatitis E
	Poliovirus	Poliomielitis
Protistas	<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería amebiana
	<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis (diarrea)
	<i>Balantidium coli</i>	Balantidiasis (diarrea)
	Cryptosporidium	Criptosporidiosis (diarrea)
Animales: Helmintos	<i>Fasciola hepática</i>	Hepatitis (necrosis de hígado)
	<i>Ophisthorchis sinensis</i>	Hepatitis (necrosis de hígado)

Por sus formas de transmisión las enfermedades de origen hídrico se dividen en dos (Pérez *et al.*, 1999).

- Transmisión directa: causada por virus, bacterias, hongos, protistas y helmintos.
- Transmisión indirecta: causada por tremátodos, céstodos y nemátodos.

Algunas de las enfermedades comunes se muestran en el cuadro IX, así como el microorganismo que la provoca.

Cuadro IX. Algunos mecanismos de transmisión y la enfermedad que ocasionan (Pérez *et al.*, 1999).

Tipo de microorganismo	Tipo de transmisión*	Enfermedad que ocasiona
Adenovirus	Cutáneo-mucosa	Conjuntivitis, faringitis
<i>Salmonella</i>	Ingesta de alimentos	Enfermedad gastrointestinal
<i>E. coli</i>	Ingesta de alimentos	Enfermedad gastrointestinal
Botriocéfalo	Vectores	Helmintiasis

* Por contacto directo con agua residual tratada.

En algunos países de la Unión Europea (UE), determinadas especies bacterianas se consideran como indicadores de contaminación fecal, tales como son *E. coli*, estreptococos fecales, y clostridio sulfito reductores (*Clostridium perfringens*). De la misma manera en la UE los brotes de enfermedad de transmisión hídrica más frecuentes son provocados por *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *Aeromonas sp.* También existen los patógenos oportunistas que en el ambiente no son dañinos de forma natural como los organismos de los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium* y que en personas que tienen un mecanismo de defensa disminuido producen infecciones (Pérez *et al.*, 1999).

Como ya se había mencionado, dentro de los grupos de microorganismos que pueden ser empleados como bioindicadores para la calidad del agua se encuentran las bacterias que, para su análisis, poseen la ventaja de una metodología rutinaria bien desarrollada, presentan una respuesta rápida a cambios incluyendo la contaminación. Y son excelentes indicadores de

contaminación fecal y de fácil muestreo (de la Lanza, 2000). Debido a que las aguas residuales tienen una gran capacidad disolvente se contaminan mediante la incorporación de microorganismos patógenos y oportunistas. Alrededor del planeta cada año aproximadamente 500 millones de personas se ven afectadas por infecciones entéricas ya sea de tipo epidémico o endémico, provocado por un mal saneamiento del agua (Pérez *et al.*, 1999).

1.4.1 Bacterias

Se han descrito unas 10,000 especies bacterianas. Las bacterias son organismos procariontes, es decir, no presentan núcleo, sus reacciones metabólicas se llevan a cabo en el citoplasma o a través de la membrana plasmática. La pared celular es rígida, permeable y está compuesta de peptidoglucanos. Dos grandes grupos naturales de bacterias se pueden identificar por la estructura de su pared usando la técnica de Tinción de Gram; en esta técnica la pared celular de las bacterias Gram positivas al final del procedimiento queda teñida de un color púrpura, mientras que la pared celular de las Gram negativas pierde el color púrpura por lavado durante el procedimiento y al final queda teñida de color rosa debido a un colorante de contraste. Las bacterias obtienen sus requerimientos nutricionales de una gran variedad de sustratos. Hay bacterias fotótrofas, que producen de compuestos orgánicos por fotosíntesis y usan el CO₂ como fuente de carbono; bacterias fotoheterótrofas, que como su nombre lo indica para la fotosíntesis usan la energía del sol y no son capaces de producir su alimento, sino que utilizan ácidos grasos y carbohidratos complejos como fuentes de carbono; bacterias quimiolitótrofas, que usan el CO₂ como fuente de carbono y algunas usan

compuestos inorgánicos, tal como el hidrógeno gaseoso, sulfuro y compuestos del nitrógeno y bacterias quimioorganótrofas usan compuestos orgánicos como fuente de carbono y algunas son parásitos o saprobios, en al menos una parte de su ciclo de vida, por lo tanto viven en un hospedero (Starr y colaboradores, 2001; Madigan *et al.*, 1998). Las bacterias presentan una diversidad de formas y entre las más comunes están: esférica o coco, alargada o bacilo y con cuerpo celular alargado con una o más espirales. Se les encuentra libres o formando cadenas largas o grupos (Starr *et al.*, 2001).

1.4.2 Clasificación de *E. coli* y *P. aeruginosa*

Para comprender mejor a los microorganismos estudiados se muestra su clasificación e el cuadro X.

Cuadro X. Clasificación linneana de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Joklik *et al.*, 1992; Holt *et al.*, 1994 y Margulis *et al.*, 1998).

Supereino	Prokarya	Prokarya
Reino	Bacteria	Bacteria
Subreino	Eubacteria	Eubacteria
Orden	Proteobacterias	Proteobacterias
Familia	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae
Grupo	5	4
Subgrupo	Bacilos Gram Negativos anaerobios facultativos	4A bacilos y cocos Gram Negativos aeróbicos/microaerofílicos
Género	<i>Escherichia</i>	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>

1.4.3 El género *Escherichia*

Las bacterias del género *Escherichia* son Gram negativas, anaerobias facultativas. Junto con los demás géneros de esta familia reciben el nombre de “bacilos entéricos”. Su forma es bacilar, de bordes rectos, 1.1-1.5 μm de ancho x 2.0-6.0 μm de largo (figura 6). Se encuentran en pares o solas. Son quimiorganotróficas y su metabolismo es de tipo fermentativo. Algunas especies presentan movilidad por flagelos peritricos, otras no son móviles. En pruebas de fermentación la D-glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la formación de ácido y gas. También reducen los nitratos (Holt, *et al.*, 1994). La pared celular está compuesta por ácido N-acetil murámico, N-acetil glucosamina, ácido diaminopimérico y tiene una disposición laminar. No producen esporas por lo que son destruidas con facilidad por calor, germicidas, compuestos fenólicos y halogenados, formaldehído y β -glutaraldehído; la cloración del agua también da resultados efectivos para eliminarlas (Joklik *et al.*, 1992).

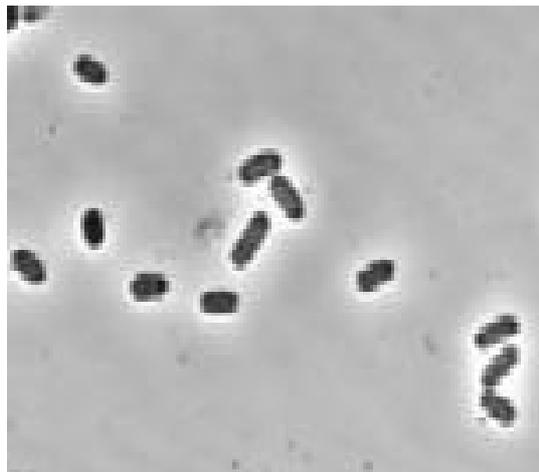


Figura 6. Micrografía electrónica de *E. coli*. Tomada de people, 2005

Escherichia coli abunda en las heces de origen humano y animal en concentraciones de $10^9/g$. Se encuentran en aguas residuales, efluentes tratados y suelos que hayan sufrido contaminación fecal reciente (Fawell, 1995).

Escheichia coli crece sin ningún problema en los medios de cultivo de uso común, y obviamente también tiene un buen crecimiento en los medios de aislamiento para bacilos entéricos. Su temperatura óptima es de $35^{\circ} C$ y su temperatura de confirmación en el laboratorio es de 44 a $45^{\circ} C$. Son colonias fermentadoras de lactosa y manitol; cuando están asociadas a una infección en el aparato urinario son β -hemolíticas en agar sangre. Producen descarboxilación de la lisina, usan el acetato como fuente de carbono y realizan la hidrólisis de triptófano a indol (Joklik, *et al.*, 1992). También presentan actividad de la enzima β -galactosidasa y la mayoría de las colonias *E. coli* aisladas de la orina son positivas para β -glucuronidasa teniendo como sustrato 4-metilumbeliferol- β -glucurónido (MUG) (Jawetz *et al.*, 1996).

E. coli puede causar infecciones en vías urinarias (con mayor frecuencia en mujeres), infecciones pulmonares (es el agente etiológico de algunos casos de neumonías nosocomiales) y es una causa importante de meningitis neonatal. También se le puede encontrar en heridas infectadas y algunas veces invade el torrente sanguíneo desde cualquiera de los sitios de infección primaria que se han mencionado. Algunas estimaciones revelan que *E. coli* incide con diarreas en un 4% en Norte América mientras que en los países cercanos al Ecuador constituye una causa importante de diarrea infantil (Joklik *et al.*, 1992).

Las enfermedades diarreicas relacionadas con *E. coli* se agrupan de la siguiente manera (Jawetz *et al.*, 1996 y Margall *et al.*, 1997):

- ✎ *E. coli* enteropatógenicas (ECEP): se relaciona con brotes de diarrea en las salas de recién nacidos; se asocia a lesiones del intestino delgado.
- ✎ *E. coli* enterotoxigénica (ECET): provoca frecuentemente la diarrea del viajero y también es causa de diarrea en lactantes de países desarrollados. Los individuos afectados presentan una pérdida masiva de agua y electrolitos.
- ✎ *E. coli* enterohemorrágica (ECEH): es muy importante pues se asocia con colitis hemorrágica, que es una diarrea muy grave, que tiene síndrome urémico hemolítico, enfermedad que generan insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, debido a la enterotoxina citotóxica.
- ✎ *E. coli* enteroinvasora (ECEI): presenta ciertos plásmidos que incrementan la capacidad de invasión en las células epiteliales de la mucosa intestinal.
- ✎ *E. coli* enteroagregadora (ECEA): causa diarrea aguda y crónica.

1.4.4 El género *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos alargados rectos o curvados, Gram negativos. Miden 0.5-1.0 μm de ancho x 1.5-5.0 μm de largo. Según las especies poseen uno o varios flagelos polares, muy pocas veces no presentan movimiento. Habitan una variedad de ambientes como el agua y el suelo. Son aerobias estrictas con el oxígeno como el aceptor terminal de electrones. No crecen por debajo de pH 4.2. Su temperatura óptima de crecimiento es a los 41°

C. (Holt *et al.*, 1994). Son quimioorganótrofos, tienen la capacidad de usar el nitrato como aceptor terminal de electrones y sobrevivir en condiciones aerobias. La especie mejor conocida es *Pseudomonas aeruginosa* (figura 7).

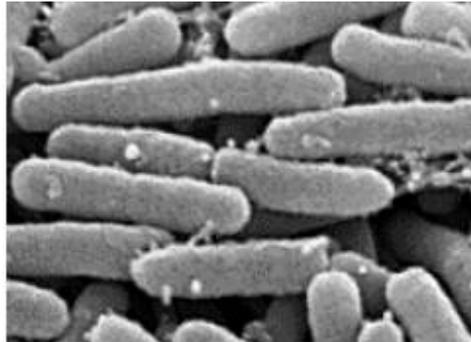


Figura 7. Micrografía electrónica de *P. aeruginosa*. Tomada de Weber (2001).

Poseen una capa mucosa extracelular llamada glicocáliz que se forma por ácido manurónico, ácido L-gulurónico, alginato y un polímero aniónico de β -1,4 ácido manurónico, lo que permite su adherencia a las células hospederas (Joklik *et al.*, 1992).

Las bacterias de la especie *P. aeruginosa* usan hasta 80 compuestos orgánicos, lo que les facilita sobrevivir en diferentes ambientes y en casi cualquier medio de cultivo común. Son los únicos organismos Gram negativos que producen el pigmento azulado pircianina, de efecto bactericida. Presentan una gran resistencia a la desinfección química; pueden subsistir en algunos compuestos de amonio cuaternario, soluciones yodadas y jabones con hexaclorofeno. Por el contrario, las soluciones efectivas para la desinfección de *P. aeruginosa* son las sustancias fenólicas y el β -glutaraldehído; como no produce esporas, el agua hirviendo también las destruye al igual que la desecación (Joklik *et al.*, 1992).

Estos organismos existen de forma libre y como microcolonia. Cuando se encuentran en el hospedero producen enzimas, toxinas eritrodérmicas e incluso toxinas extracelulares como la exotoxina A, letal para los animales y responsable de cuadros diarreicos. Su modo de acción consiste en detener la síntesis proteica lo que lleva a la muerte celular (Joklik *et al.*, 1992 y Holt *et al.*, 1994).

Las infecciones por estas bacterias oportunistas ocurren principalmente en pacientes inmunosuprimidos, con quemaduras graves, heridas traumáticas o que requieren intubación o cateterismo. De acuerdo a Joklik y colaboradores (1992) se ha demostrado que es causante del 10% de las infecciones nosocomiales, entre las que destacan las siguientes:

- ✎ Puede provocar endocarditis y osteomielitis en adictos a drogas intravenosas
- ✎ Foliculitis en pacientes expuestos a bañeras y piscinas que no son mantenidas de forma adecuada
- ✎ Otitis externa
- ✎ Infecciones de la córnea por contaminación del líquido para los lentes de contacto, cosméticos y traumatismos oculares
- ✎ Infecta pulmones
- ✎ Vías urinarias

Estos microorganismos pueden extenderse desde el sitio de la lesión por vía hematógena, causando lesiones focales en otros tejidos y septicemia. En pacientes sépticos inmunosuprimidos existe una tasa de mortalidad alta de casi un

80%, mientras que el 30% de los pacientes que tienen septicemia debido a estos microorganismos llegan a desarrollar ectima gangrenoso (Joklik *et al.*, 1992 y Bartelt, 2000).

1.4.5 Reportes epidemiológicos de *E. coli* y *P. aeruginosa*

Se han realizado experimentos que demuestran la presencia de bacterias patógenas aisladas del agua. En las últimas dos décadas un número creciente de patógenos encontrados en el agua se ha evidenciado. Los géneros más estudiados son *Yersinia*, *Legionella*, *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Shigella* y *E. coli* entre otras (Egli *et al.*, 2002). Los aspectos de calidad microbiológica del agua llevan a la conclusión de que el agua es un vehículo de transporte de patógenos humanos que se asocia con la tasa de morbilidad y mortalidad (Borrego *et al.*, 1997). En estudios realizados en Cuernavaca, México, a suministros de agua que se habían tratado con cloro se encontró que había *E. coli*, *Edwardsiella sp.*, *S. typhimirium* y *Enterobacter sp.* (De Victorica *et al.*, 2001). En Italia, Stampi y colaboradores evaluaron la eficiencia del ácido paracético con 1.5-2 g/l con un tiempo de contacto de 20 min como desinfectante, encontrando que había una notable reducción de hasta 99.99 % en el número de coliformes totales (Stampi *et al.*, 2001).

En trabajos reportados por Rutala y colaboradores (1997), el hipoclorito de sodio inorgánico para desinfectar nosocomios es ampliamente utilizado para el cuidado de la salud, lo que reduce el número de infecciones, como las causadas por las bacterias de *Legionella*. Por ejemplo, *P. aeruginosa* empleando 100 ppm de cloro residual con tiempo de contacto de 10 min a temperatura de 20° C el inóculo de 6

unidades \log_{10} no presentó reducción de la actividad bacteriana, por lo que se confirma cierta resistencia de las bacterias al proceso de desinfección.

Los brotes de enfermedad de origen hídrico se presentan cuando uno o mas casos de similar síntoma después de la ingesta de agua o exposición con fines recreativos. Por tanto, es importante que se cuente con programas de vigilancia epidemiológica, los cuáles dan a conocer información relacionada con los brotes de enfermedades como: caracterización epidemiológica, identificación del agente etiológico e incluso las deficiencias en los sistemas del agua (Brull, 1994 y Swaminathan *et al.*, 1999).

En el cuadro XI se muestra la mortalidad por causas específicas comparando los números de cuadros infecciosos diarreicos, contra otros indicadores de alta ocurrencia en Europa (Ammon, 1997).

Cuadro XI. Causas de mortalidad específicas contra cuadros infecciosos diarreicos.

CAUSAS	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Enfermedades coronarias del corazón	4283	N/D	7200	7200	7375	7089	6894
Enfermedades cerebro vasculares	3854	N/D	4600	4600	5106	5544	5101
Infecciones respiratorias agudas	4110	4416	3905	3745	2995	4039	3941
Tuberculosis	2709	3072	3000	2910	1498	1669	1660
Obstrucción crónica pulmonar	2888	N/D	2888	2890	2249	2660	2523
Diarreas	3010	3000	2473	2455	2219	2213	2124

(muertes x 1000), N/D = no determinado.

La Unión Europea creó el proyecto de vigilancia europea EUROSURVEILLANCE, cuyo portal en Internet es la página electrónica <http://www.eurosurveillance.org>. Ahí se reporta que un caso importante de enfermedades causadas por microorganismos hídricos es el provocado por las cepas *Escherichia coli* O157: H7 y otras *E. coli* ECEH, que son los principales agentes infecciosos responsables de colitis hemorrágica. El síndrome hemolítico urémico SHU se caracteriza por la presencia de anemia, bajo recuento de plaquetas e insuficiencia renal, con una tasa de mortandad que oscila entre el 2% y 7% y una tasa de secuelas a largo plazo, como por ejemplo disfunción renal, lesión neurológica o hipertensión, en un 12% a un 30% de los casos.

La neumonía por microorganismos de *P. aeruginosa* está relacionada con una elevada tasa de mortalidad de 70 %; a diferencia del 35% que se observa en otras neumonías que son causadas por diferentes microorganismos Gram Negativos, estos pacientes experimentan ciertos efectos tóxicos, confusión y cianosis progresiva. Esta neumonía se ve más en pacientes con cáncer o internados (Joklik et al. 1992).

Actualmente, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica SINAVE reporta hasta la semana 15 de 2006, 1 438 636 casos acumulados de enfermedades infecciosas intestinales. Casos de enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo hasta la semana epidemiológica 14 de 2006 para el Estado de Hidalgo y Distrito Federal, así como el total de todas las entidades federativas se encuentran en cuadro XII. Modificado de SINAVE (2006).

Cuadro XII. Casos de enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo.

Entidad federativa	Intoxicación alimentaria bacteriana				Enfermedades infecciosas intestinales			
	2006			2005	2006			2005
	Sem.	Acum.		Acum.	Sem.	Acum.		Acum.
		M	F			M	F	
Hidalgo	-	13	17	18	2 125	15 394	17 127	30 620
Distrito Federal	47	137	155	290	8 011	56 319	67 759	120 852
Total	641	4 562	4 765	10 439	96 859	677 364	806 272	1 437 218

En Hidalgo en la semana epidemiológica 14 del 2006 no se reportó ningún caso de intoxicación alimentaria bacteriana, pero se tiene una sumatoria de hombres y mujeres acumulada hasta esta fecha de 30 casos, mientras que en el 2005 hasta la semana 14 solo se reportaron 18 casos. Los reportes de las enfermedades infecciosas intestinales hasta la misma semana epidemiológica reportan 32 521 en la sumatoria de hombres y mujeres, mientras que el año anterior hasta esa semana se tenían reportados 30 620 casos acumulados. Lo anterior indica un aumento en el número de casos acumulados en el 2006 comparado con el 2005.

2 Justificación

En México existe una población de más de 100 millones de habitantes, rezagos en materia de bienestar social y una tasa de crecimiento poblacional media anual del 1.0% (INEGI, 2005). Aunado a esto, con las actividades antropogénicas se ha provocado la contaminación de la mayoría de los cuerpos de agua, lo que tiene un efecto sobre la salud humana. Según el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), desde 1996 las enfermedades intestinales infecciosas se consideraban entre las diez primeras causas de muerte en el país, mientras que las muertes en niños menores de cinco años ocuparon el cuarto lugar en 1997, sólo en enfermedades diarreicas (CNA, 2000a).

Existen diversos microorganismos patógenos que son liberados al medio a través de las heces y la orina de agentes portadores, los cuales causan una serie de enfermedades como fiebre tifoidea, disentería, cólera y hepatitis. Siendo más afectados niños, ancianos y personas de bajos recursos (Pérez *et al.*, 1999).

En México la norma NOM-003-SEMARNAT-1997, que “establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público”. Sólo utiliza los indicadores biológicos coliformes fecales y huevos de helminto. En contraste, la normativa de la Unión Europea contempla coliformes totales y fecales, *Streptococcus*, *Salmonella* y Enterovirus. Cuando se trata de agua potable se incluye también al género *Pseudomonas* (Diario Oficial de la Comunidad Europea, 1998; 1991).

3 Objetivos

General:

Evaluar la calidad del agua residual tratada de la depuradora del I.T.E.S.M., campus Hidalgo mediante la detección y cuantificación de bacterias de los géneros *Escherichia* y *Pseudomonas*

Específicos:

1. Efectuar ensayos que permitan estandarizar el diseño experimental para determinar la cantidad de organismos contaminantes.
2. Identificar y confirmar la presencia de organismos de los géneros bacterianos *Escherichia* y *Pseudomonas* en agua residual tratada usando medios selectivos y pruebas bioquímicas confirmativas
3. Evaluar la resistencia a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio de las bacterias de interés para este estudio
4. Sustentar el uso de *Pseudomonas* como indicador de la calidad del agua residual tratada
5. Diagnosticar la calidad del agua residual tratada con base en los resultados de las pruebas bioquímicas confirmativas

4 Método

Estuvo dividido en tres etapas. La primera consistió en realizar un diseño experimental para estandarizar la técnica de la prueba (agosto del 2004), la segunda etapa se realizó ya establecido el diseño del experimento durante la época de lluvia (noviembre del 2004 a diciembre del 2004) y finalmente la tercera etapa se llevó a cabo durante la época de sequía (enero del 2005 a mayo del 2005). La razón por la que se dividió el estudio en época de lluvia y sequía fue para analizar si el factor climático influye en la identificación y cuantificación de los microorganismos de los géneros *Escherichia* y *Pseudomonas* del ART.

4.1 Muestreo

El muestreo se realizó en la PTAR del I.T.E.S.M., campus Hidalgo, ubicado en el Boulevard Felipe Ángeles 2003, col. Venta Prieta C. P. 42080. Pachuca, Hidalgo.

Se tomaron muestras de la PTAR, en tres sitios:

- 1) del afluente, es decir, agua de entrada a la depuradora antes de la rejilla de desbaste, denominada de aquí en adelante agua residual (AR o E)
- 2) del agua tratada y clorada, es decir, agua de salida del tanque de almacenamiento posterior a la cloración, denominada (ART o S)
- 3) del tanque secundario sin clorar (Sec).

Las muestras se colectaron en tres frascos de vidrio de 1 litro cada uno previamente esterilizados, para el caso del ART el frasco contenía 0.1 ml de tiosulfato de sodio anhídrido al 10 % (ver Anexo), para inhibir la acción del cloro en el agua.

Los frascos se transportaron al laboratorio en una hielera.

El muestreo se realizó atendiendo a las indicaciones de la NMX-AA-003-1980, que trata del muestreo de aguas residuales indicando que las muestras:

- Deben ser representativas.
- Anotar en etiquetas y hojas de registro las condiciones en el punto y toma de la muestra.
- El levantamiento de la muestra podrá ser en tomas, descargas libres y en canales o colectores.
- El material de los recipientes a utilizar debe ser de vidrio o polietileno, con tapa hermética.
- Para preservar la muestra, se transporta en hielera a una temperatura de 4 °C. El tiempo entre la toma y el análisis no deberá exceder los tres días.

Para los parámetros fisicoquímicos del agua residual tratada medidos *in situ*, se siguieron los requerimientos establecidos por:

- NMX-AA-008-SCFI-2000, para determinación del pH
- NMX-AA-007-SCFI-2000, para determinar la temperatura

El potencial hidrógeno del agua residual y residual tratada se determinó usando un medidor de pH portátil de la marca *Hanna Instruments*, modelo HI 8014. Para la temperatura se usó un termómetro de mercurio con graduación de -20° a 50° C.

En total se realizaron 20 muestreos, tres corresponden al diseño experimental, 5 a época de lluvia y 12 a época de sequía.

4.2 Diluciones

El objetivo de realizar diluciones es determinar si hay presencia o no de microorganismos contaminantes y en qué cantidad se encuentran, reportando el nivel de contaminación microbiana en el agua analizada. Se realizaron diluciones decimales seriadas en condiciones asépticas; para ello se preparó con un volumen de nueve veces el diluyente, solución salina isotónica 0.85% (ver Anexo) y un volumen de la muestra $[(10-(n + 1))]$ en botellas de dilución. De la primera dilución se realizó el mismo procedimiento hasta que se obtuvieron las diluciones necesarias, como lo muestra la figura 8 (Ramírez *et al.*, 1998).

Las diluciones se realizaron en series decimales de 10^{-1} hasta 10^{-5} , en tubos Ependorff de 1.5 ml esterilizados. Para cada dilución se sembraron 100 μ l por extensión en placa, en cajas Petri con agar para cuenta estándar (ver Anexo) y se incubaron a 37 °C durante 48 h.

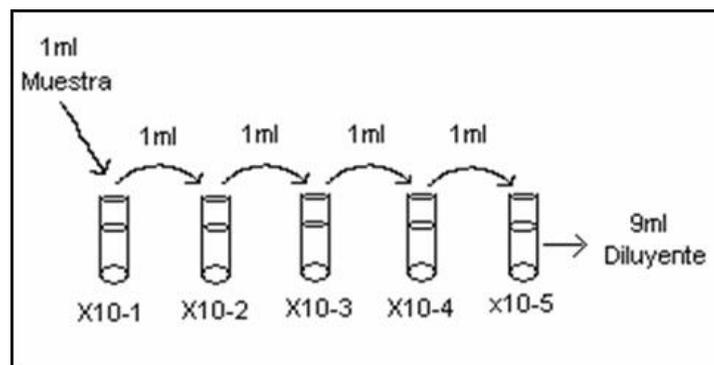


Figura 8. Aislamiento de microorganismos por el método de dilución (Ramírez *et al.* 1998).

4.3 Conteo de colonias

El agar Cuenta Estándar (ver anexo), es recomendado para contar bacterias mesófilas aerobias que son de interés sanitario y que al mismo tiempo son indicadores de contaminación. Su principio es sencillo puesto que la peptona de caseína da al medio compuestos nitrogenados, entre ellos aminoácidos, así como sustancias que son soporte de crecimiento, el extracto de levadura aporta la vitamina B y la fuente proveedora de energía es la dextrosa (DIBICO, 2002). Una vez que se realizaron las diluciones se extendió la muestra sobre toda la superficie del agar con un asa triangular de vidrio previamente esterilizada con alcohol. Posteriormente, inoculadas las cajas de Petri, se incubaron a 37° C durante 48 h.

Conteo. Transcurrido el periodo de incubación se realizó el conteo de las UFC a simple vista o haciendo uso del cuenta colonias tipo Québec. Por ejemplo, la placa 10^{-6} y la placa 10^{-5} , donde la primera debe tener un valor de un décimo del número de colonias visibles en la dos. Se seleccionaron placas que tenían de 30 a 300 colonias, se contaron y se reportaron como unidades formadoras de colonias (Ramírez *et al.*, 1998).

4.4 Filtración por membrana

Este método consiste en filtrar al vacío una cantidad previamente determinada de la muestra (100 ml, cantidad usada en determinaciones de microorganismos en agua) a través de una membrana estéril de nitrato de celulosa con poros de 45 µm de diámetro. La membrana, la cual retiene a los microorganismos, se coloca en condiciones asépticas en una caja Petri con medio de cultivo selectivo para los microorganismos que se desean aislar, para el presente trabajo MaConkey y AP (ver Anexo). Posteriormente, las cajas se incuban a 35° - 37° C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se examina la membrana con un microscopio, se realiza el conteo de UFC y se seleccionan colonias grandes totalmente aisladas (evitando la contaminación por otras UFC que no son de interés en el estudio) para realizar las pruebas bioquímicas correspondientes como se ve más adelante (Carpenter, 1969; Cabo *et al.*, 1972 y Millipore, 2005).

4.5 Medios de cultivo selectivos

Son aquellos medios que contienen sustancias que inhiben el crecimiento de un grupo de microorganismos, mientras que los de la especie que se desea aislar no resultan afectados, estableciendo con ello una selección en el tipo de microorganismo que sí puede crecer (Granados *et al.*, 1998 y Ramírez *et al.*, 1998).

Escherichia. El medio selectivo usado fue el agar MaConkey (ver Anexo). En general, este medio es empleado para el aislamiento de géneros patógenos del intestino; sirve para diferenciar y aislar enterobacterias coliformes de diversos

alimentos, aguas negras y muestras clínicas. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de los microorganismos Gram positivos. Mientras que el indicador de pH rojo neutro y la lactosa, hacen posible identificar las bacterias rosa intenso y halo de precipitación (DIBICO, 2002 y Granados *et al.*, 1998).

Resultado esperado. Las colonias de *E. coli* se observan de color rosa intenso con un halo de precipitación después de incubar a 35 °C durante 24 h.

Pseudomonas. El medio de cultivo usado fue el Agar *Pseudomonas* o AP (ver Anexo). Este medio posee bacto peptona que permite el crecimiento, cloruro de magnesio y el sulfato de potasio los cuales estimulan la producción de piocianina.

Resultado esperado. Al irradiar la caja de Petri con luz ultravioleta se observan las colonias verde fluorescente con halo de precipitación de *Pseudomonas* después de incubar a 35 °C durante 24 h.

El procedimiento para el diseño experimental fue el siguiente:

1. Se preparó agar MaConkey y agar *Pseudomonas* (AP), en cajas Petri.
2. Se pegó un disco de papel cuadriculado, dividido y marcado con números del 1 al 50.
3. Se seleccionaron 25 colonias de las diluciones del agua de entrada al azar y 25 colonias de las diluciones del agua de salida y se sembraron en cada una de las casillas correspondientes en agar MaConkey y en agar AP.
4. Se incubaron ambas cajas a 35° C durante 24 h.

En los muestreos de lluvia y sequía se sembró en medios selectivos usando la técnica de filtración por membrana. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se preparó agar MaConkey y agar *Pseudomonas* (AP), en cajas Petri chicas.
2. Se prepararon frascos de dilución con tapón que contenían 90 ml de solución salina cada uno, los cuales fueron esterilizados y refrigerados.
3. Se esterilizaron pipetas de 10 ml, pinzas de disección y equipo para filtración al vacío.
4. Se realizaron diluciones decimales seriadas por duplicado usando los frascos de 160 ml, adicionando 10 ml de cada muestra (entrada, secundario y salida). Las diluciones varían de 10^{-1} hasta 10^{-6} .
5. Con las diluciones preparadas se sembraron las cajas de Petri con agar MaConkey y agar AP, respectivamente, usando la técnica de filtración por membrana. Se incubaron durante 24 h a 35° C.

4.6 Pruebas bioquímicas

Como su nombre lo indica, estas pruebas demuestran las características metabólicas típicas de cierto grupo de microorganismos confirmando así su presencia en la muestra de agua analizada. Para *Escherichia coli* se usó IMViC y para *Pseudomonas aeruginosa* se usó OF, Catalasa y Gelatina Nutritiva (ver cuadro XIII). Para realizar las pruebas bioquímicas se tomaron las UFC que se encontraron presuntivas positivas en la técnica de filtración por membrana. De

todas las colonias presuntivas sólo se analizaron aquellas que se encontraban totalmente aisladas.

4.6.1 IMViC utilizada para la identificación de *Escherichia*

IMViC son las iniciales correspondientes a una serie de pruebas que incluye indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato. En donde cada una de ellas permite identificar diferentes características metabólicas. Para validar las pruebas bioquímicas IMViC se sembró la cepa certificada de *E. coli* con número ATCC 23922.

A) Producción de indol. Esta prueba sirve para detectar si las bacterias tienen la capacidad de sintetizar la enzima *triptofanasa* (desaminasa), enzima que degrada el triptofano con producción de indol que se acumula en el medio.

El medio líquido que utiliza es agua peptonada (ver Anexo) y reactivo de Kovacs (ver Anexo). Tras incubar las bacterias a 36° C durante 48 h, se adiciona 0,5 ml del reactivo de Kovacs, se agita y se deja reposar. Los resultados esperados son los siguientes:

- Prueba positiva: aparición de un anillo de color rojo en la superficie del medio (como consecuencia de la reacción del indol con el reactivo, dando a un compuesto menos denso y coloreado).
- Prueba negativa: anillo de color amarillo.

B) Prueba del rojo de metilo (homoláctica y fórmica). Con esta prueba se determina la capacidad de los microorganismos de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa (en general, del

metabolismo del ácido pirúvico). Esta prueba detecta el descenso en los grados de pH por la producción de ácidos (incremento de acidez). El medio utilizado es MR-VP (ver anexo), y se usa como reactivo la solución de rojo de metilo. Este compuesto es tóxico para algunas bacterias, por lo que se añade después de que han sido incubados. Si el pH es menor de 4.5 debido a la acumulación de ácido fórmico o acético (fermentación ácido mixta) aparecerá de color rojo (prueba positiva: ha utilizado la glucosa). Si el pH es mayor, aparecerá amarillo (rojo de metilo negativo: no ha utilizado la glucosa, ha seguido otra vía). Los resultados esperados son los siguientes:

-Prueba positiva: superficie del medio rojo.

-Prueba negativa: superficie del medio color amarillo.

C) Prueba de Voges-Proskauer (acetónica). Permite detectar la producción de acetil-metilcabinol procedente del metabolismo del ácido pirúvico. Se inocula un tubo de caldo glucosa fosfato. Al incubar a 36° C durante dos días se añade 0,2 ml de reactivo VP1 (ver Anexo) y 0,6 ml de reactivo VP2 (ver Anexo). Al unir ambos reactivos aumenta el pH. En un medio alcalino, la solución de α -naftol puede reaccionar con acetoína. Los resultados esperados son los siguientes:

-Prueba positiva: color rojo. Tiene el metabolismo del ácido pirúvico.

-Prueba negativa: coloración pardo-amarillenta. Tiene otro metabolismo.

D) Prueba del citrato. Determina si las bacterias son capaces de utilizar el citrato como una única fuente de carbono. Para ello se empleó agar Citrato de Simmons (ver Anexo). En dos tubos con agar inclinado: uno se inocula y deja abierto y otro

sirve como control y no es inoculado. Se analiza el resultado después de incubar a 36° C durante 2 a 3 días. Los resultados esperados son los siguientes:

-Prueba positiva: color azul intenso. Usa el citrato como fuente de carbono

-Prueba negativa: no aparece cambio de color en el agar ni existe crecimiento.

Cuadro XIII. Resultados esperados para identificar los microorganismos pertenecientes al género *Escherichia* mediante los ensayos IMViC

Especies	Indol	MR	VP	Citrato
<i>E. coli</i>	+	+	-	-

4.6.2 Oxidación Fermentación (Hugh Leiffson)

Contiene carbohidratos que funcionan como la fuente fermentable realizándose una degradación que se observa con el cambio de color del medio de cultivo de verde a amarillo. El azul de bromotimol indica los cambios de pH. Otro componente es la triptosa que da al medio los nutrientes para que crezcan las bacterias. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y el fosfato dipotásico controla el pH del medio (DIBICO, 2002). Esta prueba se basa en el metabolismo oxidativo de los microorganismos que sólo produce ácido en la superficie del medio; mientras que el fermentativo lo produce en todo el medio, incluso en las zonas de anaerobiosis (Granados *et al.*, 1998). La prueba se realiza en presencia y ausencia de oxígeno, por lo que se inoculan dos tubos con medio OF (ver Anexo) por picadura a partir del cultivo en estudio. A uno de los tubos se le adiciona de 1 a 1.5 ml de aceite mineral estéril (parafina) y al otro nada. Se incuba

a 35° C durante 24 a 48 h. También se hace la punción a un tubo con el asa sin inocular para que sirva de control negativo. Los resultados esperados son los siguientes:

Los tubos con aceite cambian de color verde a amarillo, debido a la degradación fermentativa del carbohidrato desde la profundidad del tubo hasta la superficie. Pero cuando los tubos que no se encuentran cubiertos son los únicos que cambian a color amarillo, es porque ocurrió una degradación oxidativa y se ve sólo en la parte de la superficie del medio de cultivo. Puede haber una reacción alcalina que se ve con el cambio de color de verde al azul (DIBICO, 2002).

4.6.3 Hidrólisis de gelatina

Las bacterias presentan una capacidad proteolítica que se observa en la licuefacción de la gelatina nutritiva (ver anexo) por la acción de las proteinasas de tipo gelatinasas. Se usa para investigar la presencia de microorganismos proteolíticos en el agua y otros materiales de importancia sanitaria. La peptona y el extracto de carne proporcionan los nutrimentos para que crezcan los microorganismos. La gelatina sirve como sustrato para determinar la producción de enzimas gelatinasas, que son útiles para demostrar la licuefacción de la gelatina (DIBICO, 2002). Se toman tubos con gelatina nutritiva y se introducen en hielo. La siembra es por punción; un tubo será sembrado por punción con asa sin microorganismos para efecto de control negativo. Se incuba a una temperatura de 22 a 25° C por un lapso de tiempo que va de 1 a 14 días. Se deben observar los tubos durante las dos semanas, a menos que se licúe antes la gelatina (DIBICO, 2002). Los resultados esperados son los siguientes:

Prueba positiva: se produce una zona de licuefacción que se ve como un ensanchamiento de la línea de punción.

Prueba negativa: no hay licuefacción, aunque pueda observarse crecimiento de microorganismos.

4.6.4 Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que se encuentra en la mayoría de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que contienen citocromo. La catalasa actúa sobre el peróxido de hidrógeno descomponiéndolo en agua y oxígeno (Granados *et al.*, 1998). Con un asa se toma una colonia del cultivo de los microorganismos a estudiar y se coloca en un portaobjetos, se adiciona una gota del peróxido de hidrógeno al 30 % (ver Anexo). Resultados esperados:

-Prueba positiva: hay formación de burbujas de oxígeno inmediatamente.

-Prueba negativa: no aparecen burbujas.

(Granados *et al.*, 1998).

Cuadro XIV. Reacciones de *Pseudomonas aeruginosa* teóricas, esperadas para la confirmación en las pruebas de catalasa, oxidación/fermentación y gelatina nutritiva corresponde al siguiente patrón:

Género	O/F				Gel. Nut.	Cat.
	C / tapón		S / tapón			
	A	SC	A	SC		
<i>P. aeruginosa</i>	+		+		+	+

4.7 Pruebas de resistencia de los microorganismos de interés al hipoclorito de sodio

Los ensayos de resistencia bacteriana a la desinfección se realizan aumentando la concentración del desinfectante y variando el tiempo de acción de este sobre los microorganismos. Se debe tener en cuenta que la eficacia del desinfectante que en este caso es el hipoclorito de sodio al 11% depende de factores como la concentración aplicada de desinfectante y el tiempo de contacto (Echarri *et al.*, 1996). El hipoclorito de sodio se usa para limpiar y desinfectar el agua potable, piscinas y sistemas de purificación de aguas residuales. El agar soya tripticaseína (ver Anexo) contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, en este caso los de interés; el agar MaConkey y agar AP promueven el crecimiento de colonias de *Escherichia* y *Pseudomonas* respectivamente (DIBICO, 2002).

Se prepararon cajas Petri de doble capa usando agar soya tripticaseína como base y agar MaConkey y agar AP (ver Anexo) como medios selectivos. Se realizó la siguiente metodología (figura 9):

- 1) Se vertieron 200 ml de agua residual en condiciones asépticas a tres matraces Erlenmeyer con tapón de rosca.
- 2) Se adicionó a cada matraz 8 mg/l, 20 mg/l y 30 mg/l de hipoclorito de sodio al 11 %, para analizar el efecto que tiene sobre los microorganismos hipoclorar e hiperclorar el agua residual.

3) Al adicionar el hipoclorito se consideró como tiempo cero, se mezcló perfectamente y sembró 100 µl en las primeras cajas Petri, por duplicado. Se dejó pasar 20 minutos y se sembró las cajas Petri restantes por duplicado.

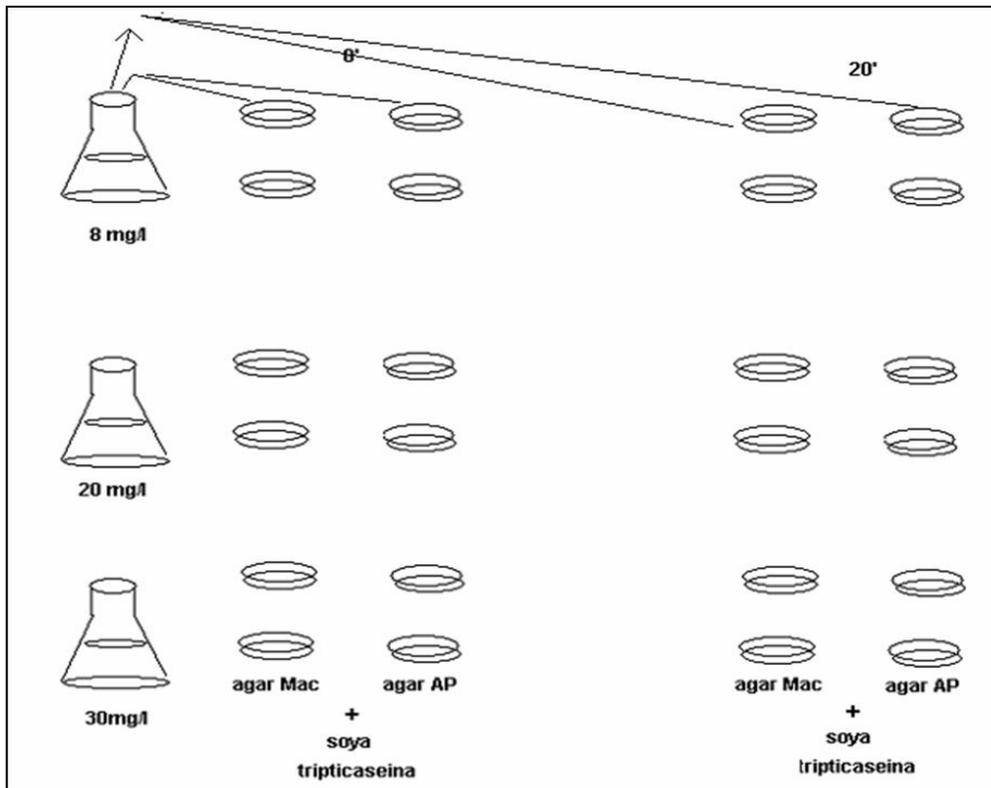


Figura 9. Descripción de los pasos de la prueba de desinfección con hipoclorito de sodio al 11%.

4) Las cajas Petri se incubaron a 36° C durante 24 h.

Se identificó a las UFC de los géneros *Escherichia* (colonias con halo de color rosa intenso) y *Pseudomonas* (colonias que al ser irradiadas con luz UV presentan fluorescencia) y se realizó el conteo de UFC de los en las cajas usando microscopio estereoscópico. De los 20 muestreos para el agua de entrada, salida y tanque secundario, el número de UFC promedio confirmado, se obtuvo multiplicando el número de UFC de cada dilución por su respectivo factor de dilución (fd).

5 Resultados

Parámetros fisicoquímicos.

El valor de pH más básico fue de 8.26 el día 03-nov-04 en el agua de entrada y el menos básico 7.02 el día 18-abr-05 en el agua tratada sin clorar (Sec). El factor físico temperatura reportó un promedio de 22.03°C tanto para el agua residual (E) como para el agua residual tratada (S), mientras que para el agua tratada sin clorar (Sec) se tuvo un promedio de 21.21°C. Los valores se muestran a continuación (cuadro XV).

Cuadro XV. Características fisicoquímicos del agua obtenidas en el muestreo

Muestreo	Fecha	pH			T(°C)		
		E	Sec.	S	E	Sec.	S
1	12-ago-04	7.94	nd	7.44	21	nd	23
2	17-ago-04	7.86	nd	7.72	22	nd	29
3	26-ago-04	7.85	nd	7.8	25	nd	24
4	03-nov-04	8.26	nd	7.84	23	nd	20
5	15-nov-04	8.22	nd	8.22	23	nd	19.5
6	22-nov-04	7.78	7.03	8	22	14	21
7	02-dic-04	7.89	7.87	7.14	21	21	17.5
8	10-dic-04	7.74	7.06	7.84	22	15	21
9	31-ene-05	7.88	nd	7.76	19.5	nd	21
10	07-feb-05	7.75	7.59	7.67	21	19	20
11	21-feb-05	7.99	7.94	nd	21	29	nd
12	28-feb-05	8.07	7.84	7.9	21	19	18
13	07-mar-05	8.12	7.98	8	19	20	21
14	14-mar-05	8.02	7.7	7.59	22	22.5	22
15	04-abr-05	8.24	7.97	8.05	23	21	22
16	11-abr-05	7.35	7.93	7.74	23	24	24
17	18-abr-05	7.96	7.02	7.32	23	24	26
18	25-abr-05	7.98	7.92	8.13	21	22	23.5
19	02-may-05	7.66	7.78	7.89	24	23	24
20	09-may-05	7.81	7.67	7.94	24	23.5	22
Promedio		7.92	7.66	7.79	22.03	21.21	22.03

T = temperatura, p H = potencial hidrógeno y nd= no determinado.

Conteo de colonias

El cuadro XVI muestra los 20 muestreos realizados en la planta depuradora, así como los tres sitios en que se tomaron las muestras (E, Sec y S). Se observa que los valores más altos de UFC se encuentran en las primeras diluciones decimales seriadas, en el agua de entrada (E) y en el agua residual tratada sin clorar (Sec); en muchas casillas se tiene un valor repetido (1848), esto se debe a que al realizar el conteo era imposible determinar cuantas colonias existían, para este caso se tomó el valor más alto encontrado que sustituyó el término “incontable”.

Cuadro XVI. Número total de UFC que crecieron en las diluciones decimales en agar cuenta estándar incubadas a 37° C durante 48 h.

Muestreo	Lugar	Diluciones									
		Dil. 1/10		Dil. 1/100		Dil. 1/1000		Dil. 1/10000		Dil. 1/100000	
1	E	1848	1848	1848	1848	43	45	3	6		
	S	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	E			80	0			20	0		5
	S			96				17			7
3	E	97	90	204	-	32	55	30	10	6	0
	S	19	2	109	34	1	39	8	3	0	1
4	E	1848	1848	356	320	36	30	1	1	0	0
	S	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5	E	1848	1848	196	268	168	220	0	4	0	0
	S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	E	1848	1848	56	138	17	70	0	1	0	10
	Sec.	10		2							
7	E			584		62		9		1	
	Sec.	40		10		0					
8	E			350		132		3		3	
	Sec.	54		30		4					
9	E			180		62		13		0	
	Sec.			2		0		0		0	
10	E	1848		1848		1848		264			
	Sec.	1848		1848		1284					
11	E	1848		1848		169		28		1	
	Sec.	1848		1848		85		0			
12	E			1848		36		0			
	Sec.	140		15		0					
13	E			142		20		4			
	Sec.	184		68		9					
14	E	1848		1848		568		67			
	Sec.	1848		352		31					
15	E			257		109		4		1	
	Sec.	0		0		0					
16	E					788		148		9	
	Sec.	1848		980		344					
17	E					988		264		270	
	Sec.					936		360		530	
18	E					1392		820		1250	
	Sec.	1848		764		668					
19	E					340		40		17	
	Sec.	1848		1072		284		17			
20	E					1848		1672		1600	
	Sec.	1216		800		796					
	S					1552		1048		1248	

Como se observa en el cuadro anterior, el crecimiento de UFC fue mayor para las primeras diluciones decimales seriadas, mientras que para las diluciones que corresponden a 1/100000 y 1/1000000 el crecimiento de UFC fue menor o incluso no hubo tal crecimiento. Para muchas casillas el número de UFC está repetido, esto debido a que el crecimiento fue demasiado y no se pudo realizar un conteo de cada UFC, por lo que se tomó el valor más alto contabilizado en las cajas de Petri, el cual sustituyó al término “incontable”.

Cuadro XVII. Número promedio de UFC que crecieron en agar cuenta estándar.

factor de dilución	E (promedio)	UFC X FD	PROMEDIO	
10	1578	15780	2507890	2.50E+05
100	711	71100		
1000	397	397000		
10000	148	1480000		
100000	113	11300000		
1000000	5	5000000		
factor de dilución	S (promedio)			
10	167	1670	4125678.33	4.10E+06
100	114	11400		
1000	211	211000		
10000	83	830000		
100000	167	16700000		
1000000	7	7000000		
factor de dilución	Sec (promedio)			
10	979	9790	10934338	1.09E+07
100	599	59900		
1000	342	342000		
10000	126	1260000		
100000	530	53000000		

El cuadro anterior indica el número promedio de UFC que crecieron en agar cuenta estándar durante los 20 muestreos. Se representa el número real de UFC y el valor correspondiente en logaritmo tomando en cuenta el factor de dilución que le corresponde. El cuadro muestra a todos los microorganismos que crecieron en

el conteo de colonias realizado en agar cuenta estándar en cada dilución para los tres sitios de muestreo. Como se puede observar el crecimiento de UFC fue mayor en el agua residual tratada sin clorar (Sec) que en el agua residual tratada (S).

Medios selectivos

En la etapa de diseño experimental 13 UFC presentaron halo de precipitación rosa intenso después de sembrar en el medio selectivo agar MaConkey, por lo que se consideraron como presuntivas del género *Escherichia*, mientras que solo una UFC presentó fluorescencia verde al ser irradiada con luz UV después de sembrar en el medio selectivo agar AP considerándose como colonia presuntiva del género *Pseudomonas*. En los muestreos de la época de lluvia y la época de sequía, en el medio selectivo agar MaConkey, 613 UFC se consideraron presuntivas de *Escherichia* y en el agar AP, 385 UFC fueron consideradas como presuntivas de *Pseudomonas*. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro XVIII. El primer valor de cada casilla representa el número total de UFC contados en el agar y dilución correspondiente y el segundo valor marcado entre paréntesis representa a las colonias presuntivas según las características de los agares empleados.

En algunos casos las UFC crecen tan pequeñas que resulta imposible contarlas y/o aislarlas por lo que se reportan como “incontables” y al igual que en las diluciones decimales seriadas se ponderó al valor más alto obtenido que en este caso fue 500 UFC.

Cuadro XVIII. Colonias presuntivas de los géneros *Escherichia* y *Pseudomonas* por el método de filtración por membrana.

	Dilución		Dil. 1/10		Dil. 1/100		Dil. 1/1000	Dil. 1/10000		Dil. 1/100000	Dil. 1/1000000	
3	Mc	E	500		500							
		S	500 (25)		500							
	AP	E	500		500							
		S	500 (25)		500							
4	Mc	E	79		1							
		S										
	AP	E	500	500	500	500						
		S	500	500	500	500						
5	Mc	E			500	500		500	500		12	6
		S			500	500		61	65		38	55
	AP	E			73	36		4	8		0	0
		S			105	64		13	12		2	1
6	Mc	E	500		500							
		S										
	AP	E	500		500							
		S										
7	Mc	E	0		0		0					
		S	0		0		0					
	AP	E	131 (12)		30 (3)		4 (1)					
		S	95 (7)		33 (2)		12 (1)					
8	Mc	E	500		500		500					
		Sec.	500		500		500					
		S	0		0		0					
	AP	E	500		500		500					
		S	19 (3)		3 (1)		2 (0)					
9	Mc	E					500	92 (25)		15		
		Sec.										
		S					0	0		0		
	AP	E					500	500		500		
		S					47 (14)	8 (3)		2		
10	Mc	E					500	500		500		
		Sec.	500		500		500					
		S	0		0		0					
	AP	E					500	500		100		
		S	170 (19)		115 (8)		46 (3)					
11	Mc	E					500	385 (27)		368 (58)		
		Sec.	500		500		500 (14)					
		S										
	AP	E					500	500		500		
12	Mc	E					500	500		123		
		Sec.					500	56 (1)		5(3)		
		S					0	0		0		
	AP	E					500 (7)	500 (1)		69		
		S					14 (5)	1		0		

Continuación cuadro XVIII...										
	Dilución		Dil. 1/10	Dil. 1/100	Dil. 1/1000	Dil. 1/10000	Dil. 1/100000	Dil. 1/1000000	Dil. 1/10000000	
13	Mc	E			500	500 (18)		75 (10)		
		Sec.			500	260 (39)		19 (8)		
		S			26	9 (1)		7 (1)		
	AP	E			500	500		424		
		Sec.			500	500		600 (1)		
		S			13 (2)	1		0		
14	Mc	E			500	500		339 (63)		
		Sec.			500	110 (41)		15 (4)		
		S			5 (1)	1		4 (2)		
	AP	E			500	500		500		
		Sec.			500	500		295		
		S			17 (5)	1		7 (2)		
15	Mc	E			500	500		185 (11)		
		Sec.			500	260 (30)		38 (2)		
		S			5 (1)	2		1		
	AP	E			500	500		500		
		Sec.			500	500		18 (5)		
		S			142 (21)	25 (2)		18 (2)		
16	Mc	E			500	500		356 (24)		
		Sec.			500	500		500		
		S			0	0		2 (1)		
	AP	E			500	500		500		
		Sec.			500	500		500		
		S			33 (3)	22 (7)		55 (9)		
17	Mc	E			500	500		500		
		Sec.			500	500		500		
		S			500	500		500		
	AP	E			500	500		500		
		Sec.			500	500		500		
		S			500	500		500		
18	Mc	E			500	402 (146)		180 (20)		
		Sec.			500	500		244 (1)		
		S			6	15 (1)		1		
	AP	E			500	500		420 (4)		
		Sec.			500	500		568 (3)		
		S			401(13)	46 (6)		14 (1)		
19	Mc	E				500		138(8)		32(4)
		Sec.				500		28(2)		23(2)
		S				0		0		1
	AP	E				500		500		266(5)
		Sec.				500		500		131(1)
		S					23(7)	5(10)		10(2)
20	Mc	E			500	500(1)		243		
		Sec.			500	20		3(1)		
		S			500	89(18)		87		
	AP	E			500	500		500		
		Sec.			500	263(9)		161(4)		
		S			128(11)	64(9)		55(1)		

En la tabla se muestran dos valores, primero las UFC totales que crecieron en los medios selectivos AP y agar MaConkey durante los 20 muestreos, y en segundo

lugar el valor entre paréntesis, que refiere a las UFC que dieron como presuntivas positivas tanto para *E. coli* como para *P. aeruginosa*.

Con la finalidad de obtener colonias totalmente aisladas de otras para realizar las pruebas bioquímicas confirmativas se sembró en cajas a partir de la dilución 1×10^{-3} . Algunas de las colonias presuntivas fueron tomadas para realizar las pruebas bioquímicas. Los resultados se muestran en el cuadro XIX.

Pruebas bioquímicas (confirmativas)

Cuadro XIX. Pruebas bioquímicas desarrolladas durante los muestreos y sus resultados.

Muestreo			Presuntivas	Analizadas	Indol		Rojo de		VogesPro		Citrato		OxidaciónF				Gelatina		Catalasa		
					Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	o/Tapón		s/tapón		Pos	Negativa	Pos	Negativa	
							A	SC	A	SC											
3	Mc	S	25	13	10	3	12	1		13	5	8									
	PA	S	25	1										1	1		1				
7	PA	E	16	16									6	10	3	6	10	6	16		
		S	10	10										3	7	3	3	3	7	9	1
8	PA	S	4	4									3	1	2	1	4			4	
9	Mc	E	25		muy pequeñas no determinadas																
	PA	S	17	17									15	2	8	3		17	14	3	
10	PA	S	30	30									6	24	6	17	9	21	24	6	
11	Mc	E	85		muy pequeñas no determinadas																
		Sec.	14																		
12	Mc	Sec.	4	1	1		1			1		1									
		PA	E	8		muy pequeñas no determinadas															
	PA	Sec.	2	2										2		1	1	1	1	1	1
		S	5	5										3	2	1	2	5		5	
13	Mc	E	28	6		6	6			6		6									
		Sec.	47	5		5	5			5		5									
		S	2	2		2	2			2		2									
	PA	Sec.	1	1														1		1	
S		2	2														2		2		
14	Mc	E	63		muy pequeñas no determinadas																
		Sec.	46	4	2	2	1	3			4		4								
		S	3	3		3	1	2			3		3								
	PA	S	7	7									3	4	3	1	3	4	7		
15	Mc	E	11																		
		Sec.	32	3	2	1	3			3		3									
		S	1	1	1		1			1		1									
	PA	Sec.	5	3										1	2	1		1	2	3	
S		25	9										5	4		5	5	4	9		
16	Mc	E	24	2	1	1	2			2		2									
		S	1	1	1		1			1		1									
PA	S	19	8										4	4	2	1	4	4	5	3	
17					muy pequeñas no determinadas																
18	Mc	E	166	1	1		1			1		1									
		Sec.	1	1	1		1			1		1									
		S	15	0																	
	PA	E	4	0																	
		Sec.	3	0																	
S	20	5											3	2	1	2	3	2	5		
19	Mc	E	12	1	1		1			1		1									
		Sec.	4	1	1			1			1		1								
	PA	E	5	0																	
		Sec.	131	1											1	1		1	1		
S	19	2											1	1	1		1		2		
20	Mc	E	1	1	1		1			1		1									
		Sec.	1	1	1		1			1		1									
		S	18	2	2		1	1			2		2								
	PA	Sec.	13	1										1		1		1		1	
S		21	3										3		1		1		3		
Total	suMac		628	49	26		41			48		44									
	SuPa		385	127										34		71				112	

Las celdas que refieren la leyenda “muy pequeñas, no determinadas” hace referencia a que el crecimiento de microorganismos fue excesivo como para poder distinguir una colonia de otra. Las celdas que están sombreadas son el número de UFC confirmados para *E. coli* y *P. aeruginosa* sin multiplicar por el factor de dilución.

E. coli

El promedio de crecimiento de UFC confirmadas mediante las pruebas bioquímicas de *E. coli* para el AR, ART y del agua residual tratada sin cloro (Sec.) se ilustran en la figura 10. Para validar las pruebas bioquímicas IMViC se sembró la cepa certificada ATCC 23922.

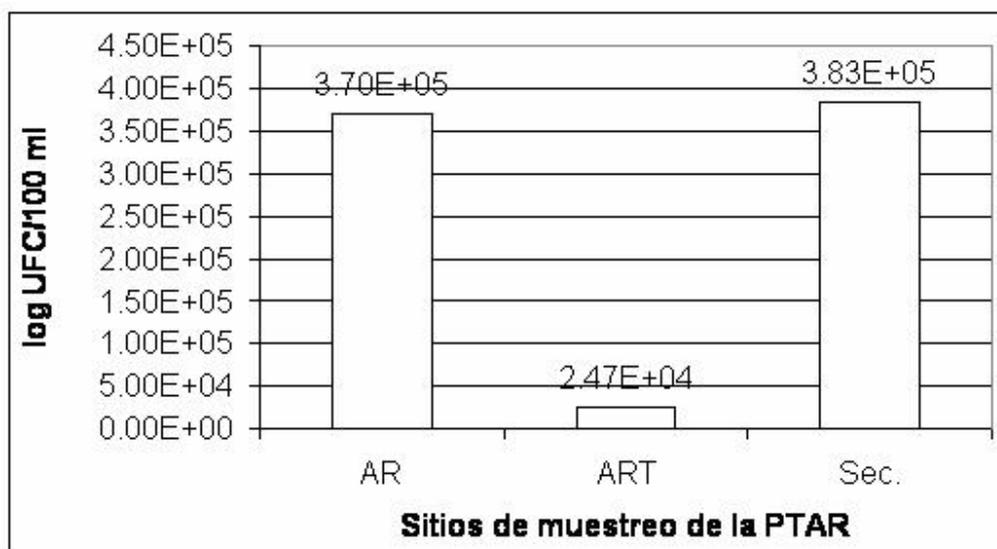


Figura 10. Promedio de crecimiento de UFC de *E. coli* al ser analizadas con las pruebas bioquímicas.

Para el AR el promedio de crecimiento de la cepa *E. coli* fue de 3.70 E+05, mientras que para el ART fue de 2.47 E+04 y para el agua residual tratada sin cloro (Sec), el crecimiento fue de 3.83 E+05. La disminución en el número de UFC

de *E. coli* es evidente después de aplicar el tratamiento y agregar el desinfectante (ART).

P. aeruginosa

En la figura 11 se ilustra el promedio de crecimiento de UFC confirmadas por las pruebas bioquímicas para *P. aeruginosa* durante los 20 muestreos para el AR, ART y del agua residual tratada sin cloro del estanque secundario (Sec.)

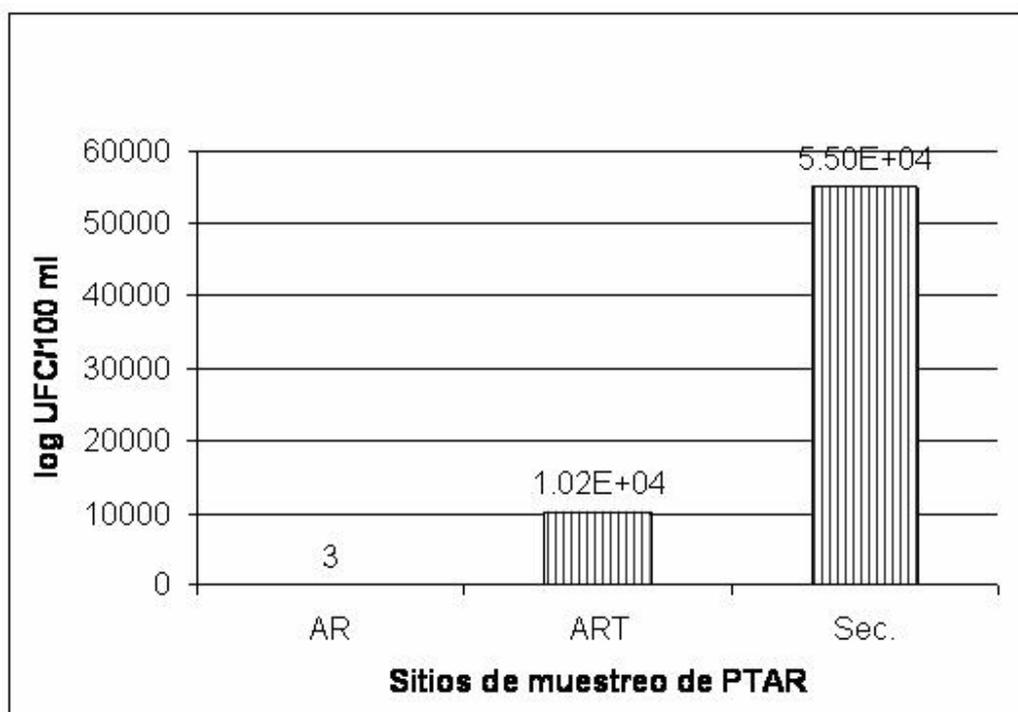


Figura 11. Promedio de crecimiento de UFC de *P. aeruginosa* al ser analizadas con las pruebas bioquímicas.

Para el AR el promedio de crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* fue de 3 UFC, mientras que para el ART fue de 1.02 E+04 y para el agua residual tratada sin cloro, el crecimiento promedio fue de 5.50 E+04. En la figura 11 se observa que el tratamiento de lodos activados es más eficaz si se aplica un desinfectante, ya que la existencia de las UFC disminuye considerablemente al adicionar hipoclorito de

sodio (ART), mientras que en el agua tratada sin clorar (Sec.) se presentó un mayor crecimiento de UFC.

Los valores estadísticos obtenidos para las UFC de *E. coli* y *P. aeruginosa* indica que los valores mínimo, máximo y la desviación estándar en cada dilución para las UFC dieron positivo después de las pruebas bioquímicas. Los resultados se muestran en el cuadro XX y XXI.

Cuadro XX. Valores estadísticos para *E. coli*

	<i>E. coli</i>														
	1/10			1/100			1/1000			1/10000			1/100000		
	Mín.	Máx.	σ	Mín.	Máx.	σ	Mín.	Máx.	σ	Mín.	Máx.	σ	Mín.	Máx.	σ
E	30	30	0												
Sec.										10000	10000	0	100000	100000	0
S	10	30	10	100	200	70.71	1000	7000	2489.98	10000	20000	5000			

Cuadro XXI. Valores estadísticos para *P. aeruginosa*.

	<i>Pseudomonas</i>																	
	1/10			1/100			1/1000			1/10000			1/100000			1/1000000		
	Mín.	Máx.	σ	Mín.	Máx.	σ	Mín.	Máx.	σ	Mín.	Máx.	σ	Mín.	Máx.	σ	Mín.	Máx.	σ
E										10000	10000	0	100000	100000	0	1000000	1000000	0
Sec.										10000	20000	7071.07	100000	200000	57735.03	1000000	1000000	0
S	80	80	0	200	200	0	1000	1000	0	20000	20000	0	100000	100000	0			

Pruebas con hipoclorito de sodio al 11%

Escherichia

Como se muestra en la figura 12 al incrementar la concentración del hipoclorito de sodio, disminuyen las UFC del género *Escherichia*, después del tiempo de retención (T_R) de 20 minutos. Empleando una concentración de 8 mg/l hubo una disminución de UFC de 80.3%, a 20 mg/l la disminución de UFC fue de 99.39%,

mientras que a la máxima concentración del desinfectante (30 mg/l) se observó una disminución en el número de UFC de 100 %.

Los porcentajes de disminución se obtuvieron empleando la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{T_0 - T_1}{T_0} \times 100$$

Donde

%= porcentaje de remoción.

T_{R0}= no. de UFC a tiempo de retención 0 minutos

T_{R1}= no. de UFC a tiempo de retención 20 minutos

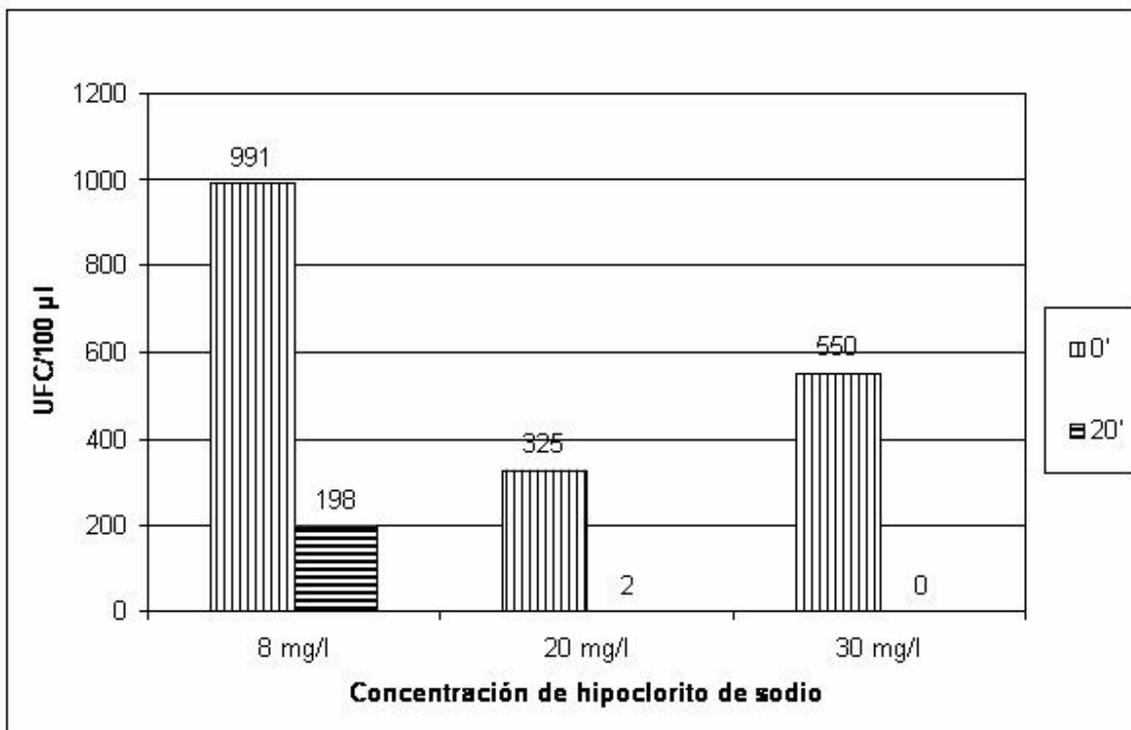


Figura 12. Resistencia de microorganismos aislados del género *Escherichia* a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. T_R= 0' y 20' en agar de doble capa (soya tripticasa-MaConkey). Donde T_R= tiempo de retención.

Pseudomonas

Como se muestra en la figura 13, en el conteo inicial $T_{R0} = 0$ minutos el género *Pseudomonas* fue más homogéneo al realizar los ensayos. De la misma manera se dejó actuar el desinfectante 20 minutos. A la concentración más baja del desinfectante (8 mg/l) después del tiempo de retención la disminución de UFC fue de 74.57%, a la concentración de 20 mg/l se observa una disminución de UFC de 82.13% y finalmente, a la máxima concentración del desinfectante (30 mg/l) existió una disminución en el número de UFC de 90.54%.

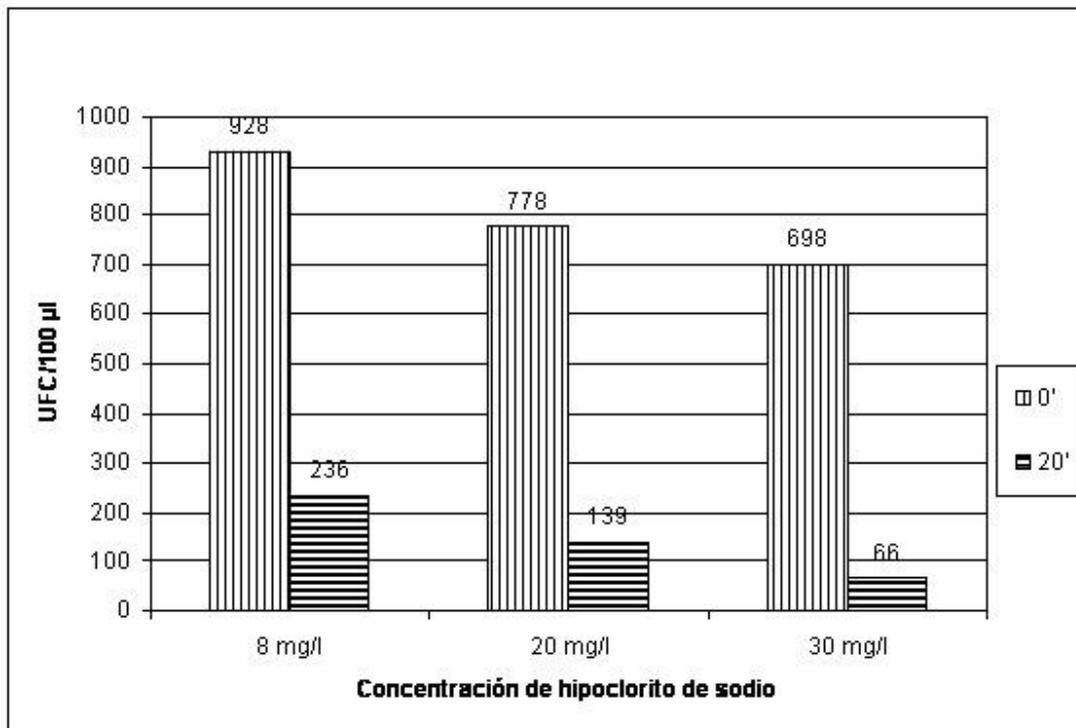


Figura 13. Resistencia de microorganismos aislados del género *Pseudomonas* a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. $T_R = 0'$ y $20'$ en agar de doble capa (soya tripticasa-AP).

6 Discusión

Conteo de colonias

Al realizar el conteo de UFC en las cajas de cultivo correspondientes a las diluciones decimales seriadas se encontró que existe un mayor crecimiento bacteriano en el agua residual tratada sin cloro ($1.09 \text{ E}+07 \text{ UFC}/100 \mu\text{l}$) en comparación a la del agua residual tratada con hipoclorito al 11% ($4.10 \text{ E}+06 \text{ UFC}/100 \mu\text{l}$). El agar para cuenta estándar da una idea del contenido total de todos los microorganismos mesófilos aerobios presentes capaces de crecer a 37°C en la muestra de agua. Indirectamente implica la necesidad de aplicar o no un desinfectante a determinada concentración y tiempo de retención al agua residual previamente tratada, hasta confirmar la presencia de microorganismos patógenos. Aun cuando el hipoclorito no elimina de forma eficaz a todos los microorganismos existentes en el agua tratada, su aplicación tiene un impacto ya que disminuye notoriamente la población bacteriana.

Conociendo previamente la importancia médica y de riesgos para la salud humana que tienen los microorganismos de los géneros bacterianos *Escherichia* y *Pseudomonas* se buscó únicamente la identificación y cuantificación de estos agentes patógenos después de haber dado el tratamiento de lodos activados al agua residual, usando los medios selectivos, que como su nombre lo indica permiten el desarrollo de un cierto grupo de bacterias.

En los primeros días que se tomaron las muestras de agua, estaba funcionando el dispensador por goteo de hipoclorito de sodio, mientras que en el muestreo 3, este

no funcionaba lo que influyó para que crecieran colonias en las diluciones correspondientes a la salida, caso contrario a los dos primeros muestreos.

Pruebas bioquímicas (confirmativas)

E. coli

Al realizar las pruebas bioquímicas se observó que el AR llevaba una importante carga de agentes patógenos, en este caso microorganismos de la especie *E. coli*. Se espera que, después de aplicar el tratamiento de desinfección, se elimine o reduzca el número de microorganismos de acuerdo con los límites establecidos por la NOM-003, que expone como número máximo permisible de coliformes fecales 240 NMP/100ml en contacto directo y 1000 NMP/100ml en contacto indirecto u ocasional con el hombre, en el caso de la UE la normativa relativa a la calidad de agua superficial destinada a la producción de agua para alimentación contempla los siguientes parámetros microbiológicos: coliformes totales de 50 a 50,000 UFC /100ml; coliformes fecales de 20 a 20,000 UFC /100ml. Otra normativa que hace referencia a la calidad de las aguas destinadas a baños contempla coliformes totales 500 UFC/100ml y coliformes fecales 100 UFC/100ml (Hernández, 2001).

Al analizar los resultados obtenidos para *E. coli* se observa que los valores del AR, ART y sin cloro fueron: 3.70 E+05, 2.47 E+04 y 3.83 E+05 UFC/100ml, respectivamente. El porcentaje de depuración de microorganismos en el ART

corresponde 93.3% en comparación con la calidad del AR, como se esperaba el valor es alto, ya que la planta cuenta con un sistema de desinfección.

Pseudomonas. La presencia de microorganismos del género *Pseudomonas* en el agua residual después del tratamiento de lodos activados es muy significativo para ambos casos: el ART con cloro contenía en promedio 1.02 E+04 UFC/100 ml y el ART sin cloro contenía en promedio 5.50 E+04 UFC/100 ml. El porcentaje de remoción de los microorganismos en el ART fue de 81.45% en comparación con el agua tratada sin cloro. En comparación con *E. coli* el valor de remoción es menor, lo que confirma la necesidad de incluir nuevos indicadores. Desafortunadamente no existe en México una normativa que establezca una medida estándar para comparar si los datos anteriores están o no dentro de un límite máximo permisible. En contraste con la UE la normativa relacionada con la calidad de las aguas destinadas al consumo humano establece como máximo 0 UFC/250ml al igual que *E. coli* y *Enterococcus* (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1998). En contraste, los resultados del presente estudio demuestran una cantidad considerable de microorganismos de *P. aeruginosa* en el agua residual tratada que se destina a riego de áreas verdes. La ausencia de estudios epidemiológicos en México relativos a *P. aeruginosa* provoca que no se tengan parámetros para determinar si las aguas analizadas en este trabajo son de alto o bajo riesgo para la salud humana.

Aunque en México ningún tratamiento realizado en el agua residual está enfocado a la eliminación de patógenos oportunistas como *P. aeruginosa* pese a su importancia médica, es imposible negar su presencia en cantidades significativas.

Pruebas con hipoclorito de sodio al 11%

Al analizar los datos se observa que los microorganismos del género *Escherichia* presentan una supervivencia del 0% al incrementar la concentración del hipoclorito (8 mg/l, 20 mg/l y 30 mg/l) por lo que la eficacia del desinfectante es mayor a tiempo de retención (20 minutos) en el agua residual. Estos resultados son de gran importancia si se considera que actualmente la cantidad de hipoclorito recomendada oscila entre 15 mg/l y el disminuir o aumentar la dosis afecta la supervivencia de estos microorganismos.

Ocurre algo similar con los microorganismos del género *Pseudomonas*, en cuanto a su comportamiento frente a la concentración del desinfectante y a su tiempo de retención con pequeña diferencia debido a que se ve una disminución de la población al aumentar la concentración del desinfectante. Como se observa en la figura 11 los microorganismos no son totalmente eliminados del agua residual a pesar de la máxima concentración empleada (30 mg/l), aún con el tiempo de retención (20 minutos). En este caso se obtiene un porcentaje de 9.5% de supervivencia comparado con la eliminación total de los microorganismos del género *Escherichia*. La importancia de este valor confirma la necesidad de considerar en las normativas referentes a la calidad de agua residual otros microorganismos diferentes a los indicadores tradicionales, tal es el caso de patógenos oportunistas como *Pseudomonas*.

7 Conclusiones

- Es claro que organismos de los dos géneros bacterianos de interés en este estudio (*Escherichia* y *Pseudomonas*), son aislados y cuantificados con facilidad en el agua residual y residual tratada con cloro y sin cloro de la planta de tratamiento del I. T. E. S. M., campus Hidalgo.
- Se detectaron especialmente microorganismos de las especies *E. coli* y *P. aeruginosa* gracias a las pruebas confirmativas.
- En el caso de *E. coli* su presencia después del tratamiento fue mayor al aceptado en México (NOM-003-SEMARNAT-1997).
- El tratamiento de lodos activados y el posterior a la desinfección que se realiza en la planta de tratamiento en cuanto a parámetros microbiológicos no es cien por ciento eficaz. Por lo tanto, el agua que se destina al riego de camellones y jardines (en las instalaciones del I.T.E.S.M) podría representar un potencial riesgo de salud, ya que se encontraron cantidades potencialmente nocivas de microorganismos de *E. coli* y *P. aeruginosa*.
- Aunque en México ningún tratamiento realizado en el AR está enfocado a la eliminación de patógenos oportunistas como *Pseudomonas* pese a su importancia médica, es imposible negar su presencia en cantidades significativas después de aplicar el tratamiento por lodos activados en la planta de tratamiento del I. T. E. S. M., campus Hidalgo.
- Al someter a organismos del género *Pseudomonas* y *Escherichia* a diferentes concentraciones del desinfectante y tiempo de retención 20 minutos, se encontró que los primeros presentan mayor resistencia al desinfectante pues soportaron las variantes más extremas del tratamiento.

8 Perspectivas

El actual ritmo de vida y el aumento poblacional han hecho que el consumo de agua se incremente no sólo para consumo humano sino también para riego e industrias. Es por ello que el reuso de un agua de calidad aceptable que no represente riesgos para la salud se ha convertido en una práctica común a nivel mundial; lo que ha llevado a un mejoramiento en los tratamientos físicos, químicos y biológicos aplicados al agua residual (Pérez *et al.*, 1999). Sin embargo, es necesario incluir otros indicadores biológicos para evaluar la calidad del agua.

Para que en el futuro se pueda incluir al género *Pseudomonas* como un indicador de la calidad del ART, es necesario ampliar el número de muestreos en diferentes depuradoras, de ser posible, en toda la República. Asimismo, relacionar la presencia de estos organismos con la aparición de brotes epidemiológicos de infecciones gastrointestinales de cada localidad.

En el futuro sería conveniente que se contemplaran además de huevos de helminto y coliformes fecales a los patógenos oportunistas como indicadores para evaluar la calidad del ART, con la finalidad de ver disminuidos los brotes de infecciones intestinales, sobretodo en los sectores de la población más susceptibles a dichas enfermedades, como lo son personas de bajos recursos e inmunosuprimidas.

Es apropiado considerar que el I.T.E.S.M. realice análisis microbiológicos rutinarios a su planta de tratamiento para evaluar la calidad del agua y garantizar así su reuso.

9 Referencias

- Ammon A. 1997. **Vigilancia de infecciones para *E. coli* enterohemorrágico (ECEH) y del síndrome hemolítico urémico (SHU) en Europa.** Eurosurveillance. 2 (12): 91-96.
- Bartelt, A. M. 2000. **Diagnostic Bacteriology. A study guide.** F. A. Davis Company, Philadelphia p. 156-157.
- Borrego, J. y J. Figueras. 1997. **Microbiological quality of natural water. Microbiología SEM.** 13: 413-426.
- Brull, M. 1994. **Enfermedades de origen hídrico.** En: XV Jornadas Técnicas de la AEAS. Tomo I. Jerez de la Frontera, España. pp. 99.
- Cabo J. R. y L. J. Catalán. 1972. **Bacteriología y potabilidad del agua.** Imprenta de la Balsa. Madrid, España. p. 90-93.
- Carpenter L. P. 1969. **Microbiología.** Interamericana México D. F. pp. 421.
- CNA. 2000a. **El agua en México: retos y avances.** SEMARNAP
- CNA. 2000b. Gerencia Estatal Hidalgo, tipos de tratamiento. pp. 16.
- CNA. 2003. **Estadísticas del Agua en México.** México D. F. p. 62-63
- CNA gerencia estatal de Hidalgo. 2000. **Inventario de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales.**
- Cohn, D. P., Cox, M. y S. P. Beger. 2002. **Aspectos de la calidad del agua. Salud y estética. En: Calidad y tratamiento del agua.** Manual de suministros del agua. AWWA. Ed. McGraw-Hill, España. p. 47-64.
- De Victorica, J. y M. Galván. **2001. *Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption. Water Science and Technology. 43: 49-52.**

- Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 1998. **Directiva 98/83/CE del Consejo, de 03 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.**
- Echarri G. Ma. I. y G. J. A. Etxebarria. 1996. Eliminación de microorganismos en las diferentes etapas del proceso de tratamiento (E. T. A. P. de Venta Alta). **Microbiología de las aguas de abastecimiento.** Asociación Española de Abastecimientos de Agua y Saneamiento. Madrid. 1:139-161.
- Egli T., Köster, W. y L. Meile. 2002. **Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges.** FEMS Microbiology Reviews. 26: 111-112.
- Engel U. R., Cruz, J. I. y G. A. Ramírez. 2002. **Proyecto de tratamiento de aguas residuales y usos alternos de aguas tratadas en el Tecnológico de Monterrey.** I.T.E.S.M., campus Hidalgo. Pachuca, México.
- Fawell, J. K. 1995. **Guías para la calidad del agua potable. Recomendaciones.** Vol. 1 Organización Mundial de la Salud. Ginebra. pp 195.
- Granados P. R. y P. Ma. C. Villaverde. 1998. **Microbiología: bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Micología general, parasitología general.** Paraninfo, Madrid. pp. 365.
- Hernández, A. 2001. Depuración y desinfección de aguas residuales. Colección Señor, número 9. Colegio de I.C.C. y P. Madrid, pp. 1151.
- Hernández L. A. 2002. **Manual de diseño de estaciones depuradoras de aguas residuales.** Colegio de ingenieros de caminos, canales y puertos. España. P. 11-86.

- Holt, G. J., Krieg, R. N., Sneat, A. H. P., Staley T. J. y T. S. Williams. 1994. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9ª. Edición. Ed. Williams & Wilkins. Maryland. pp 787.
- INEGI, 2005. Tomado de la página de internet: www.inegi.gob.mx
- Ingraham L. J. e Ingraham A. C. 1998. **Introducción a la microbiología**. Ed. Reverté, Barcelona. 2: 710-713
- Jawetz E., Melnick L. J. y Adelberg A. E. 1996. **Microbiología médica**. Manual Moderno, México D. F. p. 249-262.
- Joklik K. W., Willett P. H. y M. C. Wilfert. 1992. **Zinsser Microbiología**. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. pp. 1696.
- Lanza de la, E. G. 2000. **Organismos indicadores para la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores)**: Criterios generales para la elección de bioindicadores. CNA. P y V. Editores, México D. F. p. 17-41.
- Madigan, M; Martinko, J. y Parker, J. 1998. **Biología de los microorganismos**. Prentice may, España. pp. 986
- Margall, N., Domínguez, A., Prats, G. y Salleras, L. 1997. *Escherichia coli* enterohemorrágica. Ref. Esp. Salud Pública. 5(71): 437-443.
- Margulis, L. y Schwartz, K. V. 1998. **Five Kigdoms. An illustrated guide to the phila of life on Earth**. W.H. Freeman and Company. New York. p. 41-53.
- Millipore. 2005. **Análisis microbiológico**. Catálogo de proveedor. Madrid, España. pp 48.
- Nigel, J. H. 2003. **Faecal Indicador Organisms**. The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. 7: 105-112.
- NMX-AA-003-1980. Aguas residuales muestreo.

- NMX-AA-007-SCFI-2000. Análisis de agua-determinación de la temperatura-en aguas naturales, residuales tratadas-método de prueba.
- NMX-AA-008-SCFI-2000, análisis de agua-determinación del pH-método de prueba.
- NOM-001-SEMARNAT- 1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación (DOF), 6 de enero de 1997.
- NOM-002-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. DOF, 3 de junio de 1998.
- NOM-003-SEMARNAT-1997. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se rehúsen en servicios al público. DOF, 21 de septiembre de 1998.
- Pérez, L. J. A. y Espigares, G. M. 1999. **Estudio sanitario del agua**. 2ª edición. Ed. Universidad de Granada, España. PP. 454.
- Poch, E. M. 1999. Las calidades del agua. 1ª edición. Ed. Rubes, S. L. Barcelona, España. PP.159.
- Ramírez, R. M., Luna, B., Mejía, A., Velásquez, O., Tsuzuki, G., Vierna, L., Hernández, L. y I. Müggenburg. 1998. **Práctica no. 7 Cuantificación de Microorganismos. En Manual de prácticas de microbiología general.** Facultad de química, UNAM. México. p. 135-141.
- Ramírez, R. M., Luna, B., Mejía, A., Velásquez, O., Tsuzuki, G., Vierna, L., Hernández, L. y I. Müggenburg. 1998. **Práctica no. 3 Estudio microscópico**

de los microorganismos. Manual de prácticas de microbiología general.

Facultad de química, UNAM. México D. F. p. 28-51.

- RIPDA. 2004. **Indicadores de Contaminación Fecal en Agua.** Capítulo 20. Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua.
- Rutala, W. A., y D. J. Weber. 1997. **Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities.** Clinical Microbiology Reviews. 10: 597-610.
- Stampi, S., De Luca, G., y Zanetti, F. 2001. **Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents.** Journal of Applied Microbiology. 91: 833-838.
- Starr C., y R. Taggart. 2001. **Biology the unity and diversity of life.** 9ª edición. Editorial Brooks/Cole U. S. A. pp. 354-363.
- Swaminathan,B; Beebe,J y Besser, J. 1999. **Investigation of foodborne and water borne disease outbreaks.** Capítulo 10. En Manual of clinical microbiology. American Society of microbiology. Washington, D.C. 7ª Ed. P 174-190

Páginas de internet

- Book of bacteriology, tomado de la página de internet: <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
- CNA. 2005. **Estadísticas del agua en México.** Página de internet: <http://www.cna.gob>. Capítulos 4-6.
- CEPIS-OPS. En coordinación con la Organización Mundial de la Salud (oms). 2002. Página de internet: <http://www.cepis.ops-oms.org/>. 2002.

- Determinación y cuantificación de coliformes y *E. coli*. 2005. Tomado de la página de internet: http://www.google.com.mx/search?q=cache:yIfIZn11-8UJ:veterinaria.unex.es/microali/Ecoli.htm+IMVIC&hl=es&lr=lang_es&ie=UTF-8
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 1991. **Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.**, página de internet: http://www.mediterranea.org/cae/direct_91_271_cee_aguas_resid_urbanas.htm
- DIBICO. 2002. **Medios de cultivo. Bacteriología general.** Página de internet <http://www.dibico.com>,
- <http://people.ku.edu/~jbrown/ecoli.html>. 2005.
- <http://www.eurosurveillance.org/em/v02n12/0212-321.asp>. 1999.
- SINAVE. 2006. Pág. De internet: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletín/2006/sem15/pdf/>
- Weber, S. 2001. **Ecthyma gangrenosum and *Pseudomonas aeruginosa*.** Beth Israel Deaconess Medical Center. Página de internet: <http://doe.unimo.it/jo/GIUSEPPE/Foto%20Roberto/Pancani/Ecthima%20gangrenosum.pdf>

10 ANEXO. Composición química de agares y soluciones.

Se muestran los componentes químicos con que se preparó cada agar o solución, así como las cantidades y tiempos de preparación. También se incluyen los procedimientos empleados y en los casos necesarios las temperaturas de almacenamiento o manejo.

<p style="text-align: center;">*Agar Citrato de Simmons</p> <p style="text-align: right;">(g)</p> <p>Citrato sódico 2</p> <p>Amonio di-hidrogenofosfato 1</p> <p>Azul de bromotimol 0.08</p> <p>Sulfato de magnesio 0.2</p> <p>Fosfato dipotásico 1</p> <p>Cloruro de sodio 5</p> <p>Agar bacteriológico 15</p> <p>pH 6.9</p> <p>Preparación: agregar a la mezcla 1L de agua destilada. Calentar agitando hasta hervir durante 1 min. Distribuir volúmenes de 3 ml en tubos de ensaye. Esterilizar en autoclave a 121 ° C x 10 min. Agar inclinado. Conservar en refrigeración de 2° C a 8 ° C.</p>	<p style="text-align: center;">* Agar de MaConkey</p> <p style="text-align: center;">Laboratorio DIBICO.</p> <p style="text-align: right;">(g)</p> <p>Agar 13.5</p> <p>Cloruro de sodio 5</p> <p>Cristal violeta 0.001</p> <p>Lactosa 10</p> <p>Mezcla de sales biliares 1.5</p> <p>Peptona especial 3</p> <p>Peptona de gelatina 17</p> <p>Rojo neutro 0.03</p> <p>pH 7.1 +/- 0.2</p> <p>Preparación: 50 gramos del medio más 1 lt de agua destilada. Calentar agitando hasta hervir por 1 min. Esterilizar a 121° C x 15 min. Vaciar a cajas Petri. Conservar en refrigeración de 2° C a 8° C.</p>
<p style="text-align: center;">*Agar para cuenta estándar</p> <p style="text-align: center;">Laboratorio BBL</p> <p style="text-align: right;">(g)</p> <p>Enzima pancreática de caseína 5</p> <p>Extracto Levadura 2.5</p>	<p style="text-align: center;">*Agar Pseudomonas (AP)</p> <p style="text-align: center;">Laboratorio DIBICO</p> <p style="text-align: right;">(g)</p> <p>Gelatina reducida por enzimas pancreáticas 20</p>

<p>Dextrosa 1</p> <p>Agar 15</p> <p>Preparación: suspender 23.5 g de polvo en 1 Lt de agua destilada. Calentar agitando hasta hervir por 1 min. Esterilizar en autoclave a 121° C x 15 min. Verter en cajas Petri, almacenar de 2° a 10° C.</p>	<p>Cloruro de magnesio 1.4</p> <p>Sulfato de potasio 10</p> <p>Agar 13</p> <p>pH 7.2 +/- 0.2</p> <p>Preparación: suspender 45 g de polvo en 1 Lt de agua destilada. Calentar agitando hasta hervir por 1 min. Esterilizar en autoclave a 121° C x 15 min. Verter en cajas Petri, almacenar de 2° a 10° C.</p>
<p>*Agar de Soya Trypticasa</p> <p>laboratorio BBL Becton Dickenson</p> <p>(g)</p> <p>Enzimas pancreáticas de caseína 15</p> <p>Peptona de soya 5</p> <p>Cloruro de sodio 5</p> <p>Agar 15</p> <p>pH 7.3 +/- 0.2</p> <p>Preparación: suspender 40 g del polvo en 1 L de agua destilada, mezclar. Calentar agitando hasta hervir x 1 min. Esterilizar en autoclave a 121° C x 15 min. Verter en tubos de ensaye con tapa. Agar inclinado.</p>	<p>*Agua peptonada</p> <p>(g)</p> <p>Peptona de caseína 10</p> <p>Cloruro de sodio 5</p> <p>Difosfato de potasio 5</p> <p>pH 7.3</p> <p>Preparación: agregar a la mezcla 1L de agua destilada. Distribuir volúmenes de 5 ml en tubos de ensaye. Esterilizar en autoclave a 121 ° C x 10 min. Conservar en refrigeración de 2° C a 8 ° C.</p>
<p>*Catalasa</p> <p>BAM</p> <p>(ml)</p> <p>Peróxido de hidrógeno al 30 % 50</p>	<p>*Gelatina nutritiva</p> <p>(g)</p> <p>Peptona 10</p> <p>Extracto de carne 3</p> <p>Cloruro de sodio 5</p>

<p>Preparación: el peróxido se guarda en frasco gotero.</p>	<p>Gelatina 10</p> <p>Preparación: agregar a la mezcla 1L de agua destilada. Calentar agitando hasta hervir por 1 min. Distribuir volúmenes de 3 ml en tubos de ensaye. Esterilizar en autoclave a 121 ° C x 10 min. Conservar en refrigeración de 2° C a 8 ° C.</p>																								
<p style="text-align: center;">*Medio MR-VP Laboratorio Bioxon</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 80%;"></th> <th style="width: 20%; text-align: center;">(g)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Peptona de Caseína</td> <td style="text-align: center;">3.5</td> </tr> <tr> <td>Peptona de carne</td> <td style="text-align: center;">3.5</td> </tr> <tr> <td>Dextrosa</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td>Fosfato dipotásico</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> </tbody> </table> <p>pH 6.9 +/- 0.2</p> <p>Preparación: suspender 17 g del polvo en 1 Lt de agua destilada. Calentar agitando hasta hervir por 1 min. Distribuir en tubos de ensaye 5 ml. Esterilizar en autoclave a 121° C x 15 min.</p>		(g)	Peptona de Caseína	3.5	Peptona de carne	3.5	Dextrosa	5	Fosfato dipotásico	5	<p style="text-align: center;">*Medio OF con sacarosa (de Hug Leifson) Laboratorio Meyer.</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 80%;"></th> <th style="width: 20%; text-align: center;">(g)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Agar</td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> <tr> <td>Azul de bromotimol</td> <td style="text-align: center;">0.08</td> </tr> <tr> <td>Cloruro de sodio</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td>Fosfato dipotásico</td> <td style="text-align: center;">0.3</td> </tr> <tr> <td>Sacarosa</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> <tr> <td>Triptosa</td> <td style="text-align: center;">2</td> </tr> </tbody> </table> <p>pH 6.8 +/- 0.2</p> <p>Preparación: 19.4 g del medio más 1 lt. De agua destilada. Reposar de 10 a 15 min. Calentar agitando hasta hervir por 1 min. Distribuir volúmenes de 5 ml en tubos de ensaye. Esterilizar en autoclave a 121 ° C x 10 min. Conservar en refrigeración de 2° C a 8 ° C.</p>		(g)	Agar	2	Azul de bromotimol	0.08	Cloruro de sodio	5	Fosfato dipotásico	0.3	Sacarosa	10	Triptosa	2
	(g)																								
Peptona de Caseína	3.5																								
Peptona de carne	3.5																								
Dextrosa	5																								
Fosfato dipotásico	5																								
	(g)																								
Agar	2																								
Azul de bromotimol	0.08																								
Cloruro de sodio	5																								
Fosfato dipotásico	0.3																								
Sacarosa	10																								
Triptosa	2																								
<p style="text-align: center;">Reactivo de Kovac BAM</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td>p-Dimetilaminobenzaldehído</td> <td style="text-align: center;">5 g</td> </tr> <tr> <td>Alcohol amilico (normal)</td> <td style="text-align: center;">75 ml</td> </tr> <tr> <td>HCl (concentrado)</td> <td style="text-align: center;">25 ml</td> </tr> </tbody> </table>	p-Dimetilaminobenzaldehído	5 g	Alcohol amilico (normal)	75 ml	HCl (concentrado)	25 ml	<p style="text-align: center;">*Reactivo de Voges Proskauer</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td>VPI) Hidróxido de potasio</td> <td style="text-align: center;">40 g</td> </tr> <tr> <td>Agua destilada</td> <td style="text-align: center;">100 ml</td> </tr> </tbody> </table>	VPI) Hidróxido de potasio	40 g	Agua destilada	100 ml														
p-Dimetilaminobenzaldehído	5 g																								
Alcohol amilico (normal)	75 ml																								
HCl (concentrado)	25 ml																								
VPI) Hidróxido de potasio	40 g																								
Agua destilada	100 ml																								

<p>Preparación: disolver p-imetilaminobenzaldehído en alcohol amilico normal. Adicionar lentamente HCl. Almacenar a 4°C.</p>	<p>Preparación: guardar en frasco ámbar.</p> <p>VP2) α-naftol 5 g</p> <p>Etanol al 95 % 100 ml</p> <p>Preparación: guardar en frasco ámbar.</p>
<p>*Rojo de metilo Laboratorio Meyer</p> <p>Rojo de metilo 0.1 g</p> <p>Etanol al 96 % 300 ml</p> <p>Agua 500 ml</p> <p>Preparación: mezclar y almacenar en frasco ámbar</p>	<p>*Solución salina isotónica 0.85%</p> <p>Cloruro de sodio 8.5 g</p> <p>Preparación: agregar un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121° C x 15 min.</p>
<p>*Tiosulfato de sodio anhídrido</p> <p>Agua destilada 90 ml</p> <p>Tiosulfato de sodio 10 g</p> <p>Preparación: mezclar el agua (90 ml) más el tiosulfato de sodio (10 g) para obtener una concentración al 10 % y almacenar en frasco ámbar en un lugar fresco.</p>	

11 Glosario

Abastecimiento público. Agua destinada para actividades industriales y agrícolas.

Actividad doméstica. Agua destinada a consumo humano (agua para beber e higiene personal).

Aguas residuales. Las aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas.

Aguas residuales tratadas. Son aquellas que mediante procesos individuales o combinados de tipo físicos, químicos, biológicos u otros, se han adecuado para hacerlas aptas para su reuso en servicios al público.

Contaminantes básicos. Son aquellos compuestos o parámetros que pueden ser removidos o estabilizados mediante procesos convencionales.

Contaminantes patógenos y parasitarios. Son los microorganismos, quistes y huevos de parásitos que pueden estar presentes en las aguas residuales y que representan un riesgo a la salud humana, flora o fauna.

Estresor. Agente físico, químico o biológico que altera o perturba las condiciones naturales de un ambiente.

Filtro verde. Pileta con plantas donde el agua corre a velocidad baja para eliminar residuos.

Lago artificial recreativo. Es el vaso de formación artificial alimentado con aguas residuales tratadas con acceso al público para paseos en lancha, prácticas de remo y canotaje donde el usuario tenga contacto directo con el agua.

Lago artificial no recreativo. Es el vaso de formación artificial alimentado con aguas residuales tratadas que sirve únicamente de ornato, como lagos en campos de golf y parques a los que no tiene acceso el público.

Lechos bacterianos. Película microbiológica que degrada la materia orgánica.

Límite máximo permisible. Valor o rango asignado a un parámetro, que no debe ser excedido por el responsable del suministro de agua residual tratada.

Promedio mensual (P.M.). Es el valor que resulta del promedio de los resultados de los análisis practicados a por lo menos dos muestras simples en un mes.

Reuso en servicios al público con contacto directo. Es el que se destina a actividades donde el público usuario esté expuesto directamente o en contacto físico.

Reuso en servicios al público con contacto indirecto u ocasional. Es el que se destina a actividades donde el público en general esté expuesto indirectamente o en contacto físico incidental y que su acceso es restringido, ya sea por barreras físicas o personal de vigilancia.

12 Abreviaturas

AR. Agua residual.

ART. Agua residual tratada

DBO₅. Demanda bioquímica de oxígeno.

DQO. Demanda química de oxígeno.

E. Entrada.

h/l. Huevos de helminto por litro.

IMViC. Corresponde a las siglas e inglés de; Indol, rojo de metilo, Voges

Proskauer y citrato

I. T. E. S. M. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores Monterrey.

NMP/100 ml. Coliformes fecales medidos como número más probable por cada 100 mililitros.

S. Salida.

Sec. Secundario.

SST. Sólidos suspendidos totales.

UFC. Coliformes fecales medidos como unidades formadoras de colonias por cada 100 mililitros.

P. Fósforo

N. Nitrógeno

13 Organigrama

