

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**MODELO ECOLÓGICO PARA REDUCIR LA CARGA DE AGENTES  
ENTEROPATÓGENOS MICROBIANOS PRESENTES EN EL  
PARQUE NACIONAL CASCADEA DE BASSASEACHIC,  
EN OCAMPO, CHIHUAHUA**

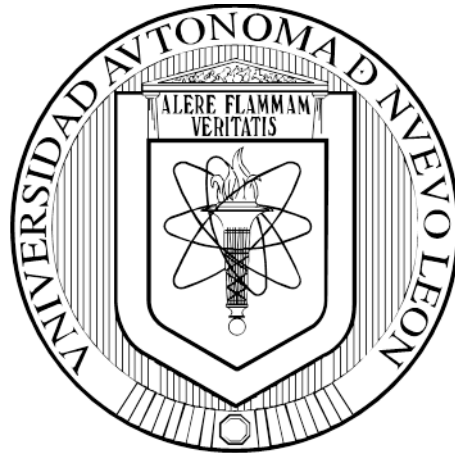
**POR**

**MARÍA CARMEN ELIZABETH DELGADO GARDEA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**JUNIO, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**TESIS**

**MODELO ECOLÓGICO PARA REDUCIR LA CARGA DE AGENTES  
ENTEROPATÓGENOS MICROBIANOS PRESENTES EN EL  
PARQUE NACIONAL CASCADA DE BASSASEACHIC,  
EN OCAMPO, CHIHUAHUA**

**POR**

**MARÍA CARMEN ELIZABETH DELGADO GARDEA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**JUNIO, 2016**

**MODELO ECOLÓGICO PARA REDUCIR LA CARGA DE AGENTES  
ENTEROPATÓGENOS MICROBIANOS PRESENTES EN EL  
PARQUE NACIONAL CASCADA DE BASSASEACHIC,  
EN OCAMPO, CHIHUAHUA**

**Comité de Tesis**

---

Dra. Patricia Tamez Guerra  
Presidente

---

Dr. Ricardo A. Gómez Flores  
Secretario

---

Dr. José Alberto Valadez Lira  
Vocal 1

---

Dra. Laura Trejo Ávila  
Vocal 2

---

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero  
Vocal 3

**MODELO ECOLÓGICO PARA REDUCIR LA CARGA DE AGENTES  
ENTEROPATÓGENOS MICROBIANOS PRESENTES EN EL  
PARQUE NACIONAL CASCADA DE BASSASEACHIC,  
EN OCAMPO, CHIHUAHUA**

**Dirección de Tesis**

---

Dra. Patricia Tamez Guerra  
Directora

---

Dra. Rocío Infante Ramírez  
Directora externa



## **AGRADECIMIENTOS**

El presente proyecto fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología, en la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, Facultad de Ciencias Biológicas (DEMI-FCB-UANL), y por la beca CONACyT (beca a MCEDG y el proyecto CB2010/155771 para PTG). En colaboración con la Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas y la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) proyecto UACH-CONANP (CONANP/DR03/08/PN01/PROCOCODES/1259/13) to RIR.

## **DEDICATORIA**

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 Parque Nacional Cascada de Bassaseachic.....	3
2.2 El agua como recurso no renovable.....	3
2.3 Fuentes de abastecimiento de agua potable. ....	4
2.4 Importancia de la Calidad de agua. ....	5
2.5 Bacterias contaminantes del agua. ....	6
2.6 Virus contaminantes en agua.....	10
2.7 Determinación de microorganismos en agua.....	14
2.8 Métodos de concentración de patógenos en agua.....	16
2.9 Métodos de Potabilización de agua.....	18
<b>3 HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>4 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>22</b>
<b>5 OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>22</b>
<b>6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>23</b>
<b>7 METODOLOGÍA.....</b>	<b>24</b>
7. Muestreo.....	24
7.1 Análisis Físico-Químico.....	24
7.1.1 pH (NMX-AA-008-SCFI-2011).....	24
7.1.2 Conductividad eléctrica (NMX-AA-093-SCFI-2000).....	24
7.1.3 Cloruros (NMX-AA-073-SCFI-2001).....	25
7.1.4 Dureza total (NMX-AA-072-SCFI-2001).....	25
7.1.5 Alcalinidad (NMX-AA-036-SCFI-2001 12).....	26
7.1.6 Acidez (NMX-AA-036-SCFI-2001 12).....	27
7.2 Conteo de coliformes fecales y totales (PROY-NMX-AA-042-SCFI-2005)....	27
7.3 Análisis estadístico para conteo de coliformes fecales y totales, por punto de muestreo y época del año. ....	28
7.4 Aislamiento de bacterias enteropatógenas. ....	28
7.5 Identificación bioquímica de bacterias enteropatógenas. ....	30
7.6 Técnica de adsorción-elución de virus (VIRADEL).....	30
7.7 Muestras control para captura de virus.....	31
7.8 Preparación de controles internos virales.....	31
7.8.1 Preparación del inserto a clonar.....	32
7.8.2 Reacción de ligación. ....	32
7.8.3 Transformación de células competentes JV109. ....	33
7.9 Extracción de RNA por el método de TRIZOL. ....	33
7.10 Determinación de RV por RT-PCR punto final.....	34
7.10.1 Condiciones de RT para detección de RV.....	34
7.10.2 Condiciones para la PCR para detección de RV.....	35
7.11 Determinación de NV por RT-PCR punto final.....	36
7.11.1 Condiciones de RT para detección de NV.....	36
7.11.2 Condiciones para la PCR para detección de NV.....	37

7.12 Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	38
7.13 Preparación de la Curva de calibración para qPCR de NV y RV.....	38
7.14 Determinación de RV por RT-qPCR SYBR ® Green.....	41
7.14.1 Condiciones de qPCR SYBR ® Green. Detección de RV.....	41
7.15 Determinación de NV por RT-qPCR SYBR ® Green.....	43
7.15.1 Condiciones de qPCR SYBR ® Green. Detección de NV.....	43
7.16 Análisis filogenético de muestras positivas.....	44
7.17 Diseño del prototipo del generador de Cloro.....	45
7.18 Determinación de Cloro disponible.....	46
7.19 Estandarización del prototipo del generador de cloro.....	46
7.20 Análisis estadístico de los resultados del generador de cloro. ....	47
7.21 Diseño del prototipo de membranas de UF.....	47
7.22 Método de prueba para evaluar la eficiencia en reducción bacteriana.....	48
7.22.1 Preparación de cultivos y sub-cultivos de referencia.....	48
7.22.2 Preparación del agua de prueba.....	48
7.22.3 Evaluación de la reducción bacteriana.....	49
7.23 Determinación de mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994).....	49
<b>8 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
8.1 Análisis hidro-geográfico de la zona de estudio. ....	51
8.2 Análisis poblacional del área de estudio.....	54
8.3 Toma de muestras. ....	54
8.4 Análisis de calidad de agua.....	56
8.4.1 Análisis de pH y conductividad.....	56
8.4.2 Análisis físicoquímico. Muestreo de Primavera.....	57
8.4.3 Análisis físicoquímico. Muestreo de Verano.....	60
8.4.4 Análisis físicoquímico. Muestreo de Otoño.....	61
8.4.5 Análisis físicoquímico. Muestreo de Invierno.....	61
8.4.6 Conteo de coliformes fecales y coliformes totales en agua.....	62
8.4.7 Análisis estadístico de coliformes fecales y coliformes totales en agua.....	63
8.4.8 Caracterización Microbiológica.....	65
8.4.9 Identificación bioquímica de microorganismos aislados.....	67
8.4.10 Contaminación de microorganismos a través de los efluentes.....	68
8.4.11 Perfil de resistencia a antibióticos.....	68
8.5 Controles internos virales para las curvas de calibración de RT-qPCR.....	69
8.6 Extracción de RNA de muestras de agua.....	70
8.6.1 Extracción de RNA. Muestreo individual de Otoño.....	71

8.6.2 Extracción de RNA. Pool de muestras.....	72
8.7 Detección de RV y NV por RT-PCR punto final.....	72
8.7.1 Detección de Rotavirus. Muestreo individual de Otoño.....	72
8.7.2 Detección de Rotavirus. Pool de muestras. ....	73
8.7.3 Detección de Norovirus. Pool de muestras. ....	74
8.8 Detección de Rotavirus y Norovirus por RT-PCR en tiempo real.....	75
8.8.1 Detección de RV (CON2-CON3). Pool de muestras.....	75
8.8.2 Detección de Rotavirus (CON3-IT1). Pool de muestras.....	77
8.8.3 Detección de Norovirus (JV12 y JV13). Pool de muestras.....	79
8.9 Diseño del generador de cloro por electrólisis.....	82
8.10 Evaluación de la efectividad del generador de cloro.....	83
8.11 Diseño del prototipo de membranas de ultrafiltración.....	86
8.12 Evaluación del prototipo de membranas de ultrafiltración. ....	87
<b>9 DISCUSIÓN.....</b>	<b>88</b>
Análisis de pH y conductividad.....	88
Análisis fisicoquímico. Muestreo de Primavera.....	89
Análisis fisicoquímico. Muestreo de Verano.....	89
Análisis fisicoquímico. Muestreo de Otoño e Invierno.....	89
Conteo de coliformes fecales y coliformes totales en agua.....	90
Caracterización Microbiológica.....	91
Perfil de resistencia a antibióticos.....	94
Detección de Rotavirus y Norovirus por RT-PCR en tiempo real.....	97
Detección de RV (CON2-CON3). Pool de muestras.....	97
Detección de Rotavirus (CON3-IT1). Pool de muestras.....	98
Detección de Norovirus (JV12 y JV13). Pool de muestras.....	98
<b>10 CONCLUSIÓN.....</b>	<b>100</b>
<b>11 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>101</b>
<b>12 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>102</b>
<b>13 APÉNDICE.....</b>	<b>119</b>
13.1 APÉNDICE I: <i>Preparación de soluciones</i> .....	119
13.2 APÉNDICE II: <i>Preparación de medios de cultivo</i> .....	125
13.3 APÉNDICE III: <i>Interpretación de resultados</i> .....	128

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del procesamiento de muestras de agua para aislamiento de enteropatógenos.....	29
<b>Figura 2.</b> Esquema general del plásmido pGEM.....	32
<b>Figura 3.</b> Esquema del programa de amplificación para la PCR punto final RV.....	36
<b>Figura 4.</b> Esquema del programa de amplificación PCR punto final N.....	38
<b>Figura 5.</b> Esquema del fragmento del gen VP4 de R.....	41
<b>Figura 6.</b> Esquema del programa de amplificación qPCR para RV.....	42
<b>Figura 7.</b> Esquema del programa para la curva de disociación qPCR de R.....	42
<b>Figura 8.</b> Esquema del programa de amplificación qPCR para detección de NV.....	44
<b>Figura 9.</b> Esquema del programa para la curva de disociación detección de N.....	44
<b>Figura 10.</b> Mapa del polígono del PN.....	51
<b>Figura 11.</b> Cuenca hidrológica Río Mayo. Fuente: (Martin, 1998).....	52
<b>Figura 12.</b> Subcuenca hidrológica Río Candameña.....	52
<b>Figura 13.</b> Microcuencas hidrológicas: Izquierda microcuenca Río Basaseachi. Derecha microcuenca Río Durazno.....	53
<b>Figura 14.</b> Clasificación de orden de ríos y arroyos del PNCB.....	54
<b>Figura 15.</b> Mapa de los puntos de muestreo.....	56
<b>Figura 16.</b> Medición del pH de las muestras de agua por estaciones es del año 2013.....	57
<b>Figura 17.</b> Medición de la Conductividad en muestras de agua del PNCB 2013.....	58
<b>Figura 18.</b> Resultados de la distribución espacio-temporal del conteo de coliformes expresados en NMP/100 mL en las muestras de agua analizadas.....	63
<b>Figura 19.</b> Análisis estadístico de coliformes fecales y totales. ....	64
<b>Figura 20.</b> Control viral para Rotavirus, determinación de clonas con el gen VP4.....	69
<b>Figura 21.</b> Control viral para Norovirus, determinación de clonas con el gen RdRp.....	70
<b>Figura 22.</b> Extracción de RNA de las 13 muestras por separado durante la época de otoño. ....	71
<b>Figura 23.</b> Extracción de RNA del pool de muestras por estaciones del año 2013.....	72
<b>Figura 24.</b> Detección de RV por RT-PCR punto final.....	73
<b>Figura 25.</b> Detección de RV RT-PCR punto final del pool de muestras por estación del año.....	74
<b>Figura 26.</b> Detección de Norovirus por RT-PCR punto final del pool de muestras por estación del año.....	75
<b>Figura 27.</b> Ecuación de la recta de la curva de calibración para la detección RV (Con2 y Con3).....	76
<b>Figura 28.</b> Curva de disociación de los productos obtenidos por qPCR para la detección de Rotavirus (Con2 y Con3).....	76
<b>Figura 29.</b> Detección de RV por RT-qPCR (Con3-IT1).....	77
<b>Figura 30.</b> Curva de disociación de los productos obtenidos por qPCR para la detección de Rotavirus.....	78
<b>Figura 31.</b> Análisis filogenético de las secuencias de RV por qRT-PCR.....	79
<b>Figura 32.</b> Detección de NV por RT-qPCR (JV12-JV13).....	80
<b>Figura 33.</b> Muestras positivas a Norovirus por RT-PCR tiempo real (JV12 y JV13).....	81
<b>Figura 34.</b> Análisis filogenético de las secuencias de NV por qRT-PCR. NO26 corresponde a la muestra positiva de otoño.....	82
<b>Figura 35.</b> Prototipo del generador de cloro por electrólisis.....	83
<b>Figura 36.</b> Análisis del generador de cloro. Voltaje vs [Cloro] en g/L.....	84
<b>Figura 37.</b> Prototipo del filtro con membranas de ultrafiltración.....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Reacción de ligación para clonar en pGEM.....	32
<b>Tabla 2.</b> Juegos de <i>primers</i> para detección de RV.1.....	34
<b>Tabla 3.</b> Condiciones para la reacción de RT detección de RV. ....	34
<b>Tabla 4.</b> Condiciones para la reacción de PCR detección de RV. ....	35
<b>Tabla 5.</b> Juegos de <i>primers</i> para detección de NV.1.....	36
<b>Tabla 6.</b> Condiciones para la reacción de RT detección de RV. ....	36
<b>Tabla 7.</b> Condiciones para la reacción de PCR detección de NV. ....	37
<b>Tabla 8.</b> Reacción de digestión por enzima NcoI.....	39
<b>Tabla 9.</b> Condiciones de la reacción para qPCR SYBR ® Green para la detección de RV.....	42
<b>Tabla 10.</b> Condiciones para la reacción de qPCR SYBR ® Green. Detección de NV.....	43
<b>Tabla 11.</b> Análisis poblacional de las principales localidades rurales que afectan al PNCB.....	54
<b>Tabla 12.</b> Geo-referenciación e identificación de los puntos de muestreo.....	55
<b>Tabla 13.</b> Análisis Físico-Químico de las muestras de agua obtenidas en Primavera. ....	58
<b>Tabla 14.</b> Análisis Físico-químico de las muestras representativas de primavera.....	59
<b>Tabla 15.</b> Análisis de la composición iónica de las muestras representativas de Primavera.....	59
<b>Tabla 16.</b> Composición Elemental de las muestras representativas de Primavera.....	60
<b>Tabla 17.</b> Análisis Físico-Químico de las muestras de agua obtenidas en Verano.....	61
<b>Tabla 18.</b> Análisis Físico-Químico de las muestras de agua obtenidas en Otoño.....	61
<b>Tabla 19.</b> Análisis Físico-Químico de las muestras de agua obtenidas en Invierno.....	62
<b>Tabla 20.</b> Géneros y especies bacterianos identificados en muestras de agua por estación del año..	66
<b>Tabla 21.</b> Identificación bioquímica de microorganismos aislados de muestras de agua del PNCB	67
<b>Tabla 22.</b> Perfil de resistencia a antibióticos de los aislamientos. Las cepas 2, 6, 7, 13, 14, 15, 25, 27, 32 no se mostraron en la tabla debido a que presentaron susceptibilidad a todos los antimicrobianos.....	69
<b>Tabla 23.</b> Cuantificación de copias virales en muestras positivas a RV. ....	78
<b>Tabla 24.</b> Cuantificación de copias virales en muestras positivas a NV.....	81
<b>Tabla 25.</b> Evaluación de la efectividad del generador de cloro.....	85
<b>Tabla 26.</b> Evaluación del prototipo de membranas de ultrafiltración.....	87
<b>Tabla 27.</b> Modo de preparación de nefelómetro de MacFarland.....	124
<b>Tabla 28.</b> Preparación de medios para cultivos y sub-cultivos de referencia.....	125
<b>Tabla 29.</b> Tabla de combinación de tubos positivos para calcular NMP.....	128
<b>Tabla 30.</b> Interpretación de puntos de corte para determinar susceptibilidad, resistencia o resistencia intermedia del Panel negativo combo 44 para enterobacterias.....	129

## ABREVIATURAS

% RBMA	Porcentaje en reducción bacteriana de organismos mesófilos aerobios.
µg/L	Microgramos por litro
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
µS/cm	Micro Siemens por centímetro
ANP	Área Natural Protegida
APST	Cuenta de mesófilos aerobios en UFC/mL de agua de prueba sin tratar.
APT	Cuenta de mesófilos aerobios en UFC/mL de agua de prueba tratada.
CAMPY	Agar para <i>Campylobacter</i>
cm	Centímetros
CONANP	Comisión Nacional de áreas Naturales Protegidas
Ct	Umbral del ciclo, por sus siglas en inglés
DNA	Ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés
EDAS	Enfermedad diarreica aguda severa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
g	Gramos
GPS	Sistema de posicionamiento global
h	Horas
Ha	Hectárea
ICP/OES	Espectrofotómetro de plasma
INDRE	El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas
INEGI	<i>Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática</i>
L	Litros
M	Molaridad
MDR	Cepas multirresistentes (por sus siglas en inglés)
mg/L	Miligramos por litro
mL	Mililitros
MPM	Marcador de peso molecular
N	Normalidad
NMP	Número más probable
NMP/100 mL	Número más probable por cada 100 mililitros
NOM	Norma Oficial Mexicana
NV	Norovirus
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tereftalato de polietileno
pH	Potencial de hidrógeno
PNCB	Parque Nacional Cascada de Bassaseachic
POA	Procesos de oxidación avanzada
PPCO	Polipropileno copolímero
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
qRT-PCR	Retro-transcriptasa, Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico, por sus siglas en inglés



RT-PCR	Retro-transcriptasa reversa, Reacción en cadena de la polimerasa
RV	Rotavirus
s	Segundos
SODIS	Desinfección solar de agua potable
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa
UACH	Universidad Autónoma de Chihuahua
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
UTEP	Universidad del Paso, Texas
UV	Luz Ultravioleta (UV)
VIRADEL	Técnica de adsorción-elución de virus
VHA	Virus de la Hepatitis "A"
XDR	Extremadamente resistentes, por sus siglas en inglés

## RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por el consumo de agua contaminada son causadas principalmente por bacterias y virus enteropatógenos que dan lugar a brotes gastrointestinales en todo el mundo. La población que vive en el Parque Nacional Cascada de Bassaseachic (PNCB) en la Sierra Tarahumara en Chihuahua, México, ha manifestado problemas frecuentes de gastroenteritis asociadas a consumo de agua contaminada. El objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis estacional de calidad de agua durante el año 2013 en aguas naturales del PNCB y desarrollar un sistema de desinfección de agua económico y funcional para zonas rurales.

Primero se realizó un análisis hidro-geográfico de los afluentes de la Cascada de Basaseachi. Para determinar la calidad de agua se utilizó análisis físico-químico como dureza, alcalinidad, acidez y cloruros. En el análisis microbiológico se determinaron coliformes fecales y totales. De las muestras de agua que excedieron los límites permisibles de las normas oficiales mexicanas, se aislaron cepas de enteropatógenos y se caracterizaron bioquímicamente y se analizó el perfil de resistencia a antibióticos. Se determinaron virus entéricos mediante RT-PCR diseñando controles virales internos y la carga viral de virus en agua se determinó por RT-qPCR con SYBR-Green. Finalmente, se realizó el diseño de prototipos de desinfección de agua económicos para zonas rurales, a los cuales se estandarizaron las condiciones de uso y se evaluó la efectividad de desinfección mediante el % de reducción bacteriana. Con el estudio hidro-geográfico se eligieron 13 puntos de muestreo cercanos a las zonas rurales más pobladas y los ríos y arroyos más importantes que alimentan a la Cascada. El monitoreo de calidad de agua en el PNCB demostró que los parámetros físico-químicos de las muestras de agua durante las 4 estaciones del año mostraron una elevada acidez durante el verano y el resto de las pruebas resultaron dentro de los valores normales. Para el análisis de coliformes totales se demostró que hay diferencia significativa entre las temporadas del año y los puntos de muestreo y el análisis de coliformes fecales demostró que existe diferencia significativa solo por época del año. En el análisis bacteriológico se aislaron e identificaron 33 bacterias enteropatógenas con perfil de multirresistencia a antibióticos. Se encontraron cepas de vida libre, con un bajo perfil de resistencia a antibióticos. Se encontró contaminación con Norovirus y Rotavirus durante primavera, verano y el otoño, con una

carga viral considerable para infectar individuos sanos. Se diseñó un prototipo de generación de cloro por electrolisis con sal de mesa y agua y se estandarizaron las mejores condiciones de uso para zonas rurales. En conclusión el agua del PNCB posee las características fisicoquímicas ideales para ser considerada como agua de beber; sin embargo, la calidad microbiológica presenta un riesgo de salud pública, por lo que se utilizó un sistema de desinfección microbiológico como alternativa segura para los habitantes del Parque.

## ABSTRACT

Waterborne diseases are primarily caused by bacterial pathogens, which result in gastrointestinal outbreaks worldwide. Inhabitants of the Bassaseachic Falls National Park in Chihuahua, Mexico show seasonal gastroenteritis problems, probably due to consumption of polluted water. The aim of the present study was to detect enteropathogenic microorganisms responsible for diarrheal outbreaks in this area, which will produce recommendations for water supply systems in rural settlements. In 2013, 49 surface water samples from 13 selected sampling sites along the Basaseachi waterfall and its main rivers were collected during the spring, summer, autumn, and winter seasons. Water quality analyses included hardness in water, alkalinity, acidity, and chloride tests. Fecal and total coliform counts were determined using standard methods; the AutoScan-4 system was used for isolates identification and the antibiotic resistance profile by challenging each organism against 21 antibiotics. Based on our results, we designed two water disinfection models and their effectivity was evaluated by Mexican standard procedures. Physicochemical analyses demonstrated that water samples were acidic during summer season, and the rest of evaluated parameters were under the limits. Total coliforms analyses showed significant differences between sample season and sample sites, but fecal coliforms only showed significant differences by sample season of 2013. We isolated 33 bacteria with a multidrug resistance profile. We also detected native water bacteria with a slow resistance profile. Norovirus and Rotavirus were detected in water samples during spring, summer, and autumn by RT-qPCR. Water analyses revealed that physicochemical quality is appropriate to be considered as potable water, but microbiological analyses showed a potential public health risk. We also designed an electrolysis chlorine generator based on edible salt, which can allow people in rural settlements disinfecting water and food. We also tested a portable ultrafiltration membrane system for water purification.

## INTRODUCCIÓN

---

En el mundo existen más de 2,400 millones de personas que carecen de sistemas de abastecimiento de agua potable, esto ocasiona alrededor de 2 millones de muertes por año a causa de enfermedades diarreicas relacionadas con la falta de sanitización e higiene de agua, siendo los más afectados los niños menores de 5 años. Las enfermedades diarreicas son tanto prevenibles como tratables, sin embargo, se reportan anualmente cerca de 1,700 millones de casos de enfermedades diarreicas en el mundo cada año, siendo la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años con alrededor de 760,000 muertes por año. La Organización Mundial de la Salud (OMS), considera que cuando la mayoría de las personas tengan acceso a agua potable, ayudaría a reducir considerablemente las enfermedades por diarrea en el mundo (OMS, 2015).

El agua es la mejor ruta para la transmisión de patógenos que causan enfermedades en humanos; por ello, el análisis de virus, bacterias y protozoos en agua es importante debido a que cada año se reportan numerosos brotes de enfermedades gastrointestinales en muchos países en desarrollo, lo que ocasiona problemas directos en el mejoramiento de la salud pública. Uno de los principales problemas en agua es debido a la contaminación fecal que presenta virus y bacterias entéricos, los cuales infectan vía fecal-oral, causando problemas de gastroenteritis, además de la presencia en agua de virus de la hepatitis “A” y “E”, que causan enfermedades hepáticas (Bosch, 1998; Steyer *et al.*, 2011).

La OMS señala que el tratamiento de agua en el hogar y el buen almacenaje del agua pueden tener un impacto dramático en la reducción de posibles causas que den enfermedades diarreicas, para todas aquellas personas que dependen del agua de río, lagos, pozos o tinacos que estén contaminados con microorganismos; además de que el progreso en materia de saneamiento se ha visto atrasado por la insuficiencia de inversiones en campañas de concientización y la falta de productos al alcance de los más pobres (OMS, 2015).

El manejo y la disminución de contaminantes del agua, podría ser más efectiva una vez que se conoce la fuente de contaminación (Sinton *et al.*, 1998). Cuando se habla de calidad microbiológica en agua, *Escherichia coli* es uno de los indicadores más buscados en presencia de probable contaminación fecal. Sin embargo, Bosch (1998) habló de la necesidad de estudiar la presencia de virus en agua debido a que la erradicación de virus en este medio es más difícil que para otros microorganismos, ya que logran permanecer en ambientes hostiles por más tiempo y con mayor facilidad. Señala también que los métodos de purificación del agua son necesarios, ya que existen diversas formas de contagio hacia el humano, tales como el riego de las franjas agrícolas para consumo humano, en peces que crecen en aguas contaminadas, donde se ha observado el alojamiento del virus en sus tejidos; también se ven afectados ríos, lagos y aguas subterráneas, que finalmente se dirigen al consumo de la población de una u otra forma, desde aguas recreacionales o básicamente de consumo.

La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) en el año 2013 reportó en el Parque Nacional Cascada de Bassaseachic (PNCB), en el Municipio de Ocampo, Chih., alarma por factores de riesgo ambiental, ya que frecuentemente se han registrado brotes endémicos de diarreas agudas severas y cuadros de hepatitis en la población. Por lo que se generó el principal interés del estudio en esta Área Nacional Protegida (ANP), realizando un estudio que permita detectar los brotes de hepatitis y diarreas agudas en la zona (Lic. María Concepción Pérez Recoder, Directora del ANP). Se considera que el causal de las enfermedades es una posible contaminación del agua por desechos sanitarios. Se ha visto también un interés de importancia de la zona de estudio, ya que está siendo proyectada como principal atractivo turístico-económico del estado de Chihuahua, ya que la salud de los ecosistemas afecta directamente a la economía, debido a que impiden el establecimiento de inversionistas extranjeros.

## ANTECEDENTES

---

Los sistemas con agua dulce estacional como lagunas de carga y descarga, charcas, ríos, cascadas y humedales boscosos de agua dulce, son ecosistemas muy productivos donde la biomasa es importante para la conservación de numerosas especies tanto animales como vegetales, así como también contribuyen al desarrollo sostenible de la zona, ofreciendo biodiversidad, protección contra la erosión, mitigan inundaciones, favorecen la recarga de acuíferos subterráneos, la purificación del agua y generan beneficios económicos en el caso de la cascada con opciones de recreación y turismo (Pérez y Rodríguez, 2008). En México existen diversos tipos de áreas protegidas, como las federales, estatales, municipales, ejidales y privadas, particularmente, las áreas naturales protegidas están bajo resguardo de la CONANP.

### *Parque Nacional Cascada de Bassaseachic*

La Cascada de Basaseachi se encuentra considerada desde el 2 de febrero de 1981 dentro de la categoría de Parque Nacional con una extensión de 5,803 Ha., por decreto oficial del ex-presidente José López Portillo, ya que por su belleza escénica y la diversidad de los ecosistemas, posee un alto valor científico, histórico y con una gran aptitud para el desarrollo turístico-económico en el estado de Chihuahua (Rees, 2009). Es importante mencionar que si bien al mencionar el Parque Nacional el nombre correcto es Bassaseachic, al mencionar el río y la cascada el adecuado es Basaseachi.

### *El agua como recurso no renovable*

Las aguas dulces del mundo son un recurso escaso y en peligro. Se prevee que para el 2025 dos terceras partes de la población sufrirán estrés por la falta de este líquido. De acuerdo con recursos hídricos se considera que solo el 0.007% del agua total disponible en el planeta puede ser utilizada directamente por humanos. Es por esto, que se ha convertido en una prioridad para el sector político y científico. De los 113,000 km<sup>3</sup> que se precipitan a través de las lluvias en la tierra solamente 42,000 km<sup>3</sup> recargan los acuíferos o retornan a los océanos por medio de ríos y el resto se evapora. Cerca del 70% de esta cantidad se utilizan para mantener los ecosistemas saludables. Es

importante mencionar que el agua no se distribuye uniformemente a todo el mundo sino que se concentra en Rusia, Canadá, China, India y Estados Unidos, siendo los más afectados Europa, Australia y Oceanía, esto hace más vulnerable a la población de dichos países. Las actividades antropogénicas por controlar el recurso hídrico como presas, drenaje de los humedales, transporte de agua a centros urbanos, la explotación de los mantos acuíferos y tierras agrícolas han cambiado sensiblemente las tasas de evaporación y la calidad de las aguas con el constante incremento de los desechos tóxicos. Es por esto, que las necesidades de generar nuevas y mejores alternativas acerca del manejo y tratamiento de agua es imperativo para preservar nuestros ecosistemas y la salud del planeta, además de la supervivencia del ser humano en la tierra (Toledo, 2002).

### ***Fuentes de abastecimiento de agua potable.***

Hasta finales del siglo XIX nuestra fuente principal de abastecimiento de agua potable provenía de ríos, lagos y lagunas que eran utilizadas sin tratamientos previos, además que no requerían de mayor infraestructura para su extracción. Sin embargo, el notable incremento de desechos a causa del crecimiento de la población tuvo como consecuencia el deterioro de la calidad del agua (Shyamala *et al.*, 2008).

Las fuentes de abastecimientos se dividen en fuentes superficiales que son ríos, lagos y lagunas, mientras que las subterráneas como su nombre lo dice se encuentran bajo la superficie de la tierra, y necesitan de perforación de pozos para su extracción.

Una cuenca hidrográfica es la unidad de análisis y planificación para darle el enfoque integrado al estudio del recurso hídrico superficial y subterráneo. Es el espacio de terreno delimitado por cerros, partes elevadas y montañas, de los cuales se configura una red de drenaje superficial, que en presencia de lluvia, forma arroyos para luego convertirse en ríos principales, lagos y llegar hasta el mar. Cuando estas cuencas son sobreexplotadas, disminuye la cantidad y el flujo de agua y causa deterioro en los acuíferos (Ramakrishna *et al.*, 1997).



Las aguas naturales se caracterizan por ciertos parámetros que definen sus propiedades y calidad como dureza, alcalinidad, salinidad, sólidos disueltos totales entre algunos otros. Esta caracterización se hace en virtud de sus propiedades físicas y químicas.

### ***Importancia de la Calidad de agua.***

La disponibilidad del agua para consumo humano cada vez es menor, debido al crecimiento poblacional relacionado directamente con el consumo per cápita, contaminación de las fuentes naturales del agua y el manejo inadecuado de los recursos. Se sabe que el recurso hídrico tiene una generación constante, sin embargo, la calidad del agua va disminuyendo rápidamente. Uno de los peligros más importantes es la incorporación de contaminantes solubles a los acuíferos, que causan problemas directos en cuestión de salud pública. En el contexto de salud pública se establece que aproximadamente un 80% de todas las enfermedades y más de una tercera parte de las defunciones en los países en vías de desarrollo son causadas por ingestión de agua contaminada. Se ha llegado a estimar que el 70% de la población de zonas rurales está principalmente relacionada con la contaminación por heces (Brooks *et al.*, 2012).

Entre los tipos de contaminación que pueden afectar la calidad del agua pueden ser cualquier organismo vivo, mineral o compuesto químico cuya concentración impida los usos benéficos del agua. Los contaminantes se pueden clasificar en dos categorías:

*Fuente de Contaminación puntual:* Es toda aquella contaminación que se descarga sus aguas en un cauce natural y proviene de una fuente específica, como un tubo o dique y puede ser medida, tratada o controlada. Este tipo de contaminación se asocia generalmente a industrias y aguas negras municipales.

*Fuente de Contaminación difusa:* Este tipo de contaminación es producida en un área abierta, sin fuentes específicas y se asocia principalmente a actividades de la tierra como agricultura, urbanización, pastoreo y prácticas forestales. Es más difícil de controlar y causan mayor impacto, la repercusión de estos contaminantes puede ir desde pequeños impactos, hasta catástrofes ecológicas sobre peces, aves, mamíferos y salud humana (Ramakrishna *et al.*, 1997).

El uso de la tierra genera efectos sobre los procesos hidrológicos, por ejemplo la sobreexplotación de la ganadería genera un impacto negativo desde el punto de vista bacteriológico y bioquímico, esto debido a que la cantidad de bacterias aumenta cuando el ganado pasta cerca de las fuentes de agua, además que acaban con los pastizales que pudieran amortiguar la carga de contaminantes a las fuentes de agua. Por otra parte la agricultura es el principal factor que tiene más impacto en contaminación del agua, ya que se estima que cerca del 70% de la disponibilidad del agua se utiliza para este rubro. Hoy en día el uso de pesticidas y fertilizantes aumenta la degradación de los recursos hídricos a nivel mundial. Esto justifica la preocupación de la conservación del agua a nivel mundial (Ongley, 1997; Brooks *et al.*, 2012).

### ***Bacterias contaminantes del agua.***

El agua es un elemento fundamental en la vida acuática y terrestre, naturalmente el agua es vehículo de bacterias, virus y protozoos de origen fecal (Geldreich, 1997), causales de gran parte de las diarreas que afectan a la población consumidora; en países en vías de desarrollo aproximadamente un 80% de todas las enfermedades y más de una tercera parte de las defunciones tienen por causa el consumo de agua contaminada (OMS, 1979; APHA, 1981).

Las bacterias más comunes en aguas contaminadas y que son responsables de brotes epidémicos en las poblaciones humanas son: *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella sp.*, *Shigella sp.* y *Escherichia coli*. Entre las más infecciosas para el humano la enterohemorrágica O157:H7 (Ashbolt, 2004).

***Vibrio cholerae***: Es capaz de sobrevivir en ambientes acuáticos formando biopelículas en plantas de agua o crustáceos. Existen por lo menos 200 serotipos identificados a *V. cholerae*; sin embargo, solamente los serotipos O1 y O139 son los infecciosos para el ser humano (Wang *et al.*, 2010). Se han observado que el agua es uno de los medios más probables por las que el cólera puede transmitirse, por lo que el

muestreo estacional inter-epidémico es necesario para valorar la calidad del agua que tiene alto contacto humano, aunque se ha logrado aislar incluso en ambientes donde no hay evidencia de contaminación fecal humana. El agua dulce es uno de las principales fuentes de agua potable en zonas rurales que carecen de este servicio, por lo que se convierte en un potencial medio de transmisión. La presencia del vibrión en ambientes acuáticos es inversamente proporcional a la altura sobre el nivel del mar, siendo los lugares más altos los que presentan condiciones más adversas para la sobrevivencia del vibrión; además que el crecimiento es inhibido por temperaturas menores a los 15°C, pH ácidos, bajo contenido de materia orgánica y aguas con baja salinidad, siendo los estuarios, ciénegas y pantanos los lugares donde hay condiciones de salinidad entre las 15 y 25 partes en mil, que son óptimas para su crecimiento (Borroto, 1998).

***Salmonella typhi* y *Salmonella Paratyphi*:** Son los microorganismos causantes de la enfermedad fiebre tifoidea, caracterizada por diarrea moderada o fulminante, vómito, cefalea, dolor muscular, fiebre. Se transmite de modo fecal-oral, pero se le asocia al consumo de agua y alimentos contaminados (Angulo *et al.*, 1997). El agua contaminada por este tipo de *Salmonellas tifoideas* puede tener consecuencias devastadoras en cuestión de salud pública. El análisis de *E. coli* o coliformes termotolerantes es un índice fiable de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en aguas de consumo (Escartin *et al.*, 2002; Gopinath *et al.*, 2012).

***Escherichia coli*:** Es una bacteria que coloniza el intestino de humanos, animales y algunos reptiles; es excretada en heces y existen infinidad de serotipos. Se encuentran clasificadas según su mecanismo de infección, como la *E. coli* enteropatógenas, enteroinvasivas, productoras de toxinas parecidas a *Shigella*, enterotóxicas, de adherencia difusa, enteroadherentes o enteroagregativas y enterohemorrágicas. Su forma de transmisión es fecal-oral, y también se encuentra asociada al consumo de alimentos predominantemente cárnicos y agua de consumo contaminada con heces fecales (Michanie, 2003). Todas las clasificaciones según su mecanismo de infección de *E. coli* pueden causar desde diarreas ligeras que duran de 1 a 6 días, hasta problemas graves como colitis hemorrágica o el síndrome urémico hemolítico asociada principalmente a la

*E. coli* enterohemorrágica O157:H7. Incluso en 2011 en el Norte de Alemania se presentaron brotes en la población, donde el serotipo O104:H4 con la toxina de Shiga, afectó los pacientes con el síndrome urémico hemolítico, esto podría indicar que las medidas de sanidad que hoy en día son aplicadas para evitar brotes de *E. coli* podrían ser insuficientes todavía y un brote podría estar latente (Werber *et al.*, 2012).

***Yersinia spp.***: La enfermedad yersiniosis es causada por el género *Yersinia spp.*, que es una enfermedad gastrointestinal zoonótica. Se ha visto que afecta a ovejas de todas las edades pero principalmente a ovejas jóvenes; la sintomatología clínica incluye diarrea, depresión y deshidratación (Yang *et al.*, 2016).

***Enterobacter spp.***: Son bacterias Gram negativas, frecuentemente son causales infecciones hospitalarias como infecciones en el tracto urinario, neumonía y septicemia. La habilidad de la bacteria por competir por el hierro facilita el establecimiento en el hospedero (Lopes *et al.*, 2016). La sintomatología clínica es difícil de distinguir entre otro tipo de gastroenteritis bacteriana.

***Citrobacter sp.***: Es una bacteria coliforme Gram-negativo de la familia Enterobacteriaceae, es comúnmente encontrado en agua, suelo, y en el tracto de animales y humanos, muchas de las infecciones causadas por el género *Citrobacter* son de origen nosocomial, pero se ha visto también que puede provenir de la comunidad. Uno de los grupos más afectados por este género son los neonatos, que pueden desarrollar sepsis, meningitis y abscesos cerebrales; otro de los grupos susceptibles son las personas con inmunosupresión. Este género puede causar enfermedades en humanos del tracto urinario, tracto respiratorio, heridas, hueso, peritoneo, endocardio, meninges y en sangre. La especie de *Citrobacter freundii* se ha visto que es mucho más resistente que *C. koseri* y *C. amalonaticus* (Kumar *et al.*, 2013).

***Klebsiella spp.***: Tiene comúnmente dos hábitats, uno en el ambiente ya sea en aguas superficiales, desagüe, suelo y plantas, y en mucosas de mamíferos, como humanos, caballos o cerdos. En el tracto respiratorio de humanos *Klebsiella*

*pneumoniae* está presente como un saprofito de la nasofaringe y el tracto intestinal. La tasa de detección en muestras de heces varía de 5 a 38% mientras que en nasofaringe de 1 al 6%. Se ha visto que el género *Klebsiella* spp. raramente crece en la piel de humanos, por lo que no se considera parte de la flora (Podschn y Ullmann, 1998) y se subdivide en 5 especies. En la práctica clínica las más importantes especies son *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* mientras que *K. ornithinolytica*, *K. terrigena* y *K. planticola* son consideradas bacterias ambientales (Podschn *et al.*, 2001).

***Shigella* sp.:** Especies del genero *Shigella* son patógenos bacterianos más frecuentemente aislados de pacientes con diarrea, del 5 al 15% de los episodios de diarrea de los episodios de diarrea son atribuidos a este género, causando 1.1 millón de casos de muertes por año. Dos tercios de los episodios de muertes ocurren en niños menores de 5 años. La enfermedad que causa se llama shigelosis, es una infección intestinal aguda, los síntomas pueden variar desde diarrea acuosa hasta disentería bacilar inflamatoria caracterizada por fuerte dolor abdominal, fiebre y heces con sangre y moco. *Shigella* sp. es transmitida vía fecal-oral, mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados (Schroeder y Hilbi, 2008).

***Aeromonas* spp.:** Las bacterias del género de *Aeromonas* spp. son bacilos Gram-negativos, distribuidos ampliamente en agua superficial como ríos, lagos, drenaje doméstico, y agua potable sin tratar. Es conocido comúnmente por causar enfermedades en peces utilizados para la acuicultura como los *goldfish*, causando septicemia asociada a *Aeromonas*. Pero en los últimos años se ha visto asociada como patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos sobretodo en enfermedades gastrointestinales y gastroenteritis pediátricas (Sahoo *et al.*, 2016; Carriero *et al.*, 2016).

***Tatumella* sp.:** Es un género de bacterias Gram-negativas, facultativas de la familia *Enterobacteriaceae*. Solo tiene una especie conocida llamada *T. ptyseos* fue descubierta por Hollis y colaboradores (1981). Se ha aislado de muestras de suelo y agua principalmente y se han reportados pocos casos como patógeno oportunista, sin

embargo, se ha logrado identificar que los recién nacidos y los adultos mayores son más susceptibles a *Tatumella* sp. (Mardaneh *et al.*, 2014).

***Acinetobacter spp.***: Son cocobacilos gram negativos aerobios que sobreviven con gran facilidad en superficies, colonizando con gran facilidad la piel humana. *A. baumannii* es considerado patógeno nosocomial, puede causar neumonía, meningitis infecciones urinarias, infecciones en catéteres, abscesos e infectar heridas quirúrgicas. Son importantes organismos del suelo que contribuyen a la mineralización del suelo (Montero, 2004).

### ***Virus contaminantes en agua***

***Los virus entéricos*** son causales de brotes de enfermedades transmitidas por el agua ya que son vertidos al agua por los seres humanos y los animales y pueden ser transmitidos por aguas residuales contaminadas, más de 100 diferentes tipos de virus pueden colonizar el intestino humano y causar una amplia variedad de enfermedades gastrointestinales; los virus patógenos que son transmitidos más comúnmente son Rotavirus, norovirus y virus de la Hepatitis A (o también llamado Enterovirus 72) (Amdiouni *et al.*, 2012; Ikner *et al.*, 2012; Calgua *et al.*, 2013); . La contaminación del agua por aguas residuales y el escurrimiento de granjas producen serios problemas en cuestión de salud pública en muchos países. Se ha reportado que un paciente con una infección viral puede excretar desde  $1 \times 10^5$  hasta  $1 \times 10^{11}$  partículas virales por gramo en heces (Sinton *et al.*, 1998; La Rosa *et al.*, 2012).

Los virus junto con las bacterias y los protozoos en el intestino o en la orina van directo hacia las aguas del drenaje y llegan hacia los efluentes de diferentes formas, a través de la descarga directa de aguas residuales tratadas o sin tratar, puntos desconocidos de fuentes contaminantes como escurrimientos de áreas urbanas o de agricultura, fosas sépticas y desbordamientos por aguas de lluvia en alcantarillas, son problemas que no son reconocidos fácilmente y que son fuente importante de contaminación del agua (Rees, 2009; Girones *et al.*, 2010; Amdiouni *et al.*, 2012) .

Como disciplina científica el estudio de los virus en agua, se empezó a documentar después de un brote de hepatitis en Nueva Delhi entre diciembre de 1955 y enero de 1956, el origen del brote provenía de la contaminación con aguas residuales que desembocaban en el río Jumna donde se usaba el agua de consumo, 30,000 casos de hepatitis fueron reportados en esa población (Bosch, 1998).

En cuestión de salud pública, la determinación los virus enteropatógenos en agua es más crítico, debido a que la dosis mínima infecciosa es muy baja. Hoy en día se sigue teniendo problemas en la detección y cuantificación de virus en agua debido a los costos elevados, por lo que en muchos brotes de enfermedad causadas por virus no son atendidos. En la mayoría de los casos las enfermedades causadas por virus no llegan a conocimiento de las autoridades sanitarias, debido a que no son mortales; sin embargo, inciden indirectamente en la economía (Bergeisen *et al.*, 1985; La Rosa *et al.*, 2012). Cuando existe contaminación fecal en agua, las enfermedades virales pueden ser contraídas a través de agua de consumo, por inhalación o a través de la piel.

Generalmente, de manera errónea la calidad del agua se determina mediante el análisis bacteriológico de agua, y características fisicoquímicas, sin embargo se deja desapercibido el análisis virológico el cuál es indispensable. En 1991, dentro de un campo militar en España se determinó la presencia de virus entéricos en agua potable; a pesar de que el agua era tratada con cloro y los análisis bacteriológicos mostraban resultados negativos. Los virus no se pueden replicar fuera de su hospedero, sin embargo, pueden durar en el ambiente por más tiempo que las bacterias enteropatógenas (Rees, 2009). Se ha reportado que los virus pueden permanecen viables de infectar hasta por 130 días en agua de mar, 120 días en agua fresca y por más de 100 días en suelos donde hay temperaturas entre los 20°C y 30°C (La Rosa *et al.*, 2012).

**Norovirus:** Por otra parte los *Norovirus* son considerados los causantes del 50% de los brotes alimentarios provocando cuadros de gastroenteritis en humanos alrededor del mundo. *Norovirus* es asociado por la OMS como causal de más de 4,600 millones de casos de diarreas agudas con una tasa cercana a los 2.2 millones de muertes al año

(Manso y Romalde, 2013; OMS, 2015). Son virus icosaédricos no envueltos, de una sola cadena de 7.5-7.7 kb de RNA (Ácido ribonucleico, por sus siglas en inglés) positiva y pertenecen a la familia Caliciviridae; se encuentran clasificados en 29 grupos genéticos, con 6 genogrupos (GI-GVI), los genogrupos I y II son los que más afectan al humano (Kovač *et al.*, 2009; Manso y Romalde, 2013). Se han observado en ambientes acuáticos, tales como aguas residuales, efluentes, ríos, aguas de mar, e incluso aguas subterráneas, pudiendo soportar temperaturas desde los 0°C hasta los 60°C. El genoma soporta hasta 3 meses en agua, también se ha observado que en agua almacenada es posible la recuperación de *Norovirus* hasta 588 días después. Los reservorios de mayor riesgo son los mejillones y las ostras, se han reportado casos de epidemia en cruceros debido a *Norovirus* en los últimos años (Bosch, 1998; Logan *et al.*, 2007).

***Rotavirus:*** Los *rotavirus* son miembros de la familia *Reoviridae*, del género *Rotavirus*, son virus no envueltos, icosaédricos, compuesto de 3 capas externas de proteínas, con una estructura de RNA bicatenario. Se encuentran clasificados en 7 serogrupos (A-G), siendo los más importantes en cuestión de salud pública los A, B y C; El serogrupo A es el principal causal de gastroenteritis severa en infantes y niños menores de 5 años. Entre los principales genotipos involucrados se encuentran: G1, G2, G3, G4 y G9, los que, combinados con los tipos P[8], P[4] y P[6], son responsables de >80% de los episodios de gastroenteritis asociados a rotavirus a nivel mundial (Greenberg *et al.*, 2009). Los rotavirus de todos los serogrupos comparten la misma forma de la cápside, una única estructura genómica que consiste de 11 segmentos de RNA bicatenario que puede permanecer en ambientes acuáticos con altas temperaturas y se ha visto que la desinfección total del virus en agua puede llegar a tardar hasta 2 horas, mucho más tiempo que otros tipos de virus y bacterias (Espinosa *et al.*, 2008; Meleg *et al.*, 2008; Vecchia *et al.*, 2012;). La principal vía de infección es fecal-oral, siendo uno de los principales patógenos causantes de gastroenteritis en niños menores de 5 años. La tasa de mortalidad de rotavirus es de 0.6% de los casos debido a la pérdida considerable de líquidos en bebés con las diarreas abundantes (Lewis y Metcalf, 1988; La Rosa *et al.*, 2012). Los rotavirus del grupo A son los causales principales de diarreas agudas severas en niños menores de 5 años, reportándose desde 400,000 hasta 700,000 muertes por año;



mientras que los rotavirus B y C son capaces de infectar individuos de todas las edades (Contreras *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2013).

***Adenovirus:*** Entre los virus que son transmitidos por el agua se encuentran los adenovirus entéricos serotipos 40 y 41, los cuales son causantes de diarreas acuosas asociadas con fiebre y pueden durar hasta 2 semanas. Adenovirus también puede causar infecciones respiratorias, conjuntivitis y neumonía (Bounty *et al.*, 2012). Pertenecen a la familia *Adenoviridae* del género *Mastadenovirus*, son virus de doble cadena de DNA (Ácido Desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés), no envueltos con cápside icosaédrica, posee también espículas en cada uno de sus 12 vértices. Existen por lo menos 52 serotipos, entre ellos 17 pueden infectar al humano, siendo los más infecciosos los adenovirus 40 y 41. Debido a la resistencia que tiene adenovirus para vivir en ambientes hostiles por temporadas largas, se ha generado la necesidad de tratamientos de agua; se ha visto que en aguas inoculadas con *Adenovirus* serotipos 40 y 41, son detectables hasta después de 60 días a temperaturas de 15°C y 4°C, es altamente estable en el ambiente e incluso es difícil el tratamiento con luz ultravioleta, siendo reportado como el patógeno más resistente a la desinfección por luz ultravioleta (Albinana-Gimenez *et al.*, 2009; Rees, 2009).

***Virus de la hepatitis "A" (VHA):*** El VHA es uno de los cinco virus hepatótrofos primarios, se transmite casi de forma exclusiva por vía fecal-oral, es a menudo identificado en brotes epidémicos causados por agua contaminada, esto varía según las diferentes áreas geográficas, pero es frecuentemente observado en aguas de drenaje en zonas endémicas todo el año (Kovač *et al.*, 2009). El VHA representa el 87% de todas las enfermedades virales que son transmitidas por agua contaminada en EEUU; debido al tamaño tan pequeño que posee le permite pasar a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Debido a sus características estructurales el VHA es capaz de permanecer en condiciones que se consideran adversas para los virus, como los ambientes de una humedad relativa del 42%, puede sobrevivir a 25° C durante un mes, a 5° C durante tres meses y puede perdurar años cuando se mantiene en congelación a -20° C e igualmente resiste ambientes ácidos como con pH 2. También puede sobrevivir

durante días o meses y por períodos más largos en agua potable hasta 60 días, más de 30 semanas en agua salada, más de 6 semanas en agua de río, más de 8 semanas en aguas subterráneas y también se ha detectado en suelo y sedimentos marinos, así como en heces desecadas o en superficies de poliestireno. El reservorio es exclusivamente el humano, solo los individuos infectados pueden excretar desde  $1 \times 10^5$  hasta  $1 \times 10^{11}$  partículas virales por gramo de heces y a su vez llegar a las aguas residuales, y si los hábitos higiénicos del individuo no son adecuados puede infectar las manos o la ropa del sujeto, pudiendo infectar alimentos, agua o a otros sujetos; por esta razón la hepatitis “A” es sumamente frecuente en países en vías de desarrollo. Una característica importante del VHA es que deja inmunidad permanente desde la infancia en los individuos infectados en países subdesarrollados (Di Pasquale *et al.*, 2010; Girones *et al.*, 2010).

Tiene una gran estabilidad genética por lo que se considera un único serotipo, es miembro de la familia *Picornaviridae* del género Hepatovirus, con forma icosaédrica no envuelto, posee un genoma de 7.5 kb de RNA lineal de polaridad positiva; existe un solo serotipo reportado en el mundo, sin embargo, las cepas se distinguen en 7 diferentes genotipos I-VII, y los tres primeros genotipos se subdividen en los subgenotipos A y B (Di Pasquale *et al.*, 2010; Manso y Romalde, 2013).

### ***Determinación de microorganismos en agua***

Los pasos básicos para el análisis microbiológico de agua son el muestreo, la concentración, la descontaminación o remoción de inhibidores y la detección de virus específicos. La concentración de las muestras de agua es un paso crítico, debido a que los virus se encuentran presentes en pequeñas cantidades, un método adecuado de concentración debería ser técnicamente simple, rápido, tener un índice de recuperación alto, ser adecuado para un rango amplio de virus, proveer de un concentrado pequeño y ser económico. Las técnicas más utilizadas de concentración de muestras son la ultracentrifugación, ultrafiltración o la técnica de adsorción-elución de virus (VIRADEL) (Bosch, 1998; Albinana-Gimenez *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013).

**Indicadores microbiológicos de materia fecal en agua:** Particularmente en el PNCB la contaminación de agua por materia fecal puede provenir de zonas rurales afluentes, tanto por aguas residuales, escurrimiento de granjas agrícolas, fosas sépticas o desbordamientos por lluvia en alcantarillas, es decir, la contaminación puede provenir tanto de humanos como de animales. En ese caso se considera conveniente distinguir entre ambos tipos de contaminación, por lo que la ayuda de las técnicas microbiológicas y moleculares es indispensable. Aunque existe flora enterobacteriana que se va encontrar en ambos tipos de ambientes, existen estudios donde se ha logrado la asociación directa de bacteriófagos, virus que infectan bacterias, como *Bacteroides fragilis* cepa HSP40 con contaminación específica de humanos (Hörman *et al.*, 2004). Mientras que el actinomiceto *Rhodococcus coprophilus* tiene potencial como un indicador de los animales de pastoreo. Por otra parte, otro indicador de materia fecal en agua que ha sido reportado son los colifagos, bacteriófagos que infectan específicamente *Escherichia coli* que solo se han encontrado en animales de sangre caliente ( Sinton *et al.*, 1998; Hernández y Ríos, 2002).

**Técnica del número más probable (NMP):** La búsqueda de coliformes como indicadores de contaminación fecal se ha llevado a cabo desde hace muchos años. *Escherichia coli* en 1985 se propuso como índice para valorar la calidad del agua de bebida, marcando así el uso de coliformes como indicadores de patógenos (Gesche *et al.*, 2003). Uno de los métodos usados para la cuantificación de coliformes fecales y totales es la técnica del NMP o de tubos múltiples, este método resulta de un valor de la probabilidad en diluciones decrecientes de la cantidad de bacterias en 100 mL de agua. La Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994 (Diario Oficial de la Federación, 1994b), establece métodos microbiológicos para la determinación de bacterias coliformes mediante la técnica del NMP; este mismo procedimiento puede aplicarse a agua potable, agua purificada, hielo y alimentos procesados térmicamente. Este método se basa en que los coliformes fermentan la lactosa incubada a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 h, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación Durham. En cuerpos de agua el proyecto PROY-NMX-AA-042-SCFI-2005, describe que la presencia de contaminación fecal en cuerpos de agua es un factor

importante en la calidad del agua y dada la limitada capacidad de algunos microorganismos coliformes para sobrevivir en agua, sus números también pueden emplearse para determinar el grado de contaminación fecal (Diario Oficial de la Federación, 2005).

### ***Métodos de concentración de patógenos en agua***

***Ultrafiltración:*** La ultrafiltración es el tipo de filtración que utiliza membranas para separar diferentes tipos de sólidos y líquidos acoplado al sistema de adsorción-elución. Las membranas están dispuestas en forma de capilares, compuestas de materiales plásticos porosos y semipermeables. Por otra parte la ultrafiltración es pasar la muestra de agua a través de un filtro que gracias al tamaño de poro permite la separación física de agua, bacterias, y demás componentes no deseados para atrapar a los virus en una membrana permeable, este tipo de técnica es de gran ayuda para cuando hay poco volumen de muestra (< de 1-L). En ultrafiltración el tipo de membranas de celulosa con carga negativa son las más utilizadas, sirven para atrapar virus con carga positiva y son muy económicas (Ikner *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

***Ultra-centrifugación:*** Es uno de los métodos más eficientes para la concentración de virus entéricos, pero requiere de equipos muy costosos y personal capacitado. El equipo puede generar hasta 200,000 g. con sistemas de refrigeración y vacío adecuados, sin embargo, su costo y la necesidad de personal capacitado hace que este equipo sea más inaccesible que otros. Su fundamento consiste en someter una muestra homogeneizada a una velocidad de rotación muy alta con diferentes tiempos, de forma que a velocidades más lentas, sedimentan los componentes más grandes, y a velocidades mayores, los componentes más pequeños. Es decir, que aunque las masas de diferentes partículas sean muy similares, sedimentan en tiempos distintos. Una rotación mayor a 100,000 g es suficiente para lograr precipitar virus. La ultra-centrifugación se utiliza generalmente como segundo método de concentración debido a que solo se pueden procesar volúmenes demasiado pequeños de muestra a través de la aplicación de la fuerza de gravedad y tiempo, sin embargo, es también utilizada como

método de purificación de virus en conjunto con un gradiente de densidad basado en el tamaño de los virus (Albinana-Gimenez *et al.*, 2009; Ikner *et al.*, 2012).

***Método de adsorción-elución (VIRADEL):*** El método de adsorción-elución VIRADEL consiste en que los virus se ponen en contacto con una matriz de membrana en la que serán adsorbidos en condiciones específicas de pH y fuerza iónica, para luego descartar el agua donde se encontraban suspendidos y posteriormente son eluidos de la matriz en un pequeño volumen. En este paso, el volumen es todavía demasiado grande para ser inoculado directamente en cultivos celulares o para la detección molecular. La elección de la matriz adsorbente, líquido eluyente y condiciones del proceso dependerán de la naturaleza de la muestra, pero generalmente se utilizarán soluciones de pH elevado, que desplazan los virus de la matriz y posteriormente almacenados en congelación para su análisis (Ikner *et al.*, 2012).

***Métodos moleculares para detección de microorganismos en agua:*** Los métodos moleculares son usados para monitorear virus, bacterias, protozoos y otros patógenos; además sirven como apoyo para la identificación de fuentes de contaminación en distintos ambientes (Girones *et al.*, 2010). Los métodos más utilizados de primera instancia para la detección y cuantificación de virus en agua anteriormente era el ensayo en placa y los cultivos microbianos, sin embargo, el inconveniente es que la mayoría de las veces no pueden crecer debido a las necesidades específicas de cada virus para vivir en las células del hospedero y los métodos requieren de mucho tiempo de análisis (Zhang *et al.*, 2013).

El desarrollo de técnicas basadas en el DNA y RNA, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la PCR acoplada a la transcripción reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) son herramientas sensibles, rápidas y cuantitativas, que se usan para evaluar la calidad de agua y alimentos (Girones *et al.*, 2010). La técnica de PCR detecta genomas tanto de virus infecciosos como no infecciosos (Amdiouni *et al.*, 2012); hoy en día las técnicas moleculares son tan avanzadas que no solo podemos detectar sino también cuantificar a través de la PCR en

tiempo real (q-PCR, por sus siglas en inglés) y la qRT-PCR (Bosch, 1998; Zhang *et al.*, 2013).

### ***Métodos de Potabilización de agua.***

Se denomina agua potable a toda aquella agua que es bebible, es decir, consumida por personas o animales, sin el riesgo de contraer enfermedades. Por ello la necesidad de abastecer agua para uso y consumo humano es imprescindible para el mantenimiento de cualquier forma de vida. El proceso de potabilización es llevado a cabo a través de la sedimentación, coagulación, ablandamiento, eliminación de hierro y manganeso, eliminación de olor y sabor, filtrado, aeración, control de corrosión, evaporación y desinfección principalmente.

***Sedimentación:*** Es el asentamiento por gravedad de las partículas sólidas contenidas en el agua. Puede ser simple sin tratamiento, se puede llevar a cabo por decantadores o piletas que duran aproximadamente entre 40 minutos y una hora, entre mayor dure en reposo el agua mayor será el asentamiento conocido como barros; y la sedimentación secundaria, se lleva a cabo cuando la sedimentación simple no completó su función, en este caso se utilizan métodos de coagulación con sustancias como el alumbre (Arboleda, 2000).

***Filtración:*** Se emplea después de la sedimentación, la más usual se realiza con un lecho arenoso, compuesto por un manto o sostén, de piedras, granza y arena. El agua pasa por gravedad a través de los filtros, siendo el tiempo de trabajo de 30 horas (Arboleda, 2000).

***Aireación:*** La aireación es el paso del agua en caída libre como una cascada, para incrementar la proporción de oxígeno disuelto en el agua, reduciendo el dióxido de carbono en un 60% (Arboleda, 2000).

**Luz Ultravioleta (UV):** Frente a la potabilización de agua, la luz ultravioleta tiene cada vez más usos y se ha preferido en las últimas dos décadas sobre otros productos químicos en tratamientos de agua potable, aguas residuales e incluso industriales con resultados muy favorables. En Marsella, Francia durante 1910 se realizaron los primeros experimentos para utilizar la luz UV como potabilizadora de agua. Sin embargo, el elevado costo que presentaba frente al cloro y los problemas operativos de la época, hicieron que esta tecnología se rezagara hasta los años 50's (Gruber *et al.*, 2013). Hoy en día es una de las técnicas más utilizadas en potabilización de agua, ya sea en conjunto con otras técnicas o por separado.

**Procesos de oxidación avanzada (POA):** La POA es usada comúnmente para la remoción de contaminantes orgánicos, sabor y olor para la potabilización de agua. Los POA es uno de los métodos más prometedores para la remoción de contaminantes no biodegradables contenidos en aguas superficiales o subterráneas, entre los más comunes son la fotocatalisis con  $\text{TiO}_2$ , Foto-Fenton, la luz UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ , y electro-oxidación (García-Gómez *et al.*, 2011). Estos métodos se basan en la generación de radicales hidroxilo  $\text{OH}^\cdot$ , con alta capacidad de oxidación no selectiva, lo que amplía el rango de contaminantes que pueden ser tratados por esta técnica. Hoy en día, los POA son una buena herramienta para tratar aguas con contaminantes como pesticidas, herbicidas, farmacéuticos, tintes, grasas, residuos de la industria papelera y lixiviados (Bounty *et al.*, 2012; Liga *et al.*, 2013).

**Desinfección Solar de Agua Potable (SODIS):** La habilidad de la Luz Solar como agente desinfectante natural conocida como fotoinactivación, es considerada una posibilidad de potabilización de agua en zonas rurales casi sin costo alguno. En Bolivia, Mäusezahl y colaboradores (2009) realizaron un estudio piloto en 22 comunidades rurales, donde la mitad de las comunidades fueron instruidas en almacenar agua de uso en botellas de plástico de tereftalato de polietileno (PET) recicladas, previamente lavadas y estériles, expuestas al sol desde las 10 de la mañana hasta las 6 de la tarde, quedando claro que no deberían tomar agua que no fuera tratada de esta forma. Las otras once comunidades permanecieron con sus hábitos comunes de toma de agua, esto

con el fin de relacionar el uso de SODIS para disminuir la cantidad de enfermedades diarreicas en niños menores de 5 años que se presentaban en la zona. El estudio no arrojó resultados favorables a la técnica SODIS, pero marco la pauta para estudios posteriores, sin dejar de fuera la posibilidad de este tipo de alternativas ecológicas para la potabilización del agua.

Actualmente con el fin de acelerar la desinfección solar, se ha observado la fotoinactivación del peróxido de hidrógeno, aditivos con base de cobre solos o en combinación con ascorbato y/o peróxido de hidrógeno, impulsando la formación de especies reactivas del oxígeno a través de las reacciones Fenton y Udenfriend. Fisher y colaboradores (2012) realizaron un estudio para tratamiento de agua, con una exposición al sol de 10 de la mañana a 4 de la tarde en frascos de polipropileno copolimero (PPCO) y agregaron 125 mg/L de percarbonato de sodio en combinación de ácido cítrico o cobre más ascorbato. Estas combinaciones tendieron a acelerar la fotoinactivación, obteniendo resultados prometedores en cuestión del uso de técnicas de SODIS en zonas rurales.

**Métodos Químicos:** Entre los métodos químicos utilizados se encuentra el ozono como agente oxidante, se utiliza de manera limitada ya que deja sabor después de su desinfección, sin embargo, no tiene efectos residuales. El yodo es un agente químico muy costoso y necesita tiempos de contacto prolongados. La plata coloidal o iónica tiene una acción residual muy conveniente, no deja olor ni sabor, aunque pierde su efectividad en presencia de cloruros que en la mayoría de las ocasiones se encuentran en exceso en el agua. Y finalmente el cloro, que es indudablemente el elemento por excelencia más importante para la desinfección del agua a bajo costo, dosis de hasta 0.0001% puede matar microorganismos como virus entéricos entre ellos poliovirus, virus de la hepatitis A, coxsackievirus, echovirus, norovirus y adenovirus, además que se usa para eliminar olores, decolorar, ayuda a evitar la formación de algas, quita el hierro y el manganeso y ayuda a la coagulación de materias orgánicas. Por otra parte de  $\text{ClO}_2$  ha venido llamando la atención en el sentido de desinfectante, siendo capaz de desinfectar microorganismos con una alta resistencia al cloro sin formar productos halogenados que es una de las desventajas ambientales del cloro (Xue *et al.*, 2013).



## **HIPÓTESIS**

---

Es posible determinar la riqueza y abundancia relativa de los microorganismos entéricos presentes en PNCB, relacionarlos con la calidad del agua y reducirlos mediante un sistema de desinfección microbiológica.

## **OBJETIVO GENERAL**

---

Realizar un estudio microbiológico en agua del PNCB y generar un prototipo de desinfección de agua para reducir la carga de agentes enteropatógenos microbianos, que produzca agua potable, con el mínimo y/o nulo mantenimiento al más bajo costo para las comunidades mayor índice de marginación en el PNCB, en Ocampo, Chihuahua.

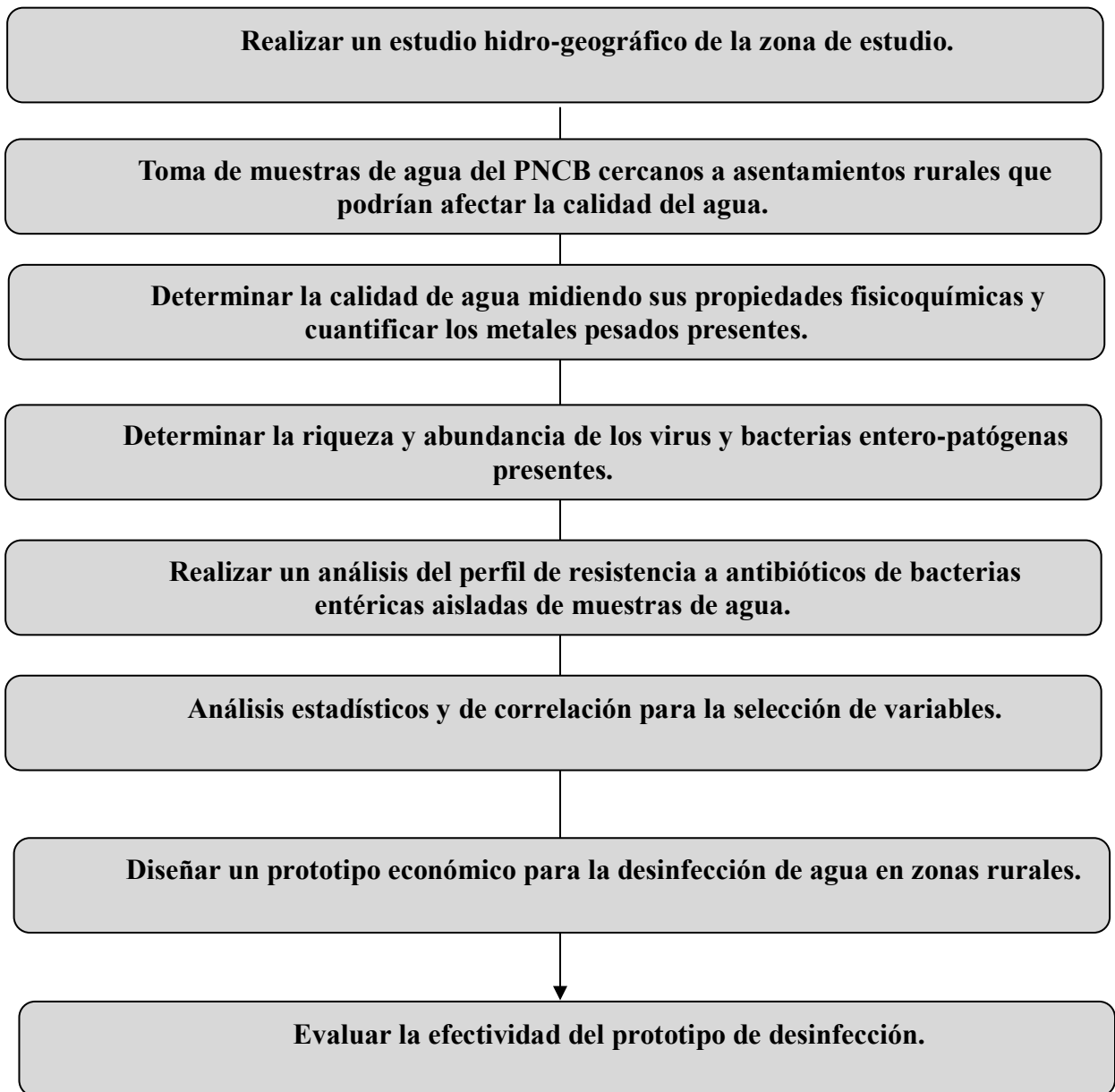
## **OBJETIVOS PARTICULARES**

---

- Realizar un análisis hidro-geográfico de la zona de estudio.
- Realizar un estudio poblacional de la zona de estudio.
- Evaluar la calidad de agua a través de las propiedades fisicoquímicas.
- Determinar la presencia de bacterias entéricas presentes en muestras de agua obtenidas en diferentes épocas del año en 13 puntos de muestreo cercanos a asentamientos rurales del PNCB.
- Determinar la riqueza y abundancia relativa de virus entéricos presentes en muestras de agua obtenidas en diferentes épocas del año en 13 puntos de muestreo cercanos a asentamientos rurales del PNCB.
- Diseñar prototipos de desinfección de agua económicos para zonas rurales.
- Evaluar la efectividad del sistema de desinfección.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

---



## METODOLOGÍA

---

### *Muestreo*

Las muestras de agua se colectaron de acuerdo a la NOM-014-SSA1-1993, en diferentes épocas del año y se seleccionaron lugares cercanos de áreas rurales/poblacionales dentro del Parque Nacional, debido a que la incidencia de microorganismos entero patógenos es mayor (Diario Oficial de la Federación, 1993). Las muestras se tomaron a una profundidad de 15 a 30 cm de la superficie del agua con las manos lavadas con agua y jabón hasta la altura del codo; en envases estériles de polipropileno de 1-L, que se abrieron hasta sumergirse dentro del agua y se cerraron antes de sacarse del agua. Los envases se colocaron en hielo para mantener la temperatura baja y evitar la reproducción de bacterias y se trasladaron a las instalaciones del laboratorio, donde se mantuvieron en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) hasta su análisis.

### *Análisis Físico-Químico*

#### *7.1.1 pH (NMX-AA-008-SCFI-2011)*

Se midió la temperatura de las disoluciones amortiguadoras de pH. Se ajustó el control de la temperatura del potenciómetro (pHTestr 2<sup>TM</sup> with ATC, USA). Las disoluciones amortiguadoras de pH 4 y 7 (Merck, Naucalpan de Juárez, México) y las muestras deben tener la misma temperatura, cuando sea posible (Diario Oficial de la Federación, 2011).

#### *7.1.2 Conductividad eléctrica (NMX-AA-093-SCFI-2000)*

Mediante un puente de Wheatone y una célula de conductividad apropiada se determinó la conductividad eléctrica por comparación, a la misma temperatura de la muestra y de una solución valorada de Cloruro de potasio (JT Baker, SA de CV, Xalostoc, México) (ver apéndice I), refiriendo el resultado a  $20^{\circ}\text{C}$ . *Calibrado.* Se verificó periódicamente la constante de la célula de medida (Corning, modelo CD-55, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando los reactivos. *Procedimiento.* Se midió la conductividad de la muestra a  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Los resultados se expresaron en  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  (Diario Oficial de la Federación, 2000).

### 7.1.3 Cloruros (NMX-AA-073-SCFI-2001)

Se utilizó un volumen de muestra de 100 mL, se ajustó el pH entre 7 y 10 utilizando las disoluciones de Hidróxido de sodio (Faga Lab, Guamuchil, Sin., México) 0,1N y/o Ácido sulfúrico (JT Baker SA de CV, Xalostoc, México) 0,1N (ver apéndice I) (Diario Oficial de la Federación, 2001c). Mezclar, dejar sedimentar y filtrar con papel filtro cualitativo. La valoración se realizó a 100 mL de muestra acondicionada, se adicionó 1-mL de solución indicadora de cromato de potasio (Química Meyer, México DF, México) al 5% (ver apéndice I). Posteriormente, se valoró con la solución patrón de nitrato de plata (JT Baker, SA de CV, Xalostoc, México) 0.014 N (ver apéndice I) hasta el vire de amarillo a naranja rojizo, manteniendo un criterio constante en el punto final. Se tituló un blanco con las muestras. El volumen final promedio de la titulación se registró y se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$\text{Cloruros en mg/litro} = 3,55 \times 1000 \frac{V - V'}{V''}$$

Donde:

V = Volumen en mL de la solución de nitrato de plata 0.014 N, utilizados en la Valoración de la solución problema.

V' = Volumen en mL, de la solución de nitrato de plata 0.014 N, utilizados en la Valoración en blanco.

V'' = Volumen en mL, de la muestra.

### 7.1.4 Dureza total (NMX-AA-072-SCFI-2001)

Debido a que las muestras no presentaban materia orgánica en exceso no se requirió tratamiento previo según la norma. Se colocaron 50 mL de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se añadió 2 mL de solución amortiguadora (ver apéndice I), luego se añadió alrededor de 0.2 g del indicador ericromo negro T (Hycel, Zapopán, Jal., México) y la muestra tomó un color vino rojizo. Se tituló con la solución de EDTA (Laboratorios Laitz SA, México D.F., México) 0.01 M (ver apéndice I) agitando continuamente hasta que desaparezca el color rojizo, se añadieron las últimas gotas con intervalos de 3 a 5 segundos. En el punto final la muestra cambió de rojizo a azul. El

volumen final promedio de la titulación se registró y se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$\text{Dureza total expresada como CaCO}_3 \text{ (mg/L)} = \frac{(A-B) \times C \times 1,000}{D}$$

Dónde:

- A son los mL de EDTA gastados en la titulación en la muestra.
- B son los mL de EDTA gastados en la titulación en el blanco (si fue utilizado).
- C son los mg de CaCO<sub>3</sub> equivalentes a 1-mL de EDTA.
- D son los mL de muestra.

Los resultados se expresan en dureza total como mg/L CaCO<sub>3</sub> (Diario Oficial de la Federación, 2001b).

#### 7.1.5 Alcalinidad (NMX-AA-036-SCFI-2001 12)

Se tomaron 100 mL en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se adicionaron 2 gotas de solución indicadora de fenoftaleína (DEQ SA de CV, San Nicolás de los Garza, Mty., México) (ver Apéndice I) y se tituló con la solución valorada de Ácido sulfúrico o ácido clorhídrico (JT Baker, SA de CV, Xalostoc, México) (0.02 N) hasta el vire de la fenoftaleína de rosa a incoloro. El volumen final promedio de la titulación se registró y se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$\text{Alcalinidad total como CaCO}_3 \text{ en mg /L} = \frac{AXN}{100} (50)(1\ 000)$$

Donde:

- A es el volumen total gastado de ácido en la titulación al vire del anaranjado de metilo en mL.
- N es la normalidad de la solución de ácido.
- 100 es el volumen de la muestra en mL.
- 50 es el factor para convertir eq/L a mg CaCO<sub>3</sub>/L.
- 1,000 es el factor para convertir mL a L.

Reporte de resultados: reportar la alcalinidad en mg CaCO<sub>3</sub>/L (Diario Oficial de la Federación, 2001a)

### 7.1.6 Acidez (NMX-AA-036-SCFI-2001 12)

Se tomaron 100 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se agregaron 2 gotas de solución indicadora de fenoftaleína (ver Apéndice I) y se introdujo una barra magnética, se tituló con solución de hidróxido de sodio (Faga Lab, Guamuchil, Sin., México) valorada (ver Apéndice I) hasta el vire del indicador, se registró el volumen empleado en la titulación (acidez total). Se transfirieron 100 mL de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se añadieron 2 gotas de solución indicadora de naranja de metilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (ver Apéndice I) (Diario Oficial de la Federación, 2001a).

El volumen final promedio de la titulación se registró y se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez total como CaCO}_3 \text{ en mg /L} = \frac{[(A \times B) - (C \times D)] (50) (1\ 000)}{100}$$

Donde:

**100** es el volumen de la muestra en mL.

**A** es el volumen de NaOH utilizado al vire de la fenolftaleína.

**B** es la normalidad de la solución de NaOH.

**C** son los mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizados en el tratamiento con peróxido.

**D** es la normalidad del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado; 50 es el factor para convertir eq/L a mg CaCO<sub>3</sub>/L, y 1000 es el factor para convertir mililitros a litros.

Reporte de resultados de acidez en mg CaCO<sub>3</sub>/L.

### ***Conteo de coliformes fecales y totales (PROY-NMX-AA-042-SCFI-2005)***

Para realizar el conteo de coliformes fecales y totales en las muestras de agua, se tomaron como base la norma PROY-NMX-AA-042-SCFI-2005 que señala la técnica de número más probable (NMP) como una de las opciones, donde las muestras de agua deben ser procesadas en un lapso no mayor a 24 h posteriores al muestreo (Diario Oficial de la Federación, 2005). Para lograrlo, se inocularon por triplicado 10 mL de las muestras de agua cruda en tubos con 10 mL de caldo lactosado 2X (BD Bioxon, Estado de México, México) con campana de Durham (ver apéndice I); así como también por triplicado la inoculación de 0.1-mL de muestra de agua cruda en tubos con 10 mL de

caldo lactosado 1X con campana de Durham (ver apéndice I) y 1-mL de muestra de agua cruda en tubos con 10 mL de caldo lactosado 1X con campana de Durham. Se incubaron (Felisa, FE-132, Jalisco, México) todos los tubos (un total de 9) a 37°C por 24 h para luego revisar la formación de gas como resultado positivo; como resultado confirmativo los tubos se incubaron hasta 48 h para evitar falsos negativos. Los tubos que presentaron turbidez y formación de gas, se tomaron como resultados positivos y 1mL de cada tubo positivo se inoculó por separado en tubos de 10 mL de caldo verde brillante (BD Bioxon, Estado de México, México) y 10 mL cuenta estándar (EC, por su siglas en inglés) (DIBCO, México D.F., México) (ver apéndice I), para luego leerse de igual forma después de incubarse a 37°C para determinar coliformes totales y 44°C para coliformes fecales, respectivamente. De nuevo se revisó la turbidez y formación de burbujas de gas como resultado positivo. La norma exige que los tubos permanezcan hasta 48 horas para descartar falsos negativos.

Para calcular la concentración aproximada de coliformes fecales y totales se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{NMP/100 ml} = \sqrt{\frac{\text{No. de tubos positivos} \times 100}{\text{ml de muestra en tubos negativos} \times \text{ml de muestra en todos los tubos}}}$$

O también ver directamente la combinación de tubos positivos que aparecen en la tabla 28 del apéndice III que indica la norma PROY NMX-AA-042-SCFI-2005 cuando se hacen triplicados (Diario Oficial de la Federación, 2005).

***Análisis estadístico para conteo de coliformes fecales y totales, por punto de muestreo y época del año.***

Para el análisis de la técnica del NMP, los datos fueron normalizados a través de la transformación de los datos a logaritmo base 10. Un modelo general lineal de ANOVA fue utilizado para determinar diferencias significativas. La comparación entre grupos se hizo con el método de Tukey. Se utilizó la versión 17 del minitab para el análisis estadístico, donde se calcularon las medias geométricas de las temporadas



haciendo un conjunto de todos los puntos y para el análisis de puntos de muestreo se hizo un conjunto de todas las temporadas.

### ***Aislamiento de bacterias enteropatógenas.***

Una vez analizados los datos del NMP, las muestras que se encuentren por fuera de la NOM-001-ECOL-1996 la cual establece un límite permisible de 1,000 NMP/100 mL coliformes fecales en aguas nacionales que se sabe que reciben una descarga de aguas residuales (Diario Oficial de la Federación, 1997). Estas muestras que se encontraron fuera de la norma, fueron procesadas como se muestra el esquema de la Figura 1 (modificado de Al Bayatti *et al.*, 2012).

Muestra	Tamaño de la muestra	Se sembró e incubó toda la noche a:	Para recuperar	Se realizó un re-inoculo en:	Se realizó un análisis macroscópico y microscópico	Para obtener colonias puras se re-inoculó en los siguientes medios:
1 L de agua (Sólo muestras que excedieron los límites de 1,000 NMP/100mL)	10 mL de agua cruda	Caldo de Selenito (37°C) (DIBICO, México DF, México)	<i>Salmonella &amp; Shigella</i>	Agar SS (37°C) (DIBICO, México DF, México)		Agar MacConkey (37°C) (BD Bioxon, Edo. de México, México)
		Caldo de Tetrionato (37°C) (DIBICO, México DF, México)	<i>Salmonella &amp; Shigella</i>	Agar SS (37°C) (DIBICO, México DF, México)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Macroscópico: Forma, tamaño, tipo de borde, luz transmitida y luz reflejada</li> </ul>	Agar MacConkey (37°C) (BD Bioxon, Edo. de México, México)
		Caldo con 2% de NaCl (37°C) (Ver apéndice II)	<i>Vibrio sp.</i>	Agar TCBS (37°C) (BD Bioxon, Edo. de México, México)		Agar TCBS (37°C) (BD Bioxon, Edo. de México, México)
		Agua peptonada (37°C) (Ver apéndice II)	<i>Vibrio sp.</i>	Agar TCBS (37°C) (BD Bioxon, Edo. de México, México)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Microscópico: Tinción de gram</li> </ul>	Agar TCBS (37°C) (BD Bioxon, Edo. de México, México)
		Caldo nutritivo (42°C) (DIBICO, México DF, México)	Entero-patógenos ( <i>Escherichia coli sp.</i> )	Agar MacConkey (37°C) (BD Bioxon, Edo. de México, México)		Agar MacConkey (37°C) (BD Bioxon, Edo. de México, México)

**Figura 1.** Esquema del procesamiento de muestras de agua para aislamiento de enteropatógenos.

Todas las cepas aisladas se conservaron en congelación de -20°C en caldo de soya tripticaseína (BD Bioxon, Estado de México, México) con glicerol (JT Baker, SA de CV, Xalostoc, México) al 20% (ver apéndice II). Posteriormente se realizó el aislamiento de colonias con características distintas. Los aislamientos se analizaron micro y macroscópicamente, y se identificaron bioquímicamente con el equipo MicroScan (DADE Behring, AutoScan-4, West, Sacramento, USA).

### ***Identificación bioquímica de bacterias enteropatógenas.***

Para la caracterización bioquímica se usó el combo panel NEG tipo 44 (SIEMENS, USA) con las instrucciones del fabricante en el equipo AutoScan-4 (DADE Behring, AutoScan-4, West, Sacramento, USA), el cual cuenta con 96 pocillos con 27 pruebas diferentes, incluyendo las bioquímicas que permiten la caracterización de bacterias Gram negativas; además de incluir un perfil amplio de resistencia a antibióticos. Este equipo realiza un análisis de probabilidad, calculando la probabilidad normalizada de una lista de microorganismos basándose en la probabilidad de una reacción positiva para cada prueba, se evalúan 5 o menos microorganismos con la probabilidad más alta, dentro de un valor de corte predeterminado para obtener la probabilidad porcentual. Esta determinación se basa en la suma de las probabilidades y la división posterior de la probabilidad de cada microorganismo por la suma total.

### ***Técnica de adsorción-elución de virus (VIRADEL)***

Para la filtración de virus se usó la técnica VIRADEL propuesta por Soto (2011) como el sistema de filtración de muestras de agua, usando para la captura de virus la membrana comercial Virocap VCM de 47 mm (VCM-47mm, Scientific methods, Indiana, USA) que es una membrana con carga positiva para capturar virus por carga, para luego realizar la extracción de DNA y RNA viral del mismo (Goyal y Gerba, 1983). Este sistema consiste en utilizar un compresor adaptado a un tanque Cornelious® (CORCO, VSDA-VS-01, Canadá) el cual dirige el flujo de la muestra a través de -el o - los portafiltros correspondientes, descargando el filtrado en un contenedor Labconco® (Labconco, USA). Para utilizar el equipo de filtración, el equipo se limpió previamente con 1-L de cloro al 10% (Alen, Santa Catarina, N.L., México), esta mezcla se filtró y posteriormente se lavó el equipo con 5 litros de agua para evitar que el cloro inactivara las muestras problema, esto se realizó antes de cada corrida de muestra. Y al final del día el equipo se limpiaba con 1-L de hidróxido de sodio 0.5 M (Faga Lab, Guamuchil,

Sin., México) (ver apéndice I), posteriormente se lavó el equipo con 5 L de agua destilada para eliminar los residuos de NaOH.

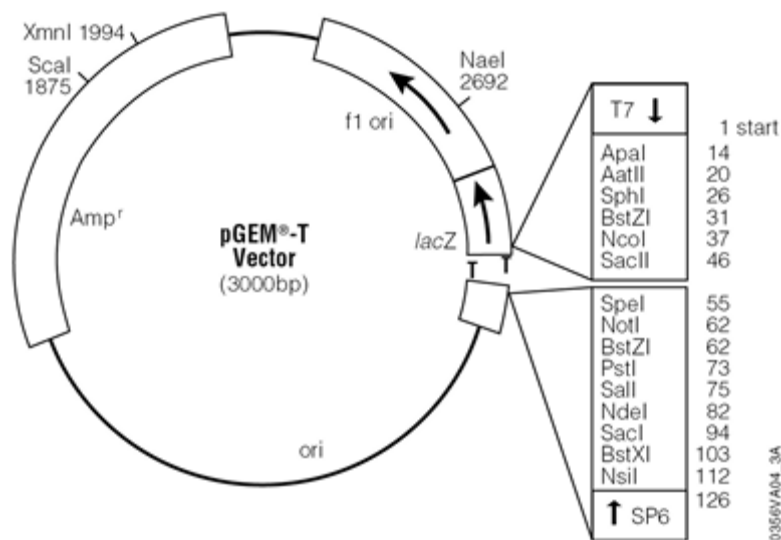
Para la elusión de virus del Virocap VCM-47 se colocó la membrana en cajas Petri de vidrio esterilizadas previamente en autoclave (All American, modelo UL 25X1, Wisconsin, USA) por 15 min a 120°C, y se agregó 20 mL de extracto de carne (1%-glicina (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA), 0.5M-tween 80 a pH 9 (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA), (ver apéndice II) y se colocó en agitación constante (VWR Scientific Products, DS-500, Atlanta, USA) a 65 rpm por 30 min. El caldo del extracto se pasó a un vaso de precipitado y se agregaron 0.3 g de peptona de carne (BBL, New Jersey, USA) y se ajustó el pH a 3.5. Una vez ajustado el pH el caldo del extracto se pasó a un tubo falcon nuevo y se centrifugó por 30 min a 5,000 rpm a 4°C. Después de centrifugar (Eppendorf, 5804R, Hamburg, Alemania) se retiró el sobrenadante cuidadosamente con pipeta estéril y finalmente se resuspendió en PBS a pH de 7.4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). El concentrado se conservó en congelación de -20°C hasta su posterior análisis (Soto, 2011).

#### ***Muestras control para captura de virus***

La preparación de las muestras positivas a RV (1033 y 659) y NV (1004 y 1034) de la coproteca UACH-FCQ. En un frasco PET de 1L se esterilizó 1-L de agua bajo la luz UV por una hora y luego se infectó con 1-mL de la muestra RV y/o NV.

#### ***Preparación de controles internos virales***

Los productos de RT-PCR de las muestras positivas para RV y NV fueron clonados en el plásmido pGEM (Figura 2) utilizando el kit DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymoresearch, California, USA).



**Figura 2.** Esquema general del plásmido pGEM

### 7.1.7 Preparación del inserto a clonar

Para cada gen se calculó la cantidad en nanogramos (ng) de cada gen a clonar de acuerdo a la siguiente fórmula en relación (3:1):

$$\frac{(50 \text{ ng del vector})(\text{Kb del inserto})}{\text{Kb del Vector}} \left( \frac{3}{1} \right) = \text{ng del inserto}$$

### 7.1.8 Reacción de ligación.

La ligación se llevó a cabo con el Kit de Clonación pGEM-T Vector System (Promega, Wisconsin, USA). Una vez realizados los cálculos de cada gen, en la tabla 1 se muestra la mezcla de reacción para la ligación de los fragmentos a clonar. La mezcla de reacción se dejó incubar por 12 h a 4°C.

**Tabla 1.** Reacción de ligación para clonar en pGEM

Reactivos	[Concentración final]	Volumen
Buffer de ligación T4 DNA ligasa	2X	5 µL
pGEM-T	50 ng	1 µL
Producto de PCR	Calculado ng/µL	Calculado ng/µL
T4 DNA ligasa	3U/µL	1 µL
Agua libre de nucleasas	-	Calculado µL
	Volumen final =	10 µL

### *7.1.9 Transformación de células competentes JVI09.*

En un tubo nuevo de 1.5 mL (Sorenson, Utah, USA) se colocaron 50 µL de células competentes previamente descongeladas en hielo y 5 µL de la reacción de ligación preparada, se agitó suavemente y se incubó en hielo durante 30 min. Luego se incubó a baño maría (VWR, modelo 1130, Atlanta, USA) a 42°C por 90 s y se regresó al tubo a incubar en hielo por 2 min. Se adicionaron 500 µL de medio de cultivo SOC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y se mezcló suavemente. El contenido se transfirió a un tubo de ensaye estéril de 13x100 y se incubó 90 min a 37°C con agitación (VWR Scientific Products, DS-500, Atlanta, USA). El caldo de cultivo se transfirió con micropipeta (Eppendorf, Hamburg, Alemania) a un tubo de 1.5 mL y se centrifugó (Eppendorf, modelo 5804R, Hamburg, Alemania) 1-min a 10,000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 µL de medio de cultivo SOC. Posteriormente, se inocularon con una asa en “L” de vidrio en cajas de agar LB (USB, Cleveland, Ohio, USA) adicionado con ampicilina (AMSA, Edo. de México, México) (100 µg/mL), IPTG (Invitrogen, California, USA) (0.1 M) y X-gal (Invitrogen, California, USA) (50 mg/mL). Las cajas se incubaron a 37°C por 12 h. Transcurrido el tiempo de incubación se sembraron las colonias aisladas color azul y blanco en caldo LB con ampicilina (100 µg/mL) (ver apéndice II) en agitación para extraer el DNA plasmídico y corroborar la presencia del constructo viral en gel de agarosa (Bioline, Massachusetts, USA) al 1%.

### ***Extracción de RNA por el método de TRIZOL.***

Del concentrado obtenido por el método de elución de virus, se tomaron 300 µL y se agregaron 700 µL de trizol (Invitrogen, California, USA), 12.5 µL de buffer de lisis (ver apéndice I) y se mezclaron en vórtex (KitLab, VM-300, México) por 30 s. Se dejó reposar 5 min en hielo y se agregó 200 µL de cloroformo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) se mezcló bien por vórtex y se regresó al hielo por 5 min. Se centrifugó 15 min a 12,000 rpm a 4°C y se separó la fase acuosa en un tubo limpio, se agregaron 600 µL de isopropanol (JT-Baker, SA de CV, México) y se incubó 2 h en ultracongelador a -70°C

(Thermoforma, modelo 5461, USA) o en congelador (Fisher Scientific, modelo Isotemp, USA) toda la noche a -20°C. Se centrifugó (Eppendorf, modelo 5804R, Hamburg, Alemania) 15 min a 12,000 rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se agregó 1-mL de etanol absoluto (JT-Baker, SA de CV, México) para lavar la pastilla y se centrifugó 10 min a 12,000 rpm a 4°C para luego decantar y dejar secar la pastilla. Finalmente se resuspendió en 20 µL de PBS a pH de 7.4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y se guardó a -20°C para su posterior análisis (Herring *et al.*, 1982; Simms *et al.*, 1993).

### ***Determinación de RV por RT-PCR punto final***

Para la determinación de RV por RT-PCR punto final se utilizaron los siguientes juegos de *primers* que se muestran en la tabla 2; en la columna uno se muestra el gen que se amplifica con dichos *primers*, en la columna dos el nombre del primer u oligo, en la columna tres la orientación del primer y en la columna cuatro el tamaño del producto esperado en pares de bases. Se utilizó la pareja de *primers* Con3-Con2 o Con3-IT-1 según el gen que se amplificó (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1999).

**Tabla 2.** Juegos de *primers* para detección de RV.<sup>1</sup>

<b>Gen</b>	<b>Oligo</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Orientación</b>	<b>Producto</b>
VP4	Con3 (Oligo T4, Irapuato, México)	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	<i>Forward</i> (Fw)	876 pb
VP4	Con2 (Oligo T4, Irapuato, México)	ATTTCGGACCATTTATAACC	<i>Reverse</i> (Rw)	
VP4 [8]	IT-1 (Oligo T4, Irapuato, México)	TCTACTTGGATAACGTGC	<i>Reverse</i> (Rw)	345 pb

<sup>1</sup>Tomado de Gouvea et al, 1990; Gentsch et al, 1999

#### ***7.1.10 Condiciones de RT para detección de RV***

En la tabla 3 se muestran las condiciones de amplificación de RT para RV. Se utilizó el primer reverso Con2 (Oligo T4, Irapuato, México) según el gen a amplificar (modificado de Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1999). El cDNA obtenido de la RT se utilizó para la reacción de PCR.

**Tabla 3.** Condiciones para la reacción de RT detección de RV.

	<b>Reactivo</b>	<b>[Inicial]</b>	<b>[Final]</b>	<b>Volumen</b>
<b>1ra. Fase</b>	Muestra (RNA)	50 ng	23.8 ng	2 µL

	Con 2 (Oligo T4, Irapuato, México)	1 $\mu\text{m}$	0.23 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{L}$
	H <sub>2</sub> O inyectable (PISA, México)	-	-	1.2 $\mu\text{L}$
<b>Volumen Final =</b>				4.2 $\mu\text{L}$
<i>El programa para la primera fase es 1 ciclo a 94°C por 5 minutos.</i>				
<b>2da. Fase</b>	Buffer RT (Promega, Wisconsin, USA)	5X	1 X	2 $\mu\text{L}$
	MgCl <sub>2</sub> (Promega, Wisconsin, USA)	50 mM	2.5 mM	0.5 $\mu\text{L}$
	dNTP's (Promega, Wisconsin, USA)	2.5 mM	0.8 mM	3.2 $\mu\text{L}$
	RT (1ra. Fase)	200 U/ $\mu\text{L}$	20 U	0.1 $\mu\text{L}$
	<b>Volumen Final =</b>			
<i>El programa para la segunda fase es 1 ciclo a 42° por 30 minutos.</i>				

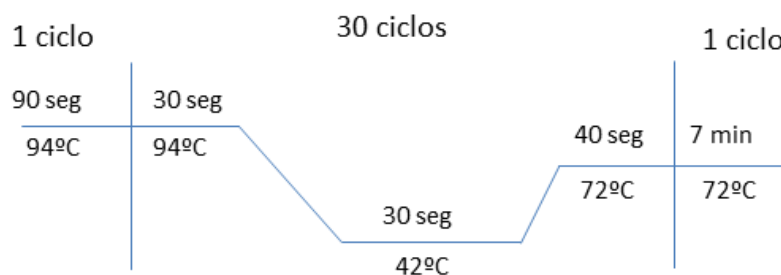
### 7.1.11 Condiciones de PCR para la detección de RV

Las condiciones óptimas para la amplificación de RV por punto final se muestran en la tabla 4 (modificado de Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1999).

**Tabla 4.** Condiciones para la reacción de PCR detección de RV.

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Volumen
Agua inyectable (PISA, México)	-	-	16.3 $\mu\text{L}$
Buffer PCR (Promega, Wisconsin, USA)	10X	1X	2.5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (Promega, Wisconsin, USA)	50 mM	2 mM	1 $\mu\text{L}$
Con 3 (Oligo T4, Irapuato, México)	25 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
Con 2 (Oligo T4, Irapuato, México)	25 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{L}$
dNTP's (Promega, Wisconsin, USA)	2.5 mM	0.4 mM	2 $\mu\text{L}$
Taq polimerasa (Promega, Wisconsin, USA)	5 U/ $\mu\text{L}$	0.04 U	0.2 $\mu\text{L}$
cDNA	-	-	1 $\mu\text{L}$
<b>Volumen Final =</b>			25 $\mu\text{L}$

El programa para el termociclador (Hybaid, PCR express, UK) para la reacción de PCR punto final de RV se muestra en la Figura 3. Al finalizar el programa el termociclador se programó a 4°C por tiempo indefinido hasta el retiro de muestras. Las muestras se conservaron a -20°C.



**Figura 3.** Esquema del programa de amplificación para la PCR punto final RV

### ***Determinación de NV por RT-PCR punto final***

Para la determinación de NV por RT-PCR punto final se utilizaron los siguientes juegos de *primers* que se muestran en la tabla 5; en la columna uno se muestra el gen que se amplifica con dichos *primers*, en la columna dos el nombre del *primer* u oligonucleótido, en la columna tres la orientación del *primer* y en la columna cuatro el tamaño del producto esperado en pares de bases. Se utilizó la pareja de *primers* JV12 y JV13 (Oligo T4, Irapuato, México) para la amplificación del gen RdRp de Norovirus (Thorven *et al.*, 2005).

**Tabla 5.** Juegos de *primers* para detección de NV.<sup>1</sup>

Gen	Oligo	Secuencia 5'-3'	Orientación	Producto
RdRp	JV12 (Oligo T4, Irapuato, México)	ATACCACTATGATGCAGATTA	Fw	326 pb
	JV13 (Oligo T4, Irapuato, México)	TCATCATCACCATAGAAAGAG	Rw	

<sup>1</sup>Thorven *et al.*, 2005

#### ***7.1.12 Condiciones de RT para detección de NV***

En la tabla 6 se muestran las condiciones de amplificación de RT para NV. Se utilizó un solo primer reverso JV13 (Oligo T4, Irapuato, México) según el gen a amplificar (modificado de Thorven *et al.*, 2005). El cDNA obtenido de la RT se utilizó para la PCR.

**Tabla 6.** Condiciones para la reacción de RT detección de RV.

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Volumen
Muestra (RNA)	50 ng	12.5 ng	5 µL



JV13 (Oligo T4, Irapuato, México)	12 $\mu\text{m}$	2.5 $\mu\text{m}$	4 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O inyectable (PISA, México)	-	-	6.8 $\mu\text{L}$
Buffer RT (Promega, Wisconsin, USA)	5X	0.5 X	2 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (Promega, Wisconsin, USA)	50 mM	3 mM	1.2 $\mu\text{L}$
dNTP's (Promega, Wisconsin, USA)	25 mM	1 mM	0.8 $\mu\text{L}$
RT (1ra. Fase)	200 U/ $\mu\text{L}$	2 U	0.2 $\mu\text{L}$
<b>Volumen Final =</b>			20 $\mu\text{L}$
<i>El programa para la segunda fase es 1 ciclo a 42° por 60 minutos.</i>			

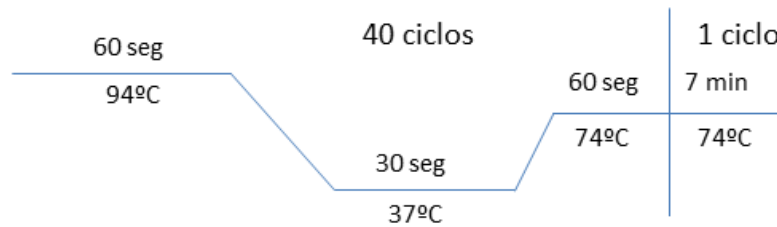
### 7.1.13 Condiciones para la PCR para detección de NV

En la tabla 7 se muestran las condiciones óptimas para la amplificación de Nv por punto final (modificado de Thorven *et al.*, 2005).

**Tabla 7.** Condiciones para la reacción de PCR detección de NV.

<b>Reactivo</b>	<b>[Inicial]</b>	<b>[Final]</b>	<b>Volumen</b>
Agua inyectable (PISA, México)	-	-	8.2 $\mu\text{L}$
Buffer PCR (Promega, Wisconsin, USA)	5X	1X	4 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (Promega, Wisconsin, USA)	25 mM	1.5 mM	1.2 $\mu\text{L}$
JV12 (Oligo T4, Irapuato, México)	12 $\mu\text{M}$	0.75 $\mu\text{M}$	1.24 $\mu\text{L}$
dNTP's (Promega, Wisconsin, USA)	25 mM	0.2 mM	0.16 $\mu\text{L}$
Taq polimerasa (Promega, Wisconsin, USA)	5 U/ $\mu\text{L}$	0.04 U	0.2 $\mu\text{L}$
cDNA	-	-	5 $\mu\text{L}$
<b>Volumen Final =</b>			20 $\mu\text{L}$

El programa para el termociclador (Hybaid, PCR express, UK) para PCR punto final de NV se muestra en la Figura 4. Al finalizar el programa el termociclador se programó a 4°C por tiempo indefinido hasta el retiro de muestras. Las muestras se conservaron a -20°C.



**Figura 4.** Esquema del programa de amplificación PCR punto final NV

### ***Electroforesis en gel de agarosa al 1%***

Se hizo un gel de agarosa al 1% (Bioline, Massachusetts, USA) disuelta en buffer TAE (ver apéndice I). Se clarificó el gel por calentamiento y se tiñó con bromuro de etidio (1mg/μL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); se dejó polimerizar en el porta geles durante una hora. El porta gel con el gel de agarosa se colocó en la cámara de electroforesis (Owl Separation Systems, Model B1, New Hampshire, USA), donde se cargaron 2 μL del MPM (Promega, Wisconsin, USA) en el primer carril y 2μL de buffer de carga naranja (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (ver apéndice I) más 3 μL de muestra en el resto de los carriles. La cámara de electroforesis se conectó a la fuente de poder (PowerBac 300, BIORAD, California, USA) y se corrió durante una hora a 60 volts.

### ***Preparación de la Curva de calibración para qPCR de NV y RV***

***Extracción de DNA plasmídico por MIDIPREP:*** Se inocularon 3 μL por separado de los constructos virales RV1017-pGEM y NV1004-pGEM en tubos de 13x100 mm con 10 mL de caldo LB(USB, Ohio, USA)/Ampicilina(AMSA, Edo. de México, México) (100μg/mL) y se incubó (MRC, modelo RKC CB700, USA) en agitación constante (VWR Scientific Products, DS-500, Atlanta, USA) de 200 rpm a 37°C por 12 a 16 h. Posteriormente el caldo se pasó a tubo cónico estéril de 15 mL y se centrifugó (Eppendorf, modelo 5804R, Hamburg, Alemania) a 12,000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante con micropipeta (Eppendorf, Hamburg, Alemania)

cuidadosamente para no perder la pastilla; luego la pastilla se resuspendió en vórtex (KitLab, VM-300, Edo. de México, México) en 100  $\mu$ L de STE (ver apéndice I) y se transfirió el contenido a un tubo de 1.5 mL. Se agregaron 200  $\mu$ L de solución fresca de lisis (ver apéndice I) y se mezcló por inversión, luego se agregaron 100  $\mu$ L de acetato de potasio (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 3M a pH de 6 y se agitó vigorosamente. Se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le agregó un volumen igual de fenol (JT Baker, SA de CV México): cloroformo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA): alcohol isoamílico (JT Baker, SA de CV, Xalostoc, México) (24:24:1) y se agitó por 5 min suavemente hasta presentar un aspecto lechoso. El tubo se centrifugó a 12,000 rpm a temperatura ambiente por 5 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 25  $\mu$ L de acetato de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 3M y 800  $\mu$ L de etanol absoluto (JT Baker, SA de CV, Xalostoc, México), se dejó incubar por 3 h a  $-70^{\circ}\text{C}$  o toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó de nuevo por 15 min a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se realizó un lavado con 1-mL de etanol (JT Baker, SA de CV, Xalostoc, México) al 70% rotándolo por las paredes del tubo, se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante. Finalmente una vez seca la pastilla se resuspendió en buffer TE (ver apéndice I) y se almacenó  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para verificar la presencia del plásmido se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Bioline, Massachusetts, USA) al 1% (Nicoletti *et al.*, 1993).

***Linealización de DNA plasmídico por enzimas de digestión:*** Una vez obtenido el DNA plasmídico se sometió a digestión con la enzima NcoI (Promega, Wisconsin, USA) a  $37^{\circ}\text{C}$  de 3 a 4 h. Posteriormente para desactivar la enzima se sometió la mezcla de reacción (Tabla 8) a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Para corroborar la presencia del plásmido se visualizó en un gel de agarosa (Bioline, Massachusetts, USA) al 1%.

**Tabla 8.** Reacción de digestión por enzima NcoI.

Reactivo	Volumen
Agua	16 $\mu$ L
Buffer 10X	2 $\mu$ L
DNA	1 $\mu$ L
Enzima NcoI	1 $\mu$ L
Volumen final=	20 $\mu$ L

**Curvas estándar de DNA plasmídico:** Para establecer el número de copias virales se realizaron curvas estándar con 5 a 10 diluciones seriadas en base 10 del plásmido con el gen viral y agua estéril a un volumen final de 30  $\mu\text{L}$ . La cuantificación se realizó en base en la siguiente fórmula de Número de copias de DNA plasmídico (Ward *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2001).

$$\text{Copias/mL} = \frac{(6.022 \times 10^{23} \text{ mol}) (\text{Concentración del plásmido lineal ng/}\mu\text{L})}{\text{Numero de Pares de bases } (6.58 \times 10^2 \text{ g/mol}) (1 \times 10^9)}$$

Donde:

$6.58 \times 10^2 \text{ g/mol}$ : Peso de un par de bases

$6.022 \times 10^{23} \text{ mol}$ : Número de Avogadro

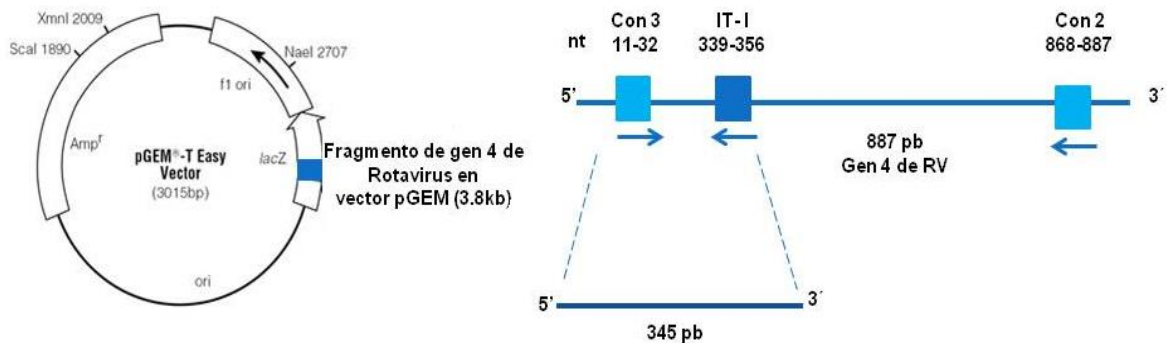
**Preparación de curvas para RV:** Para la detección de RV en muestras de agua se utilizó el pDNA del constructo viral interno RV1017-pGEM. Se partió de un estándar de 1,090  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y se hicieron diluciones seriadas en base 10 en un rango de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^2$  copias por reacción por duplicado. La curva de calibración se colocó en el equipo de mayor a menor. Con la pendiente obtenida con los datos de la curva de calibración se pudo calcular el valor en número de copias por reacción de las muestras despejando “X” como la incógnita y “Y” correspondía a la Ct de dicha muestra.

**Preparación de curvas para NV:** Para la detección de NV en muestras de agua se utilizó el pDNA del constructo viral interno NV1004-pGEM, se extrajo el pDNA y se linealizó el plásmido, para posteriormente realizar la qPCR con los primers JV12 y JV13. El amplicon que se trabajó fue de aproximadamente 326 pb. Se prepararon 7 diluciones seriadas a partir de una muestra estándar de 400  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , las diluciones variaron en un rango de  $1.1 \times 10^8$  a  $1.1 \times 10^2$  copias/reacción por duplicado. La curva de calibración se colocó en el equipo de mayor a menor. Con la pendiente obtenida con los datos de la curva de calibración se pudo calcular el valor en número de copias por

reacción de las muestras despejando “X” como la incógnita y “Y” que correspondía a la Ct de dicha muestra.

### ***Determinación de RV por RT-qPCR SYBR® Green***

Para la determinación de RV se tomó el cDNA que se obtuvo en el apartado 7.11.1, utilizando los juegos de *primers* Con3-Con2 o Con3-IT-1 (Oligo T4, Irapuato, México) según el gen que se amplificó (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1999). Para optimizar la eficiencia en los experimentos en qPCR de rotavirus, se decidió trabajar con un amplicón más pequeño de 345 pb utilizando el juego de *primers* CON3/IT-1 (Kottaridi *et al.*, 2012). En la técnica de qPCR se utilizó el kit Master Mix Brilliant III Ultra Fast SYBR® Green qPCR (Agilent, California, USA) y se utilizó DNA plasmídico como molde. En la Figura 5 se observa el esquema del gen VP4 y la posición de los juegos de *primers* utilizados para la determinación de RV por RT-qPCR en el vector pGEM.



**Figura 5.** Esquema del fragmento del gen VP4 de RV

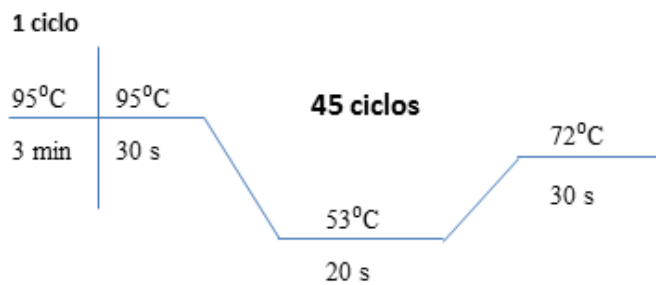
#### ***7.1.14 Condiciones de qPCR SYBR® Green. Detección de RV***

En la tabla 9 se muestran las condiciones de amplificación de qPCR SYBR® Green con el kit Master Mix Brilliant III Ultra Fast SYBR® Green qPCR (Agilent, California, USA) para la detección de RV. Se realizó una corrida inicial con el juego de primers (Con2-Con3 de Oligo T4, México) con un amplicón esperado de 876 pb y las siguientes corridas se utilizaron el juego Con3-IT1 (Oligo T4, Irapuato, México) con un producto esperado de 347 pb(modificado de Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1999).

**Tabla 9.** Condiciones de la reacción para qPCR SYBR® Green para la detección de RV

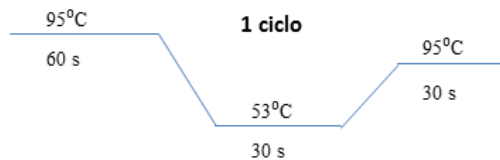
Reactivos (Agilent, California, USA)	[Inicial]	[Final 0.5µM]	Volumen
Buffer qPCR	2X	1X	10µL
DYE ROX 30 nm	-	-	0.3 µL
IT-I/Con 2 (Fw)	4 µM	0.5 µM	2.5 µL
CON3 (Rw)	4 µM	0.5 µM	2.5 µL
DNA Plasmídico	-	-	1µL
Agua	-	-	3.7
Volumen Final=			20 µL

El programa para el termociclador (Agilent Technologies Stratagene 3005p, USA) para qPCR punto final de RV se muestra en la Figura 6. Al finalizar el programa, el termociclador se programó a 4°C por tiempo indefinido hasta el retiro de muestras. Las muestras se conservaron a -20°C.



**Figura 6.** Esquema del programa de amplificación qPCR para RV

En la Figura 7 se muestra el programa de la curva de disociación que se utiliza para verificar que las dobles cadenas que se forman efectivamente sean los productos esperados. El siguiente programa se realizó en un solo ciclo y se programó en el equipo junto con el programa de amplificación.



**Figura 7.** Esquema del programa para la curva de disociación qPCR de RV

Las muestras positivas se confirmaron por secuenciación. Los productos de PCR de Rotavirus fueron purificados y secuenciados por electroforesis capilar en la compañía MACROGEN® (Seúl, Corea del Sur).

### ***Determinación de NV por RT-qPCR SYBR® Green***

Para la determinación de NV se tomó el cDNA que se obtuvo como se describe en el apartado 7.12.1, utilizando los juegos de *primers* JV12-JV13 (Scipioni *et al.*, 2008). Para la optimización de la técnica de qPCR se utilizó el kit Master Mix Brilliant III Ultra Fast SYBR® Green qPCR (Agilent, California, USA) y se utilizó DNA plasmídico como molde.

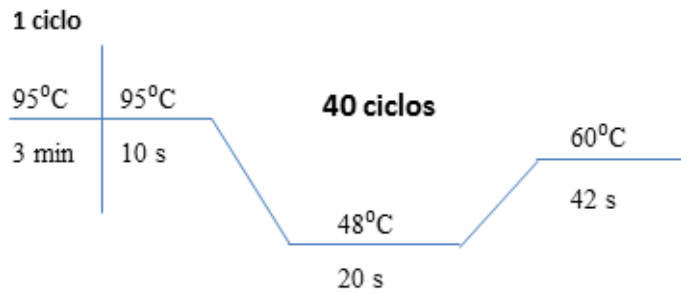
#### ***7.1.15 Condiciones de qPCR SYBR® Green. Detección de NV***

En la tabla 10 se muestran las condiciones de amplificación de qPCR SYBR® Green para la detección de NV (Thorven *et al.*, 2005).

**Tabla 10.** Condiciones para la reacción de qPCR SYBR® Green. Detección de NV

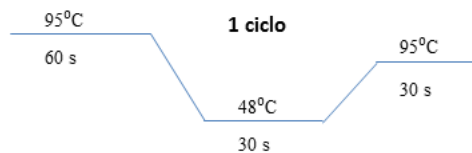
<b>Reactivo</b>	<b>[Inicial]</b>	<b>[Final 0.2µM]</b>	<b>Volumen</b>
Buffer qPCR	2X	1X	10µL
DYE ROX 30 nm	-	-	0.3 µL
JV12 (Fw)	4 µM	0.2 µM	1 µL
JV13 (Rw)	4 µM	0.2 µM	1 µL
DNA plasmídico	-	-	1 µL
Agua	-	-	6.7
Volumen Final=			20 µL

El programa para el termociclador (Agilent Technologies Stratagene 3005p, USA) para qPCR punto final de NV se muestra en la Figura 8. Al finalizar el programa el termociclador se programó a 4°C por tiempo indefinido hasta el retiro de muestras. Las muestras se conservaron a -20°C.



**Figura 8.** Esquema del programa de amplificación qPCR para detección de NV

En la Figura 9 se muestra el programa de la curva de disociación que se utiliza para verificar que las dobles cadenas que se forman efectivamente sean los productos esperados. El siguiente programa se realizó en un solo ciclo y se programó en el equipo junto con el programa de amplificación.



**Figura 9.** Esquema del programa para la curva de disociación de detección de NV.

Las muestras positivas se confirmaron por secuenciación. Los productos de PCR de Norovirus fueron purificados y secuenciados por electroforesis capilar en la compañía MACROGEN® (Seúl, Corea del Sur).

### ***Análisis filogenético de muestras positivas***

Las muestras positivas que se enviaron a secuenciar, se analizaron de la siguiente manera: las secuencias en formato “fasta” se compararon con sus electroferogramas correspondientes y se corrigieron los errores en las bases, además de que se borraron los extremos que presentaban rasgos de daño dentro de la secuencia. Se seleccionaron las secuencias más representativas para los segmentos de interés en el GenBank de la base de datos del NCBI. Las secuencias del Genbank se juntaron en un solo archivo con las secuencias de virus y se editaron en Bioedit versión 7.2.5, luego fueron alineadas y de

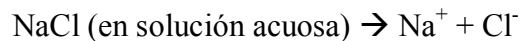


nuevo editadas en el programa Clustal versión X2 y Seaview versión 4 para luego ser guardadas en formato fasta. Finalmente en el programa MEGA versión 7.0, se realizó un árbol filogenético con *Neighbor joining* y *Kimura method* como modelo de análisis y utilizando el valor de G calculado por el software (Donato *et al.*, 2016).

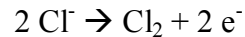
### ***Diseño del prototipo del generador de Cloro***

Aparato de Electrólisis: La electrolisis es utilizada para separar iones mediante electricidad, en este caso se utilizó sal de mesa como insumo principal, para la generación de cloro que será utilizado para la purificación de agua. La reacción de generación electrolítica de cloro es la siguiente:

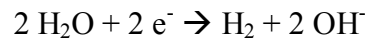
En solución acuosa el NaCl se separa en ion Na<sup>+</sup> más Cl<sup>-</sup> :



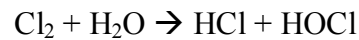
Dentro del aparato en el ánodo, por cada dos iones de Cl<sup>-</sup> se forma un ión cloruro que se convierte en cloro en forma de gas más electrones:



Por otra parte en el cátodo, 2 moléculas de agua más dos electrones, forman hidrógeno más un ion hidroxilo:



El cloro formado en el ánodo se disuelve en el agua para la posterior formación de ácido hipocloroso y ácido clorhídrico:



La base de este prototipo se contempló debido a la facilidad de encontrar sal de mesa en casa. Los materiales a utilizar es un cátodo de acero inoxidable 316, y un ánodo de grafeno, material de PVC, cable rojo y negro de 10 cm, imanes, sal y un panel solar de 12V 1.87 watts, para la generación de electricidad.

### ***Determinación de Cloro disponible***

Para evaluar la cantidad de cloro disponible que se genera mediante el prototipo del generador de cloro se utilizó la metodología basados en la norma mexicana NMX-AA-124-SCFI-2006 (Diario Oficial de la Federación, 2006). Primero se estandarizó la solución de tiosulfato de sodio (ver apéndice I) y se calculó la normalidad de la misma; se preparó por separado la solución de almidón (ver apéndice I). Procedimiento: En un matraz yodométrico de 500 mL con tapa se depositó una alícuota de 1-mL con la solución muestra de hipoclorito de sodio y se tapó inmediatamente. Se pesó aproximadamente 2 g de yoduro de potasio (JT-Baker, S.A. de C.V, México) y se adicionó el matraz yodométrico; se agregó agua destilada con pizeta para lavar los cristales de yoduro que quedaran sin disolver. Se adicionaron 3 mL de ácido acético glacial (CTR Scientific, México) y se reposó 5 min al abrigo de la luz, se tituló con tiosulfato de sodio (DEQ, México) hasta llegar a un amarillo paja. Luego se añadieron 3 mL de solución de almidón, la solución se torna color azul y se procede a titular con tiosulfato de sodio hasta que el azul desaparezca por lo menos 30 seg. Los mililitros de tiosulfato utilizados se utilizaron para calcular el cloro disponible en g/L en la siguiente ecuación:

$$\text{g/L cloro disponible} = \frac{V_1 * N * 0.0355 * 1000}{V_0}$$

Donde:

$V_1$  = es el volumen en mL de tiosulfato de sodio empleados en la titulación,

$N$  = Es la normalidad de la solución de tiosulfato de sodio

$V_0$  = Es el volumen en mL de la solución de hipoclorito de sodio.

0.0355 = Son los mili-equivalentes del cloro

### ***Estandarización del prototipo del generador de cloro.***

Con la finalidad de estandarizar el prototipo del generador de cloro se utilizaron:

- 1) 3 diferentes voltajes (9.5, 10.5 y 12) que se generaron mediante un regulador de voltaje (Perfect Choice, USA).
- 2) Dos concentraciones de sal de mesa diferentes (18 g y 36 g) que es el peso estimado de una y dos cucharadas soperas respectivamente.
- 3) Dos

tiempos de desinfección tomando en cuenta las instrucciones del fabricante del cloro comercial (Alen, Santa Catarina, N.L., México) que corresponde a un tiempo de 15 min de contacto y otro de 1 h.

### ***Análisis estadístico de los resultados del generador de cloro.***

Una vez realizada la metodología para determinar el %RBMA, se procedió al análisis de resultados.

En el primer análisis se comparó la diferencia de medias entre los tres voltajes analizados (9.5, 10.5 y 12 V) y la concentración en g/L de cloro generado por el prototipo, mediante un ANOVA con un modelo lineal general y comparación con el método de Tukey con intervalos de confianza del 95%.

En un segundo análisis se comparó la diferencia de medias entre la cantidad de sal utilizada (18 g y 36 g) y la concentración en g/L de cloro generado por el prototipo, mediante una prueba de *t* de Student de 2 muestras.

Para el tercer y último análisis se comparó la diferencia de medias entre el tiempo de desinfección (15 min y 1-h) y las UFC/mL que se midieron después de la desinfección con el cloro generado a diferentes tiempos, mediante una prueba de *t* de Student de 2 muestras.

### ***Diseño del prototipo de membranas de UF***

Ultrafiltración mediante filtro comercial de fibras huecas de 7 orificios de ultrafiltración con un tamaño de poro de 10 a 20 nanómetros (Multibore ®Membrane, BASF, E.U.A.): Este prototipo se diseñó a partir de materiales de PVC comercial, se consiguieron ultrafiltros Multibore ®Membrane que fueron colocados en un tubo de PVC, sellado con un epóxico avalado por la FDA que es una mezcla de la resina epóxica 105 de baja viscosidad y 205 como endurecedor (West system, Nueva Jersey, E.U.A.), para obtener un filtro acoplado a una cubeta, que sirve como contenedor de agua, esta

propuesta generó como innovación el diseño económico de ultrafiltración para la potabilización de agua en zonas rurales de difícil acceso geográfico y social.

#### ***Método de prueba para evaluar la eficiencia en reducción bacteriana.***

Para evaluar la efectividad de reducción bacteriana del cloro generado en el prototipo como modelo de desinfección de agua y del prototipo de membranas de UF, se utilizó la NOM-244-SSA1-2008 que establece los lineamientos para evaluar equipos y sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua, requisitos sanitarios (Diario Oficial de la Federación, 2008).

##### *7.1.16 Preparación de cultivos y sub-cultivos de referencia*

Primero se utilizó un cultivo fresco de la cepa *Escherichia coli* ATCC 35218 para preparar un cultivo de referencia, de donde se tomó una asada, la cual se inoculó por triplicado en tubos en picos de flauta con 20 mL del agar nutritivo B (ver apéndice II) y se incubaron (MRC, modelo RKC CB700, USA) de 20 a 24 horas de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . A partir del cultivo de referencia se preparó un sub-cultivo de referencia tomando una asada y sembrando en tubos con picos de flauta con 20 mL del agar nutritivo A (ver apéndice II), se incubó de igual manera de 20 a 24 h a una temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Posteriormente, se preparó una suspensión de *Escherichia coli* utilizando el sub-cultivo de referencia ya desarrollado, se adicionaron 5 mL de solución salina al 0.85% estéril y se agitó suavemente en forma manual, rotando verticalmente el tubo entre las manos. Esta suspensión bacteriana se transfirió a un tubo estéril para determinar la concentración de organismos mesófilos aerobios para verificar que dicha concentración se encuentre entre 5,000 a 10,000 UFC/mL, esto se midió mediante el nefelómetro de MacFarland (Ver apéndice 12.8).

##### *7.1.17 Preparación del agua de prueba*

El agua de prueba se preparó con 1-L de agua en frascos PET con tapa, del sistema de abastecimiento público, ajustada o que cumpla con los límites de la NOM-127-SSA1-1994, libre de bactericidas y bacteriostáticos (Diario Oficial de la

Federación, 1994b). También se neutralizó el cloro residual agregando 1-mL de tiosulfato de sodio (DEQ, México) al 3%. Finalmente se esterilizó con luz ultravioleta por una hora. Una vez preparada el agua de prueba se le agregó la suspensión de *Escherichia coli* preparada previamente.

#### 7.1.18 Evaluación de la reducción bacteriana

Finalmente se midió la concentración de organismos mesófilos aerobios en UFC/mL de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994 (Diario Oficial de la Federación, 1994a) en agua de prueba sin tratar por triplicado.

Para el desarrollo de la prueba de sustancias germicidas se agregó la sustancia germicida (cloro generado del prototipo) a los frascos de agua de prueba, de acuerdo con las instrucciones del fabricante del cloro comercial que describe colocar 10 gotas de cloro comercial con una concentración al 30% por 15 min. Después de transcurrido el tiempo de contacto especificado de la etiqueta, se tomaron 3 muestras de agua tratada y se determinó la concentración de mesófilos aerobios en UFC/mL. Con los resultados de la cuenta de organismos mesófilos aerobios (media aritmética), se calcularon los porcentajes en la reducción bacteriana de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ RBMA} = \frac{(\text{organismos mesófilos aerobios})_{\text{APST}} - (\text{organismos mesófilos aerobios})_{\text{APT}}}{(\text{organismos mesófilos aerobios})_{\text{APST}}} \times 100$$

Dónde:

- % RBMA.- Porcentaje en reducción bacteriana de organismos mesófilos aerobios.
- APST.- Cuenta de organismos mesófilos aerobios en UFC/mL de agua de prueba sin tratar.
- APT.- Cuenta de organismos mesófilos aerobios en UFC/mL de agua de prueba tratada.

Una prueba de potabilidad aceptable es cuando el %RBMA es igual o mayor a 95% para organismos mesófilos aerobios.

#### ***Determinación de mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994)***

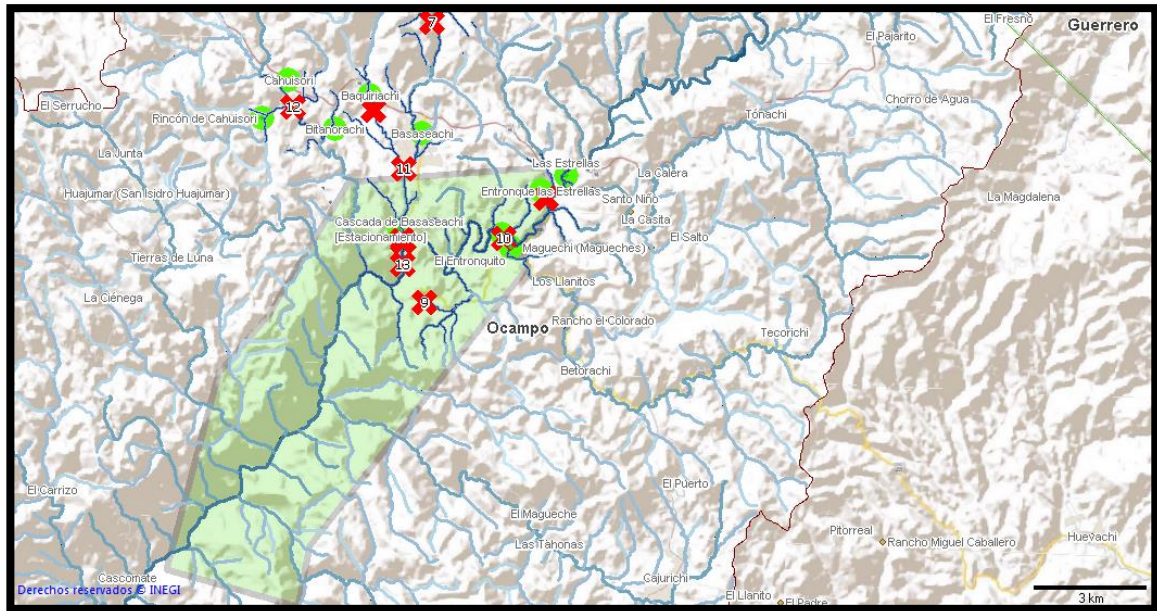
La determinación de mesófilos aerobios se realiza bajo los estatutos de la NOM-092-SSA1-1994 (Diario Oficial de la Federación, 1994a). La selección de diluciones a

preparar dependió del número esperado de microorganismos por muestra, en números bajos inocular 1-mL de muestra directa y una dilución  $1 \times 10^1$ . En ausencia total de información, se preparan diluciones seriadas en buffer de fosfatos solución de trabajo (ver apéndice I) hasta  $1 \times 10^6$  evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Se agitó la muestra de agua manualmente con 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 seg. Se inocularon 1-mL de la muestra directa y 1-mL por cada dilución realizada, se utilizó una pipeta diferente en cada inóculo. Se preparó el agar cuenta estándar (BD Bioxon, Estado de México, México) según las instrucciones del fabricante y una vez tibio se vació en las cajas Petri inoculadas, agitando la caja cuidadosamente en 4 movimientos verticales, 4 horizontales y ocho movimientos en forma de 8; se dejó enfriar hasta gelificar y se incubaron (Felisa, FE-132, Jalisco, México) 24 h hasta la primer lectura y 48 h para una lectura de verificación de resultados. Para la interpretación de resultados se leyó la dilución con menor número de colonias contables y se multiplicó por la dilución de dicha cuenta para obtener la cantidad de mesófilos aerobios en UFC/mL. Para las cajas que presentaron conteos incontables en las diluciones más pequeñas, en cuenta colonias (RELASA, modelo 6025, México) se cuenta un solo cuadro y se multiplicó por 57 cuadros que le caben a la caja Petri y luego por la dilución correspondiente.

## RESULTADOS

### *Análisis hidro-geográfico de la zona de estudio.*

El PNCB se encuentra localizado en la parte de Sierra Madre Occidental, dentro de la barranca de Candameña (28°07'59"N, 108°15'00"O). En la Figura 10 se muestra, el polígono del área con una extensión de tierra de 5,803 hectáreas.



**Figura 10.** Mapa del polígono del PNCB. Las (X) corresponden a los puntos de muestreo, los círculos a las poblaciones rurales con mayor número de habitantes (●). Fuente: INEGI mapa digital, Paquete Cartográfico 2010; Escala 1:110029

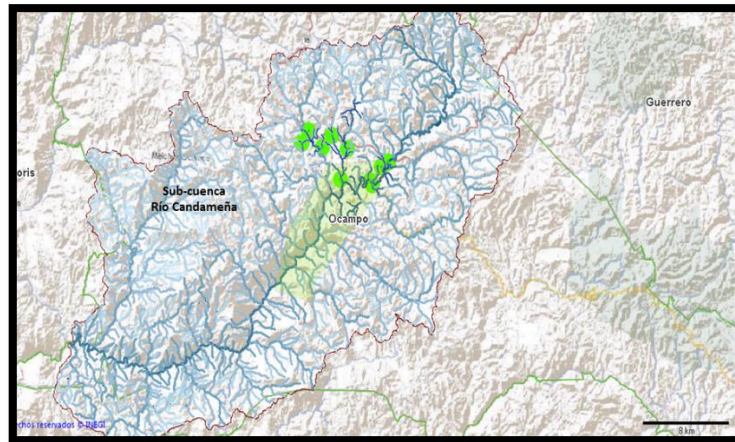
El PNCB se encuentra dentro del municipio de Ocampo en el suroeste del Estado de Chihuahua. En relación a las cuencas hidrológicas, el PNCB se encuentra dentro de la cuenca del Río Mayo, la cual abarca 72 municipios de Sonora y 7 municipios de Chihuahua entre ellos el municipio de Ocampo. La cuenca del Río Mayo comprende 27,541 km<sup>2</sup> de extensión territorial y se nutre de varios afluentes (Figura 11), comienza por el Río Basaseachi, el Río Concheño-Moris, el San José Ocampo y el arroyo Hondo, que recibe el caudal del Río Babanori y procede a su vez de la Sierra Oscura, en Rosario Tezopaco y ya en Sonora. Recibe posteriormente las aguas de los arroyos El Limón, Guajaray, el de los Mezcales, Gochico y Taymuco, antes de llegar hacia la presa Adolfo Ruíz Cortínez (Mocúzarit), para continuar recibiendo corrientes de los arroyos El

Salado, Jijiri y Yorentamehua, entre otros. La cuenca Río Mayo nace al norte de Chihuahua (Río Basaseachi y desemboca al sur de Sonora en el Océano Pacífico (Martin, 1998).



**Figura 11.** Cuenca hidrológica Río Mayo. Fuente: (Martin, 1998)

El polígono del PNCB se localiza en la subcuenca del Río Candameña llamada así por el principal río de la sub-cuenca; este río se origina al unirse el Río Basaseachi y El Durazno (INEGI, 2010). En la Figura 12, se observa delimitada la sub-cuenca Río Candameña, así como también se observa resaltada la posición del polígono del PNCB y los círculos son las poblaciones con mayor número de habitantes que se encuentran habitando el parque y zonas aledañas.

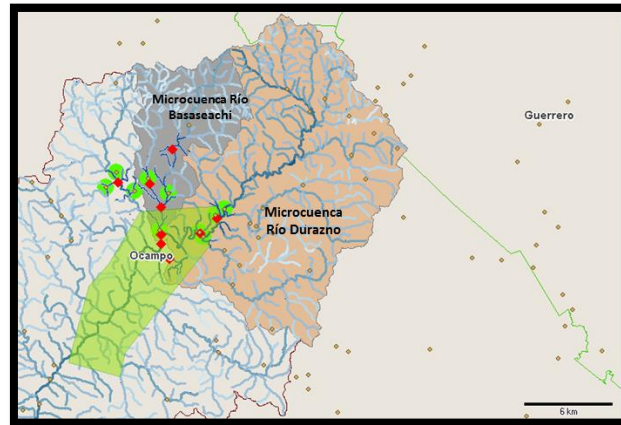


**Figura 12.** Subcuenca hidrológica Río Candameña. Los (●) en color verde corresponde a las poblaciones rurales con mayor número de habitantes. Fuente: INEGI mapa digital, Paquete Cartográfico 2010; Escala 1:244883

Dentro de la sub-cuenca río Candameña existen dos microcuencas principales que van a ser los principales ríos y arroyos que alimentan el caudal de la Cascada de Basaseachi. En la Figura 13, se observa delimitadas ambas microcuencas nombradas

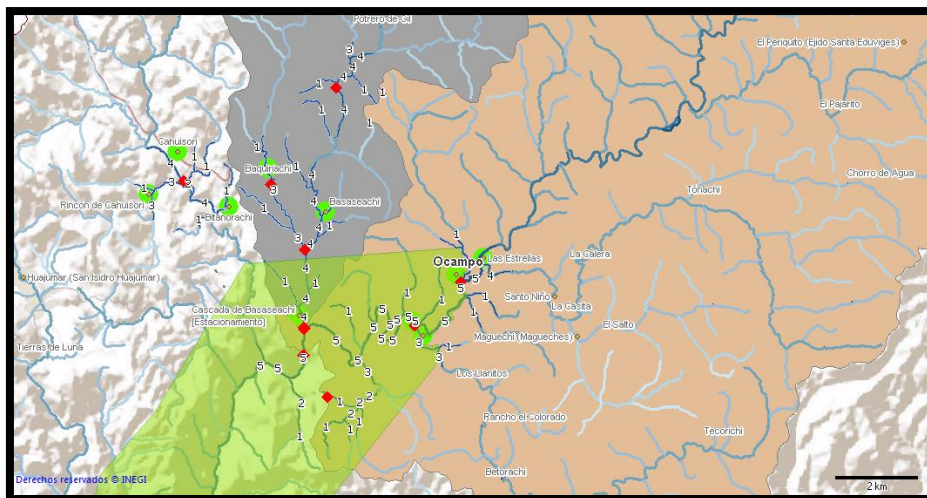


respectivamente por el río principal o de mayor orden que se forma en la microcuenca. Ambas microcuencas tienen un punto de desagüe en común que es la Cascada de Basaseachi.



**Figura 13.** Microcuencas hidrológicas: Izquierda microcuenca Río Basaseachi. Derecha microcuenca Río Durazno. Los puntos (●) rojos de menor tamaño corresponden a los puntos de muestreo, los círculos (●) verdes de mayor tamaño corresponden a las poblaciones rurales con mayor número de habitantes. El polígono de color verde delimitado es el PNCB. Fuente: INEGI mapa digital, Paquete Cartográfico 2010; Escala 1:195866

Los caudales se describieron en base a la clasificación de Strahler (1957), la cual indica la forma de medir numéricamente la complejidad de la ramificación de los ríos y arroyos, también conocido como el número de Strahler, (Horton, 1945). En este sentido, estos números se refieren como orden del curso de agua y se utilizan para definir el tamaño de un curso de agua, basados en la jerarquía de los afluentes. Los ríos se clasifican de acuerdo con su orden de jerarquía, que se define: ríos de primer orden: son todos aquellos que no tienen afluentes; los de segundo orden: se forman al unirse dos de primer orden; los de tercer orden: se forman al unirse dos de segundo orden y así sucesivamente (Strahler, 1957). En la Figura 14, se muestra el orden de los ríos y arroyos según clasificación de Strahler de los ríos y arroyos que fueron muestreados, donde se observa que el río Durazno junto con el río Candameña, tienen un orden de 5 mayor que el orden 4 que presenta el río Basaseachi.



**Figura 14.** Clasificación de orden de ríos y arroyos del PNCB. Los rombos (◆) de color rojo corresponden a los puntos de muestreo, en círculo (●) verde corresponden a las principales localidades rurales cercanas al parque o dentro del parque. La enumeración del 1 al 5 corresponde al orden del río seleccionado según la clasificación de Strahler. Fuente: INEGI mapa digital, Paquete Cartográfico 2010; Escala 1:80223

En relación a la Microcuenca Río Durazno que tiene un total de 940 hab., las Estrellas y entronque las Estrellas son los poblados con la mayor cantidad de habitantes. En la tabla 11, se describe un análisis del total de viviendas, viviendas habitadas, con drenaje y sin drenaje y el porcentaje de viviendas sin drenaje. En el área de estudio se observó que en la localidad de Basaseachi con más habitantes el 42.22% no cuenta con sistema de drenaje, lo que indica que tal vez se utilicen fosas sépticas para el tratamiento de los desechos sanitarios, además de que el drenaje de estas poblaciones se dirige hacia la laguna de oxidación, la cual se observó que no está en funcionamiento, esto podría contribuir también a la contaminación de los afluentes.

**Tabla 11.** Análisis poblacional de las principales localidades rurales que afectan al PNCB.

Comunidad	Habitantes	Viviendas totales	Viviendas Habitadas	Viviendas con drenaje	Viviendas sin drenaje	Porcentaje de viviendas sin drenaje
Basaseachi	1,248	423	315	174	133	42.22%
Baquiriachi	208	168	53	38	13	24.52%
Las Estrellas	183	66	46	20	22	47.82
Entronque las Estrellas	71	24	18	14	6	33.33%

#### *Toma de muestras.*

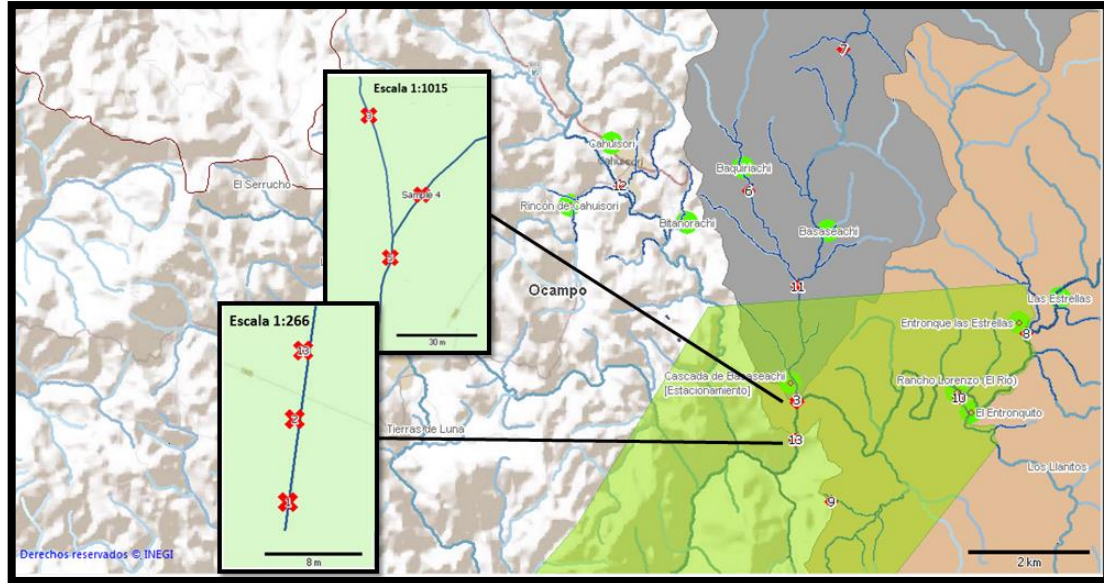
El muestreo de agua del PNCB se realizó en 13 puntos estratégicos de los afluentes de los dos ríos principales que abastecen a la Cascada de Basaseachi. En la

tabla 12 se enumeran los sitios de muestreo con la ubicación geográfica. Según la localización geográfica las muestras 6, 7, 8, 11 y 12 se encuentran fuera del polígono del PNCB, sin embargo, las muestras fueron colectadas debido a que las comunidades que se encuentran cercanas a estas muestras corresponden a las que se observa más población y que podría afectar los cuerpos acuíferos (Figura 15).

**Tabla 12.** Geo-referenciación e identificación de los puntos de muestreo.

<b>Lugar de los muestreos</b>		<b>Coordenadas geográficas</b>	
<b>Número</b>	<b>Muestra</b>	<b>NORTE (N)</b>	<b>OESTE (W)</b>
<b>1</b>	Pozo Cascada de Basaseachi	28°10'26.95"N	108°12'44.99"W
<b>2</b>	Cascada del Plan	28°10'27.17"N	108°12'44.88"W
<b>3</b>	Río El Durazno	28°10'48.24"N	108°12'45.09"W
<b>4</b>	Río Basaseachi	28°10'49.19"N	108°12'45.86"W
<b>5</b>	Y. Punto de unión del Río Basaseachi y Rio el Durazno.	28°10'47.45"N	108°12'45.49"W
<b>6</b>	Arroyo de Baquiriachi	28°12'40.80"N	108°13'20.49"W
<b>7</b>	Aguaje de Basaseachi	28°13'59.55"N	108°12'26.07"W
<b>8</b>	Arroyo de Las Estrellas	28°11'30.06"N	108°10'27.09"W
<b>9</b>	Centro de visitantes CONANP	28°09'54.70"N	108°12'21.70"W
<b>10</b>	Arroyo de Betorachi	28°10'54.08"N	108°11'6.84"W
<b>11</b>	Arroyo de la laguna de oxidación	28°11'50.25"N	108°12'47.88"W
<b>12</b>	Arroyo de Cahuisori	28°12'40.58"N	108°14'38.92"W
<b>13</b>	Mirador de la Cascada de Basaseachi	28°10'27.36"N	108°12'44.97"W

Se realizó un muestreo de agua en las estaciones del año 2013: primavera (Marzo), verano (Junio), otoño (Octubre) e invierno (Diciembre). Se obtuvo un total de 49 muestras ya que la muestra número 13 no se tomó durante el muestreo de primavera debido a condiciones poco seguras para los analistas; además las muestras 5 y 6, fueron tomadas de arroyos intermitentes y durante la época de verano dichos arroyos estaban secos debido a las altas temperaturas que se presentaron durante el año 2013, considerándose época de sequía.

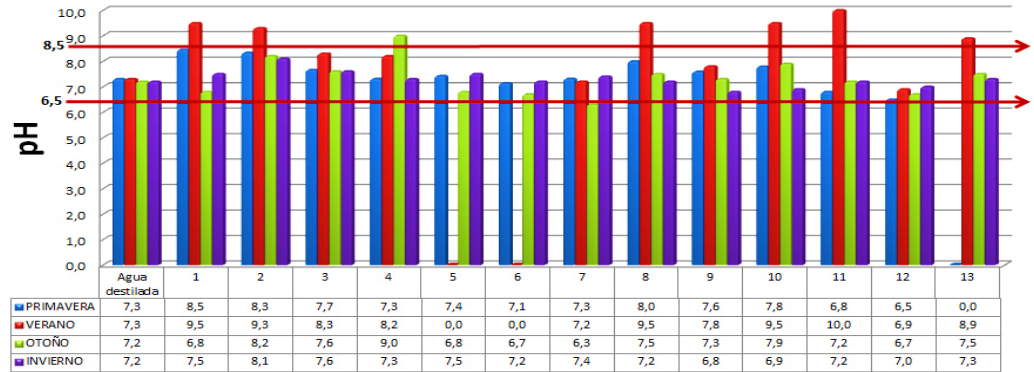


**Figura 15.** Mapa de los puntos de muestreo. Las (X) corresponden a los puntos de muestro con su número de muestra correspondiente. Los círculos (●) indican las poblaciones rurales con mayor cantidad de habitantes que se encuentran cerca del PNCB. Fuente: INEGI mapa digital, Paquete Cartográfico 2010; Escala 1:64176

## *Análisis de calidad de agua*

### *8.1.1 Análisis de pH y conductividad*

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 (Diario Oficial de la Federación, 1994b), que se rige dentro las normas de salud ambiental, agua para uso y consumo humano: límites permisibles de calidad y tratamientos que debe someterse el agua para su potabilización, el pH adecuado de las muestras de agua no debe exceder por debajo de 6.5, ni por encima de 8.5. En la Figura 16, se observa que las muestras de primavera no exceden estos parámetros. Sin embargo, en el muestreo de verano las muestras 1, 2, 8, 10, 11 y 13 se exceden de los parámetros notablemente, cabe mencionar que debido a la fuerte sequía que enfrentó el Parque el año 2013, concentrándose las sales disueltas y aumentando considerablemente el pH. En tanto las muestras de otoño e invierno, permanecieron dentro de los límites permisibles. La muestra 5 y 6 no aparecen en la Figura 16, debido a pertenecen a los ríos de la “Y”, que es el lugar donde convergen el Río Basaseachi y el Río Durazno y el Río Baquiriachi que se secaron durante la época de sequía durante el verano, siendo la muestra 5 la principal fuente de abastecimiento de agua en la Cascada.



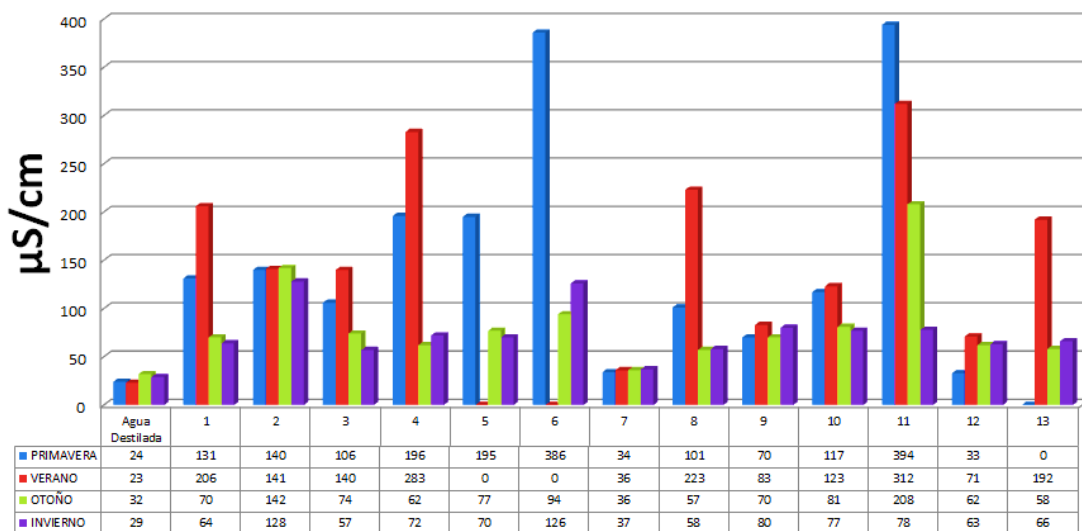
**Figura 16.** Medición del pH de las muestras de agua por estaciones es del año 2013. Barras de color azul corresponden a primavera. Barras rojas a verano. Barras verdes a otoño. Barras moradas a invierno. Las flechas rojas entre 6.5 a 8.5 corresponden a los límites permisibles menor y mayor respectivamente.

La conductividad se encuentra directamente asociada a la cantidad de iones disueltos en agua y no debe exceder de 1,200 microsiemens por centímetro ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) según las normas mexicanas. En este caso ninguna de las muestras mostró mayor cantidad de iones disueltos que lo que marca la norma.

En la Figura 17 se observan las 13 muestras, durante las estaciones del año 2013; se observó que durante la primavera y el verano se obtuvieron los valores más altos de conductividad, todo lo contrario durante el otoño y el invierno, a excepción de la muestra 11 que mantuvo una conductividad alta durante el otoño; cabe señalar que todas las muestras se encuentran bajo un rango adecuado de concentración de sales.

### 8.1.1 Análisis fisicoquímico. Muestreo de Primavera

La calidad de agua se describe en la tabla 13, se muestran los resultados del análisis fisicoquímico del agua de las primeras 12 muestras durante la primavera (Marzo, 2013), debido a que en el momento del muestro no había acceso seguro para la toma de la muestra 13 que se tomó en un segundo muestreo. En la tabla 13 se muestra que la calidad del agua en la mayoría de las muestras es buena, considerando los valores permitidos bajo normas oficiales.



**Figura 17.** Medición de la Conductividad en muestras de agua del PNCB 2013. Barras de color azul corresponden a primavera. Barras rojas a verano. Barras verdes a otoño. Barras moradas a invierno.

Sin embargo, las muestras 3 y 11 mostraron un valor de alcalinidad más elevado que el límite permisible, estas muestras provienen del río Durazno y arroyo de la laguna de oxidación. La causa probable de estos resultados podría ser que la laguna de oxidación sin mantenimiento filtre desechos hacia el río elevando la acidez del agua y el Río Durazno es el río que recibe más contaminantes debido a su caudal mayor.

**Tabla 13.** Análisis Físico-Químico de las muestras de agua obtenidas en Primavera.

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Límites permisibles
Cloruros	7.12	1.42	2.85	172	13.30	28.02	1.9	2.85	1.9	3.8	23.27	1.9	-	≤ 250 mg/L
Dureza Total (mg de CaCO <sub>3</sub> )	8.77	3.73	38	53	6.09	12.56	2.25	2.90	2.20	3.51	8.70	3.93	-	500 mg/L
Alcalinidad	21.84	25.81	374	80.40	19.85	150.88	56.58	45.66	45.66	61.54	48.64	93.30	-	300 mg/L
Acidez (mg de CaCO <sub>3</sub> )	34	26	24	30	28	94	28	40	28	60	152	28	-	≤ 70 mg/L

De las muestras analizadas durante el muestreo de primavera, se seleccionó una muestra representativa para realizar un análisis de metales pesados y para ello las muestras 1, 2, 5, 7 y 9 fueron enviadas al laboratorio de análisis fisicoquímicos de agua en la Universidad del Paso, Texas (UTEP, por sus siglas en inglés). En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos, encontrando todas las muestras analizadas según la Norma dentro de los estándares de calidad de agua.



**Tabla 14.** Análisis Físico-químico de las muestras representativas de primavera

Parámetro	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 5	Muestra 7	Muestra 9	Límites permisibles
pH	7.40	8.39	7.54	7.05	7.28	6.5-8.5
Conductividad $\mu\text{S/cm}$	160	155	120	36.1	75	1,200
Alcalinidad (mg/L de $\text{CaCO}_3$ )	72	61	63	23	450	300 mg/L ( $\text{CaCO}_3$ )

En la tabla 15, se encuentra el análisis de la composición iónica realizado con el espectrofotómetro de plasma. Se observa que los iones calcio, magnesio, potasio, además del bicarbonato y el carbonato no se encuentran sus límites permisibles, esto es debido a que ayudan a calcular la cantidad de sólidos disueltos totales, además de la dureza total como  $\text{CaCO}_3$ .

**Tabla 15.** Análisis de la composición iónica de las muestras representativas de Primavera

Composición Iónica (mg/L)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 5	Muestra 7	Muestra 9	Límites permisibles
Calcio (Ca)	11.7	12.2	9.0	2.3	6.8	-
Magnesio (Mg)	1.70	0.13	1.54	0.34	0.50	-
Potasio (K)	5.4	0.76	3.4	1.5	1.72	-
Sodio (Na)	16.3	20.3	12.0	6	21.0	200 mg/L
Bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ )	80.30	73.00	71.49	22.75	48.58	-
Carbonato ( $\text{CO}_3$ )	<1	<1	<1	<1	<1	-
Cloro ( $\text{Cl}^-$ )	6.30	<1	2.00	<1	<1	250 mg/L
Flúor (F)	<1	<1	<1	<1	<1	1.50 mg/L
Nitrato ( $\text{NO}_3$ )	<1	<1	<1	<1	<1	10 mg/L
Sulfato ( $\text{SO}_4$ )	3.45	1.29	2.15	<1	1.05	400 mg/L
Dureza Total como $\text{CaCO}_3$	36.2	31.0	28.8	7.1	19.0	500 mg/L

Sin embargo; al intentar calcular la dureza total, los valores del Magnesio tan bajos nos lo impidieron ya que son cercanos a cero, y la norma dice que la dureza total como Carbonato de Calcio debe ser menor a los 500 mg/L. En el caso de sólidos disueltos totales la norma marca que no excedan de 1,000 mg/L, para las muestras analizadas, la suma de todos los analitos no excedieron los 1,000 mg/L, por lo que todas las muestras analizadas se encuentran bajo la norma.

En la tabla 16 se muestra la concentración de metales pesados, los límites permisibles establecidos en la tabla se tomaron de Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 (Diario Oficial de la Federación, 1994b), Proyecto de norma oficial

mexicana PROY-NOM-SSA1-250-2014 (Diario Oficial de la Federación, 2014) y Modificación a la norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 (Diario Oficial de la Federación, 1994b). Se observó que para litio, estroncio y vanadio, no hay límites permisibles, debido a que de acuerdo a la norma no son metales que entren dentro del análisis de la calidad del agua, sin embargo, es importante su estudio y se observó que son bajas las concentraciones de los 3 metales pesados analizados.

**Tabla 16.** Composición Elemental de las muestras representativas de Primavera.

Elemento (µg/L)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 5	Muestra 7	Muestra 9	Límite permisible
Arsénico (As)	<10	<10	<10	<10	<10	10 µg/L
Bario (Ba)	172	<10	131	<10	12.20	700 µg/L
Berilio (Be)	<5	<5	<5	<5	<5	300 µg/L
Cadmio (Cd)	<5	<5	<5	<5	<5	3 µg/L
Cromo (Cr)	<5	<5	<5	<5	<5	50 µg/L
Cobre (Cu)	<5	<5	<5	<5	<5	2,000 µg/L
Fierro (Fe)	17.01	33.45	15.56	122.50	243.36	300 µg/L
Mercurio (Hg)	<10	<10	<10	<10	<10	1 µg/L
Litio (Li)	7.52	25.90	6.25	<5	<5	-
Manganeso (Mn)	<10	<10	<10	<10	<10	150 µg/L
Niquel (Ni)	<5	<5	<5	<5	<5	20 µg/L
Plomo (Pb)	<5	<5	<5	<5	<5	10 µg/L
Selenio (Se)	19.62	19.40	19.28	19.23	19.15	10 µg/L
Estaño (Sn)	<5	<5	<5	<5	<5	20 µg/L
Estroncio (Sr)	78.84	25.66	60.27	<25	37.46	-
Uranio (U)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	30 µg/L
Vanadio (V)	<5	<5	<5	<5	<5	-
Zinc (Zn)	10.11	10.52	13.11	10.28	19.81	5,000 µg/L

En la tabla 16, se observa claramente, que ningún metal pesado analizado excede las normas mexicanas de calidad, lo que parece indicar que la calidad del agua es apta para uso y consumo en cuestión de metales pesados. Estos resultados nos permitieron justificar prescindir de este tipo de análisis en futuros muestreos debido al costo elevado de los mismos.

### 8.1.2 Análisis fisicoquímico. Muestreo de Verano

En la tabla 17, se muestran los resultados del análisis físico-químico del muestreo correspondiente al verano (Junio, 2013), en donde se analizó la calidad de agua en cuanto a cloruros, dureza total, alcalinidad y acidez. En este muestreo la alcalinidad se observó afectada en 3 de las 13 muestras colectadas probablemente por las altas temperaturas que se presentaron durante el 2013 en el PNCB. Cabe mencionar que



debido a estas altas temperaturas esta época se consideró temporada de sequía para el año 2013.

Tabla 17. Análisis Físico-Químico de las muestras de agua obtenidas en Verano

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Límites permisibles
Cloruros	9.6424	1.929	1.929	50.1	-	-	1.93	1.93	1.93	52.07	1.93	11.57	9.642	≤ 250 mg/L
Dureza Total (mg de CaCO <sub>3</sub> )	212.18	95.82	198.49	232.71	-	-	61.6	47.91	88.97	88.97	225.8	68.34	136.8	500 mg/L
Alcalinidad	192	224	432	348	-	-	52	176	152	224	316	100	228	300 mg/L
Acidez (mg de CaCO <sub>3</sub> )	4	24	20	28	-	-	20	4	28	4	20	4	20	70 mg/L

Durante el verano la alcalinidad aumenta debido al mayor contenido de ácidos húmicos que son componentes naturales de los ríos con una cuenca formada por terrenos ácidos (Fraga, 1976).

### 8.1.3 Análisis fisicoquímico. Muestreo de Otoño

El tercer muestreo del año 2013 se realizó durante el otoño (Octubre, 2013), para ésta época del año, las condiciones físico-químicas del agua se mantuvieron dentro de los parámetros normales debido a las abundantes lluvias (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis Físico-Químico de las muestras de agua obtenidas en Otoño.

Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Límites permisibles
Cloruros	5.9	5.9	6.9	7.9	6.9	8.9	4.9	5.9	4.9	5.9	6.9	7.9	8.9	≤ 250 mg/L
Dureza Total (mg de CaCO <sub>3</sub> )	25.257	11.2	16.92	11.7	132	18.75	8.85	15.4	15.6	10.68	12.76	11.98	9.113	500 mg/L
Alcalinidad	40	86	48	42	46	38	40	38	52	66	54	52	60	300 mg/L
Acidez (mg de CaCO <sub>3</sub> )	12	12	16	6	22	14	4	26	18	18	12	14	14	70 mg/L

### 8.1.4 Análisis fisicoquímico. Muestreo de Invierno

En un último muestreo correspondiente a invierno (Diciembre, 2013), se observó que los parámetros físico-químicos analizados se encontraban normales, las bajas temperaturas que se presentan en estas fechas parecen ayudar a preservar la calidad del agua en base a parámetros fisicoquímicos (Tabla 19).

**Tabla 19.** Análisis Físico-Químico de las muestras de agua obtenidas en Invierno.

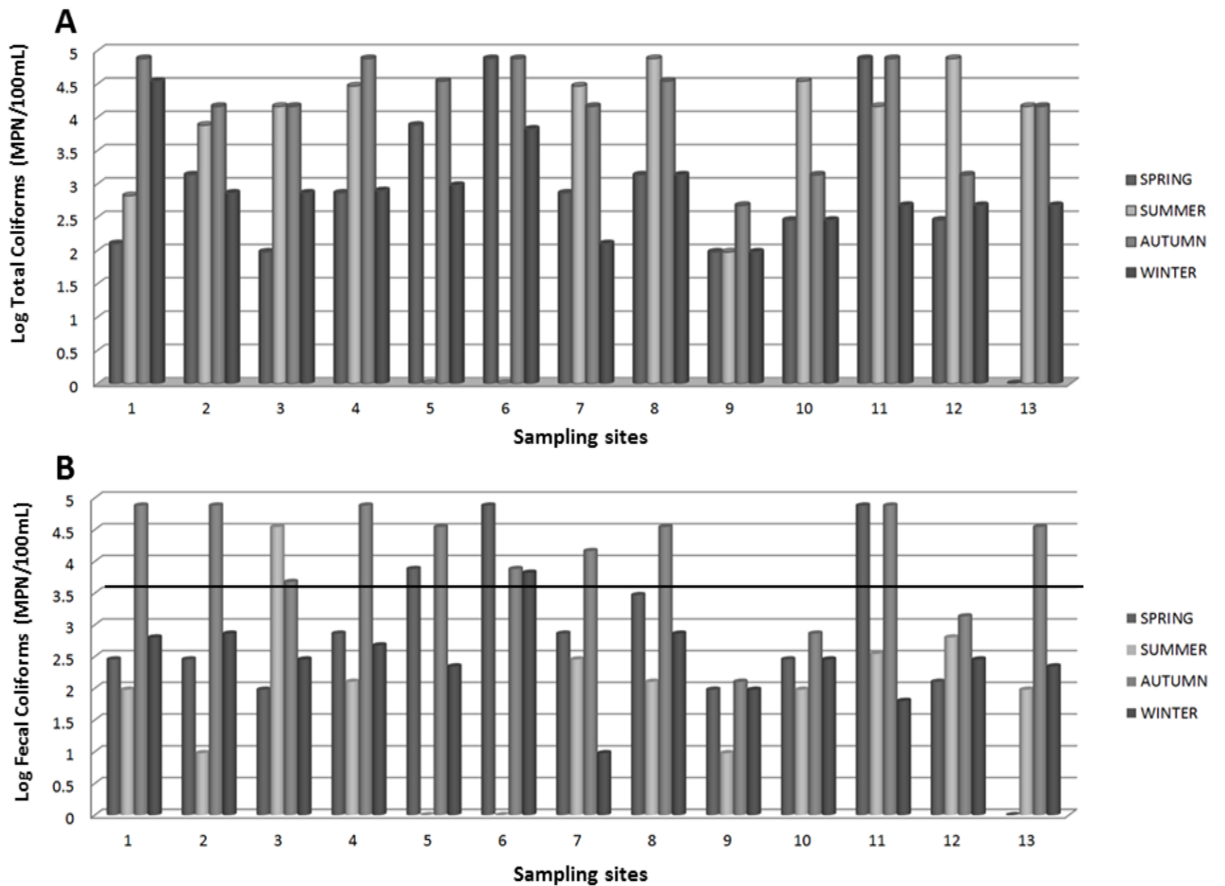
Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Limites permisibles
Cloruros	5.7075	4.07	4.89	8.15	5.7	6.5	5.7	6.5	3.26	6.52	6.52	4.89	8.15	$\leq$ 250 mg/L
Dureza Total (mg de CaCO <sub>3</sub> )	14.32	7.29	17.44	11.97	12.49	18.22	19.0	7.03	8.85	11.45	16.66	10.9	10.6	500 mg/L
Alcalinidad	24	98	42	44	48	56	38	44	74	56	86	56	54	300 mg/L
Acidez (mg de CaCO <sub>3</sub> )	12	14	12	10	18	12	6	24	14	14	20	18	18	70 mg/L

### 8.1.5 *Conteo de coliformes fecales y coliformes totales en agua*

En la Figura 18, se muestran los resultados obtenidos de coliformes totales (Figura 18A) y coliformes fecales (Figura 18B). Estos resultados se expresan en NMP/100 mL y para su análisis fueron convertidos a logaritmo base 10, con el fin de normalizar los datos. En la Figura 18 se observa que las muestras 5 y 6 de la época de verano y la 13 de la época de primavera no obtuvieron valores de coliformes totales o fecales, esto es porque las muestras no fueron tomadas por que los arroyos no llevaban agua durante la época de verano y la muestra 13 durante la primavera no podía ser tomada debido a la falta de condiciones seguras para la toma de muestras.

En la Figura 18A se observa que durante la temporada de verano (época seca) y la de otoño (época de lluvias) la cantidad de coliformes totales aumentó considerablemente en la mayoría de las muestras analizadas; mientras que durante la época de primavera y de invierno, debido a las bajas temperaturas que se presentan en la zona de estudio disminuyeron considerablemente. En la Figura 18B se observa una línea resaltada que indica el límite máximo permisible de coliformes fecales (1,000 NMP/100mL o 3.5 NMP/100mL en escala logarítmica) que se permite en aguas naturales nacionales que se conoce que reciben desechos sanitarios (NOM-001-ECOL-1996) (Diario Oficial de la Federación, 1997). En esta Figura 18B se observa que la mayoría de las muestras excedieron los límites permisibles durante el otoño o época de lluvias a excepción de las muestras 9, 10 y 12 que corresponden al centro de visitantes del PNCB, el arroyo de Betorachi y Cahuisori. En las Figuras 18 se observa que la cantidad de coliformes fecales y totales durante la primavera y el invierno disminuyeron considerablemente, esto pudo haber sido por las bajas temperaturas que se presentan en estas épocas del año. Estos resultados podrían indicar que el movimiento que ocurre durante las épocas de lluvia hace que el agua arrastre los contaminantes, y las altas

temperaturas durante la época seca durante el verano aumenten considerablemente las poblaciones de microorganismos presentes.

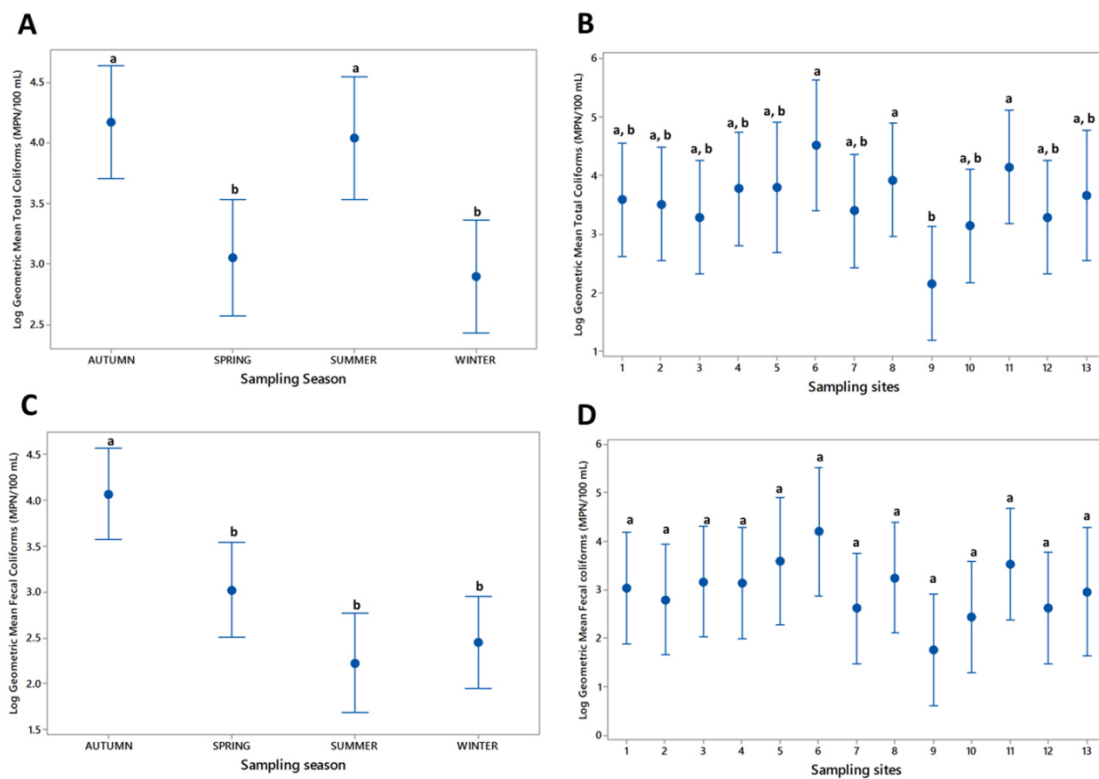


**Figura 18.** Resultados de la distribución espacio-temporal del conteo de coliformes expresados en NMP/100 mL en las muestras de agua analizadas. A) Coliformes totales. B) Coliformes fecales. De izquierda a derecha cada muestra fue analizada por época del año 2013 donde la primera barra indica la primavera, la segunda el verano, la tercera el otoño y la cuarta el invierno. En Figura 18B se observa una línea resaltada que indica el límite máximo permisible de coliformes fecales que puede presentar un río que recibe descargas de aguas residuales (NOM-001-ECOL-1996).

#### 8.1.6 Análisis estadístico de coliformes fecales y totales en agua.

Los resultados del número más probable se convirtieron a logaritmo base 10 con el fin de normalizar los datos. El conjunto de las medias geométricas fue usado para calcular los intervalos de confianza de 95% (Figura 19). El conteo de coliformes totales se muestra en las Figuras 19A y 19B. Los resultados de la ANOVA mostraron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) entre el conteo de coliformes totales que se presentó el valor más elevado durante el otoño y el verano; mientras que el conteo disminuyó durante el invierno y la primavera donde se presentaron los valores menores; la prueba

de ANOVA también mostró diferencias significativas entre los puntos de muestreo para coliformes totales. Como se mencionó anteriormente en el conteo de coliformes totales se observó afectado por las lluvias presentadas durante el otoño y las altas temperaturas durante el verano; mientras que las bajas temperaturas y las heladas afectaron el conteo de coliformes totales durante el invierno y la primavera. Los resultados de la prueba de Tukey revelaron que las muestras 6, 8 y 11 tuvieron el mayor conteo de coliformes y la muestra 9 el más bajo (Figura 19B). Esto pudo haber ocurrido debido a las muestras 6, 8 que corresponden al arroyo de Baquiriachi y entronque las Estrellas, las cuales son las muestras donde había más cantidad de habitantes, además de tener sus casas cercanas al río; y la muestra 11 es el río que se encuentra cerca de la laguna de oxidación. Por otra parte la muestra número 9 mostró los niveles más bajos ya que se trata de la muestra que se encuentra dentro del centro de visitantes.



**Figura 19.** Análisis estadístico de coliformes fecales y totales. En las medias geométricas calculadas se consideraron todos los sitios y todas las estaciones en escala logarítmica con un intervalo de confianza de 95%. A) Conteo de coliformes totales por estaciones (2013). B) Conteo de coliformes totales por sitio de muestreo. C) Coliformes fecales por estaciones (2013). D) Coliformes fecales por sitio de muestreo.

Las medias geométricas para el conteo de coliformes fecales varió significativamente durante las estaciones del año ( $p < 0.001$ ), donde la mayoría de las muestras colectadas excedieron los límites permitidos durante el otoño en comparación del resto del año 2013 (Figura 19C). La prueba de Tukey mostró que no hay diferencias significativas entre los puntos de muestreo para el conteo de coliformes fecales. ( $p = 0.133$ ; Figura 19D).

Se considera que la época del año con mayores contaminantes es durante la época de lluvia, en este caso el otoño, esto permite el arrastre de contaminantes a través de los efluentes del PNCB.

#### 8.1.7 Caracterización Microbiológica

Para la caracterización microbiológica se tomaron como criterios de análisis de muestras, solo aquellas muestras que excedieran los límites permisibles de 1,000 NMP/100mL. De un total de 49 muestras colectadas se analizaron 23. De estas 23 muestras analizadas se aislaron 51 cepas, las cuales a través de la caracterización microscópica y macroscópica se descartaron 18 por sus características similares a las demás, colectando un total de 33 cepas identificadas por su morfología macroscópica, microscópica, tinción de Gram y caracterización bioquímica mediante el AutoScan4.

Se aislaron 16 géneros y especies de aguas naturales del PNCB. En la primera columna de la tabla 20 se describe la familia a la que pertenecen cada aislamiento, en la segunda columna el nombre del género y especie encontrado, en la tercer columna el número de aislamientos de cada género y especie, en la cuarta columna el sitio de muestreo donde fueron encontrados y en la quinta columna la estación del año donde fue observado dicho aislamiento.

Algunos de las cepas aisladas en las aguas del PNCB ya han sido identificados como microorganismos patógenos que pueden generar brotes epidémicos en países en desarrollo (Hassan *et al.*, 2014), esto podría ser la posible causa de los problemas de diarrea entre los habitantes principalmente niños en el PNCB.

**Tabla 20.** Géneros y especies bacterianos identificados en muestras de agua por estación del año.

Familia	Géneros y especies	Aislamientos	Lugar de muestreo	Estación del año 2013
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	3	Otoño
	<i>Citrobacter freundii</i>	2	2,5	Verano-Invierno
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1,3,6	Otoño-Invierno
	<i>Escherichia coli</i>	7	1,6,11,13	Primavera-Verano-Otoño-Invierno
	<i>Hafnia alvei</i>	3	1,2,3	Verano-Otoño
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	1,8,10,11	Primavera-Verano
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	11	Verano
	<i>Salmonella</i> spp.	1	5	Otoño
	<i>Salmonella</i> entérica subsp. enterica, serovar Paratyphi A	2	1,12	Primavera-Invierno
	<i>Shigella</i> sp.	1	13	Primavera
	<i>Tatumella</i> sp.	1	13	Primavera
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	10	Primavera
	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	2	4,7
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	2	11,12	Verano-Otoño
	<i>Vibro parahemolyticus</i>	1	8,11	Verano
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	6	Invierno

En la tabla 21 podemos observar que la mayoría de los microorganismos encontrados fueron aislamientos del pozo de la cascada (5/33), el mirador de la cascada (5/33) y el arroyo junto a la laguna de oxidación (6/33). Esto podría indicarnos que el pozo de la cascada concentra los contaminantes como punto de drenaje de las microcuencas de Basaseachi y el Durazno. Además probablemente la construcción de la laguna de oxidación filtra contaminantes hacia los ríos y arroyos del PNCB.

**Tabla 21.** Identificación bioquímica de microorganismos aislados de muestras de agua del PNCB.

Aislado	Biotipo	Género	Especie	No. de muestra	Lugar de aislamiento
1	60010150	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	3	Río El Durazno
2	20424	<i>Acinetobacter</i>	<i>iwoffi</i>	6	Arroyo de Baquiriachi
3	43005103	<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	2	Cascada del Plan
4	43005103	<i>Halnia</i>	<i>alvei</i>	4	Río Basaseachi
5	43005103	<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	13	Mirador de la Cascada de Basaseachi
6	60010001	<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>	7	Aguaje de Basaseachi
7	60011001	<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>	3	El durazno
8	60000110	<i>Tatumella</i>	sp.	13	Mirador de la Cascada de Basaseachi
9	77100002	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	5	Y. Punto de unión del Río Basaseachi y Río el Durazno.
10	77520002	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	2	Cascada del Plan
11	76103172	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	7	Aguaje de Basaseachi
12	77103173	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	3	Río El Durazno
13	77113010	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	11	Arroyo de la laguna de oxidación
14	53111010	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	6	Arroyo de Baquiriachi
15	53317010	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	13	Mirador de la Cascada de Basaseachi
16*	77113010	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	13	Mirador de la Cascada de Basaseachi
17*	77115010	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	6	Arroyo de Baquiriachi
18	77115010	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1	Pozo Cascada de Basaseachi
19	77115012	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	1	Pozo Cascada de Basaseachi
20	77704370	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	11	Arroyo de la laguna de oxidación
21*	77714370	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	11	Arroyo de la laguna de oxidación
22*	77714376	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	10	Arroyo de Betorachi
23	77714372	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	8	Arroyo de Las Estrellas
24	77714370	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>	4	Arroyo de la laguna de oxidación
25	53101002	<i>Salmonella</i>	Paratyphi A	1	Pozo Cascada de Basaseachi
26	73101006	<i>Salmonella</i>	Paratyphi A	12	Cahuisori
27	53505041	<i>Salmonella</i>	sp.	5	Y. Punto de unión del Río Basaseachi y Río el Durazno.
28	40010010	<i>Shigella</i>	sp.	13	Mirador de la Cascada de Basaseachi
29	60010101	<i>Vibrio</i>	<i>cholerae</i>	11	Arroyo de la laguna de oxidación
30	41005007	<i>Vibrio</i>	<i>parahaemolyticus</i>	11	Arroyo de la laguna de oxidación
31	40005007	<i>Vibrio</i>	<i>choleare</i>	12	Cahuisori
32	30000002	<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>	10	Arroyo de Betorachi
33*	76103176	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	1	Pozo Cascada de Basaseachi

### 8.1.8 *Contaminación de microorganismos a través de los efluentes*

Al estudiar la dispersión de los microorganismos a través de los efluentes, se logró la determinación geográfica de los microorganismos a través de los puntos de muestreo se realizó con número de Biotipo, donde se pudo identificar algunas cepas se aislaron de dos sitios de muestreo diferentes las cuales que poseen el mismo biotipo, indicando un arrastre de contaminantes a través de los cuerpos de agua. Las cepas 3, 4 y 5 que se aislaron del Río Basaseachi, Cascada del Plan y del pozo de la cascada, se identificaron como *Hafnia alvei*. Las cepas 13 y 16 que se identificaron como *E. coli* se aislaron de la laguna de oxidación y del pozo de la cascada, al igual que las cepas 17 y 18, que se aislaron del arroyo de Baquiriachi y del pozo de la cascada. Las cepas 21 y 24 corresponden a *K. oxytoca* y ambas se aislaron de la laguna de oxidación. Las cepas que fueron reconocidas con el mismo número de biotipo fueron aisladas en uno o dos puntos arriba de la cascada y en el pozo de la cascada, a excepción de las muestras 21 y 24, que solo se encontraron en el arroyo de la laguna de oxidación. Cabe mencionar que las cepas que tenían el mismo biotipo no mostraron el mismo patrón de resistencia, esto podría indicar una posible selección de resistencia a antibióticos (Hollis *et al.*, 1981).

### 8.1.9 *Perfil de resistencia a antibióticos*

A los 33 microorganismos identificados se les analizó el perfil de resistencia a antibióticos. En la tabla 22, se muestra el perfil de cada uno de los aislamientos a excepción de las cepas 13, 14 y 15 corresponden a cepas de *E. coli* que resultaron susceptibles a todos los antibióticos probados. En la primera columna se muestran las categorías de los antimicrobianos probados, en la segunda columna los antibióticos probados y en el resto de las columnas todas las cepas analizadas (ver Tabla 21, para nombres y origen de los aislamientos). En la tabla 22 se pueden observar 3 tipos de clasificaciones, por ejemplo la “R” está asociada directamente con la resistencia total del microorganismos a dicho agente antimicrobiano, “I” hace referencia a la resistencia intermedia y la “Ri” a la resistencia intrínseca o natural propia del microorganismo (puntos de corte y CIM, ver apéndice III).



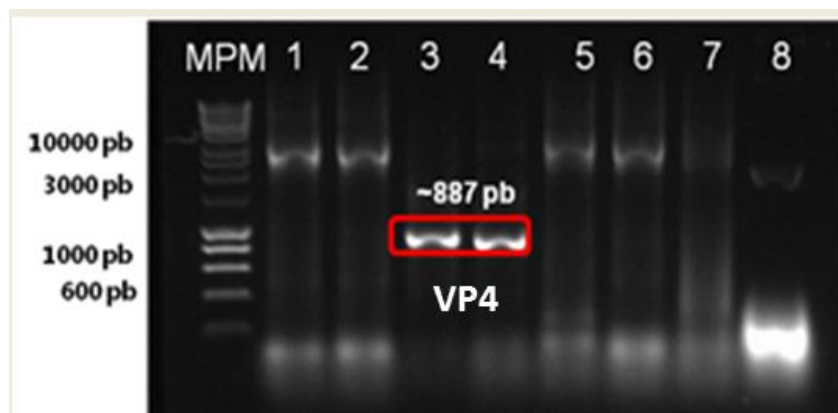
**Tabla 22.** Perfil de resistencia a antibióticos de los aislamientos. Las cepas 2, 6, 7, 13, 14, 15, 25, 27, 32 no se mostraron en la tabla debido a que presentaron susceptibilidad a todos los antimicrobianos.

Categorías	Antibióticos	Número de aislado																																		
		1	3	4	5	8	9	10	11	12	16*	17*	18	19	20	21*	22*	23	24	26	28	29	30	31	33*											
Amino glucósidos	Tobramicina																																			
	Amicacina											R																								
	Gentamicina																																			
Carbapenems	Imipenem						I																													
	Meropenem																																			
Espectro no extendido de cefalosporinas de 1ª y 2ª generación.	Cefazolina		Ri	Ri	Ri		Ri	Ri	Ri	Ri	I	R					R	R	I											R	Ri					
	Cefuroxima		R		I							R					I	R															I	R		
Espectro extendido de cefalosporinas de 3ª y 4ª generación.	Cefotaxima											R				R	R				R													I		
	Ceftriaxona		I						I								R																			
	Ceftazidima												R																						R	
	Cefepime						R					R					I	R																	R	
Cefamicinas	Cefotetan																R																			
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino												I	R	R																					
	Moxifloxacino													I	R	R																				
	Levofloxacino													I	R	R																				
Sulfonamidas	Trimetoprim-sulfametoxazol	R											R	R	R																					
Monobactams	Aztreonam						I					R	R																					R		
Penicilinas	Ampicillin						R			I	Ri	R	R						Ri	Ri	Ri	Ri	Ri	Ri	I	R	R						R	Ri		
Combinación de penicilinas	Ampicillin-sulbactam	R	I		I	R						R	R																						R	
	Piperacilina-tazobactam												R																							R
	Ticarcilina-ácido clavulánico												R																							

Categorías: R = resistente; I = Resistencia intermedia; Ri = Resistencia intrínseca; \* = Cepas con perfil de multiresistencia a antibióticos

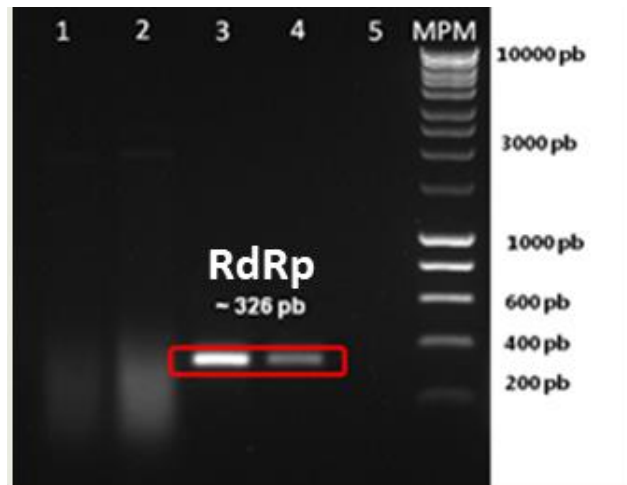
### Controles internos virales para las curvas de calibración de RT-qPCR

Una vez linealizado el DNA plasmídico se procedió a realizar una PCR para la detección de RV mediante la amplificación del gen VP4. En la Figura 20 se muestran 8 clonas, donde solamente las clonas 3 y 4 tuvieron el inserto de interés con un producto esperado 887 pb y que se procedieron a utilizar como controles virales o también llamados constructos virales RV1017-pGEM.



**Figura 20.** Control viral para Rotavirus, determinación de clonas con el gen VP4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. MPM: Hyperladder I, carril 1: clona 1, carril 2: clona 2, carril 3: clona 3, carril 4: clona 4, carril 5: clona 5, carril 6: clona 6, carril 7: clona 7, clona 8: CN pUC19.

Se determinó NV mediante la amplificación del gen RdRp con un producto esperado de 326pb. En la Figura 21 se muestran 5 clonas, donde solamente las clonas 3 y 4 tuvieron el inserto de interés, mismo que le empleó como control viral, también llamados constructos virales NV1004-pGEM.

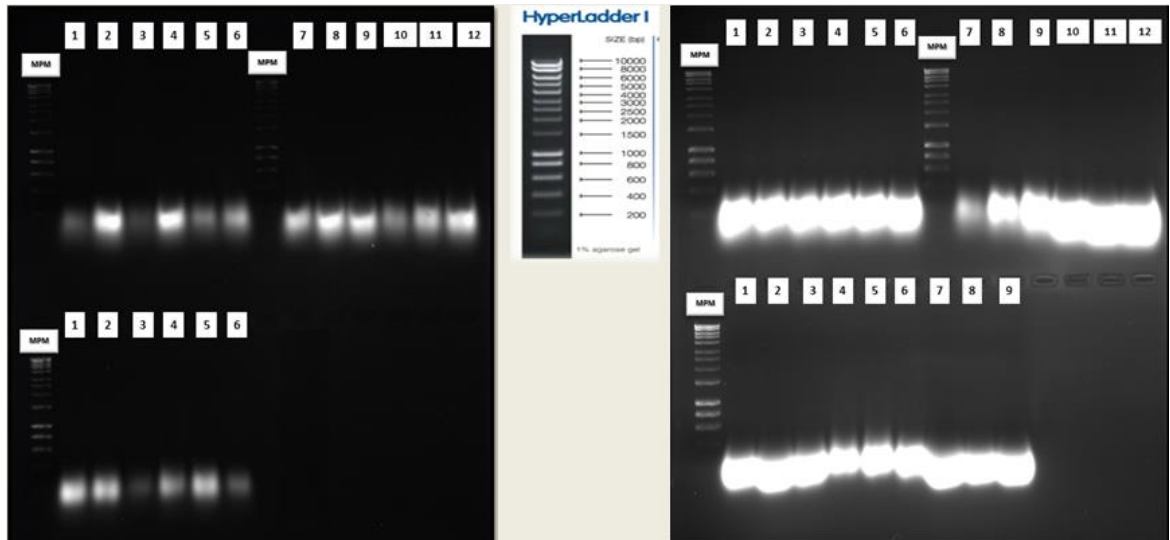


**Figura 21.** Control viral para Norovirus, determinación de clonas con el gen RdRp. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: clona 1, carril 2: clona2, carril 3: clona 3, carril 4: clona 4, carril 5: control, carril 6: MPM *Hyperladder I*.

### ***Extracción de RNA de muestras de agua***

#### ***8.1.10 Extracción de RNA. Muestreo individual de Otoño***

Para el análisis de virus entéricos en agua se realizó la extracción de RNA, inicialmente durante la época de otoño, debido a los resultados previos donde la carga bacteriana fue mayor durante esta época. Las muestras de agua fueron filtradas primero por la técnica VIRADEL con la cual se obtuvo 1-mL de concentrado, el cual fue extraído por triplicado de un solo concentrado de un litro de muestra de agua. El RNA obtenido de las muestras de agua se muestra en la Figura 22 en dos geles de agarosa al 1%, con 28 pozos por gel.

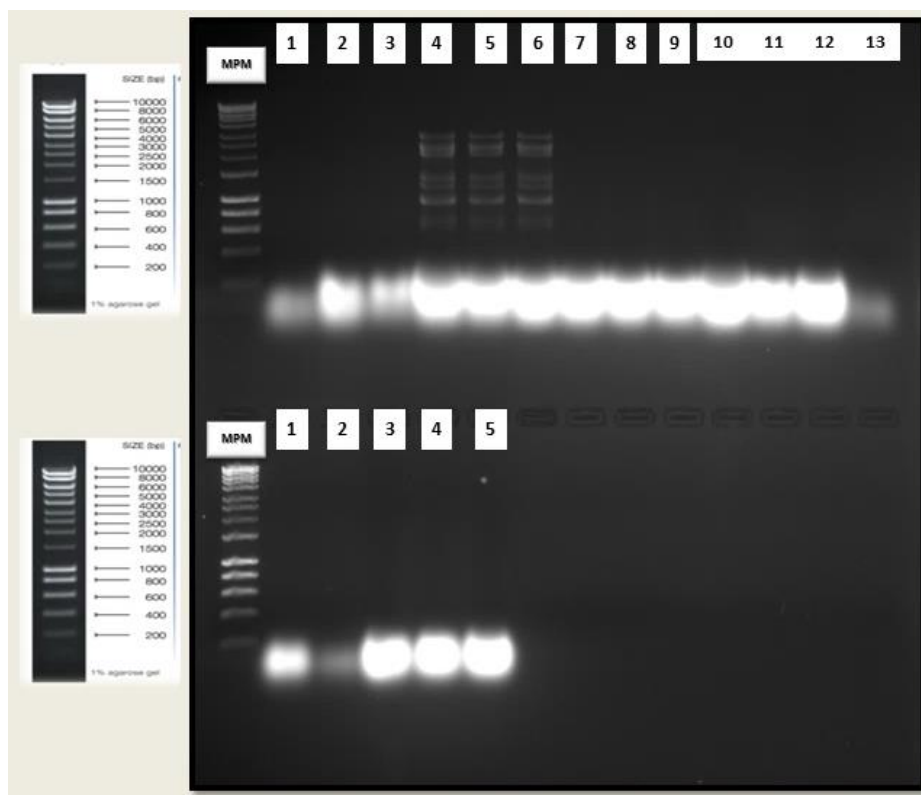


**Figura 22. Extracción de RNA de las 13 muestras por separado durante la época de otoño.** En ambos se utilizó el marcador de peso molecular (MPM) Hyperladder I. Gel lado izquierdo superior: Carril 1-3: Muestra 1. Carril 4-6: Muestra 2. Carril 7-9: Muestra 3. Carril 10-12: Muestra 4. Gel lado izquierdo inferior: Carril 1-3: Muestra 5. Carril: 4-6: Muestra 6. Gel lado derecho superior: Carril 1-3: Muestra 7. Carril 4-6: Muestra 8. Carril 7-9: Muestra 9. Carril 10-12: Muestra 10. Gel lado derecho inferior: Carril 1-3: Muestra 11. Carril: 4-6: Muestra 12. Carril 7-9: Muestra 13.

En la Figura 22 se observan dos geles de agarosa donde podemos observar una cantidad promedio de 300 ng/μL de RNA al final de los carriles tanto en la parte superior como inferior del gel, en las 13 muestras analizadas.

### 8.1.11 Extracción de RNA. Pool de muestras

Debido a los resultados negativos del análisis de muestreos individuales se decidió juntar todos los puntos de muestreo como una sola muestra, por época del año (primavera, verano, otoño, invierno). En la Figura 23 se observa la extracción de RNA por triplicado de un solo concentrado del control negativo (agua destilada), control positivo (muestra positiva a RV 659 y NV 1034), primavera (12 puntos de muestreo), verano (11 puntos de muestreo), otoño e invierno (13 puntos de muestreo); durante la primavera se perdió una muestra por la falta de seguridad para la toma de muestras y durante el verano dos muestras por las altas temperaturas.



**Figura 23. Extracción de RNA del pool de muestras por estaciones del año 2013.** En la parte superior e inferior del gel, en el carril 1 se colocó el MPM *Hyperladder I*. Superior: Carril 1-3: Control negativo. Carril 4-6: Control positivo. Carril 7-9: Muestra primavera. Carril 10-12. Muestra verano. Carril 13. Muestra otoño. Inferior: Carril 1 y 2: Muestra otoño. Carril 3-5: Muestra de invierno.

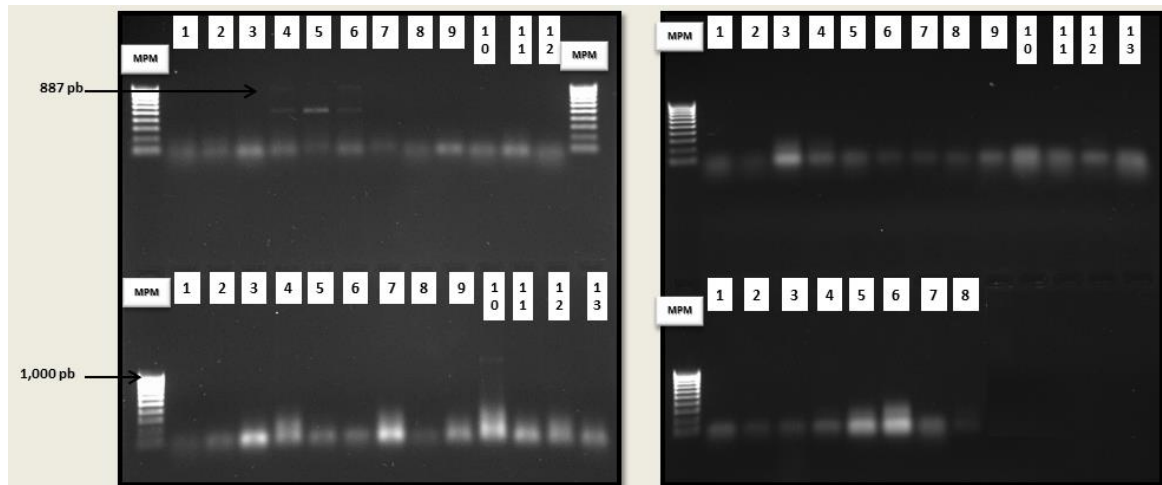
En la Figura 23 se observa una cantidad promedio de 200  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de RNA extraído, tanto en el control positivo donde se puede observar la escalera característica de RV en fragmentos, así como también en la mayoría de las muestras, con una buena calidad visual.

### ***Detección de RV y NV por RT-PCR punto final***

#### ***8.1.12 Detección de Rotavirus. Muestreo individual de Otoño.***

Se realizó la RT-PCR punto final de las muestras problema individualmente para la determinación de RV en aguas naturales del PNCB. En la Figura 24 se muestran los amplicones del gen VP4 de RV en gel de agarosa al 1% de las muestras problema del PNCB durante la época de otoño. El control negativo para este corrida corresponde a agua destilada que fue filtrada igual que las muestras problema con la técnica VIRADEL por triplicado del mismo concentrado; el control positivo que es un litro de agua

destilada más 1-mL de muestra problema positiva a RV (la número 1033 de la coproteca UACH-FCQ) y las muestras fueron presentadas por triplicado del mismo concentrado.



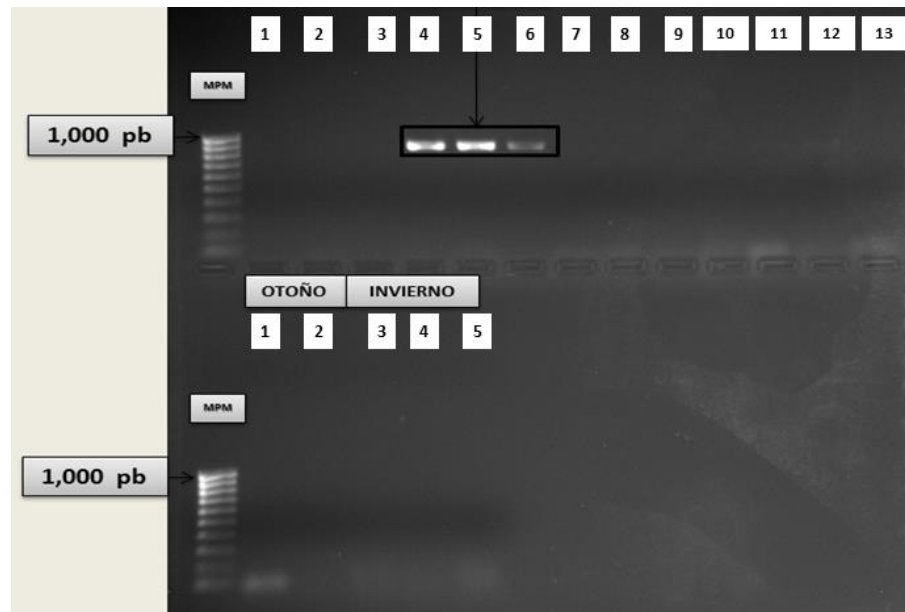
**Figura 24.** Detección de RV por RT-PCR punto final. Muestras individuales de otoño. En ambos geles se utilizó el MPM *Hyperladder IV*. Gel lado izquierdo superior: Carril 1-3: Control negativo. Carril 4-6: Control positivo. Carril 7-9: Muestra 1. Carril 10-12 Muestra 2. Gel lado izquierdo inferior: Carril 1-3: Muestra 3. Carril 4-6: Muestra 4. Carril 7-9: Muestra 5. Carril 10-13 Muestra 6. Gel lado derecho superior: Carril 1-3: Muestra 7. Carril 4-6: Muestra 8. Carril 7-9: Muestra 9. Carril 10-12 Muestra 10. Carril 13: Muestra 11. Gel lado derecho inferior: Carril 1-2: Muestra 11. Carril 3-5: Muestra 12. Carril 6-8: Muestra 13.

Los controles positivos de la Figura 24 presentaron una banda esperada de 887 pb para la detección del amplicón de VP4 en RV. En las muestras problema no se observaron amplicones positivos a excepción de uno de los triplicados de la muestra 5, donde se observa una banda, sin embargo, no se tomó en cuenta debido a que al parecer pesaba más de 1,000 pb según el MPM. Al analizar los resultados se decidió que probablemente, un litro de muestra no era suficiente para determinar RV en muestras de aguas naturales.

### 8.1.13 Detección de Rotavirus. Pool de muestras.

En la Figura 25 se muestra la RT-PCR punto final para la detección gen VP4 de 887pb, se observa un gel de agarosa al 1%. En la Figura 25 se observa claramente que el control negativo está limpio indicando que no hay contaminación de RV en el agua destilada, los controles positivos se ven que corresponden a los esperados y en la

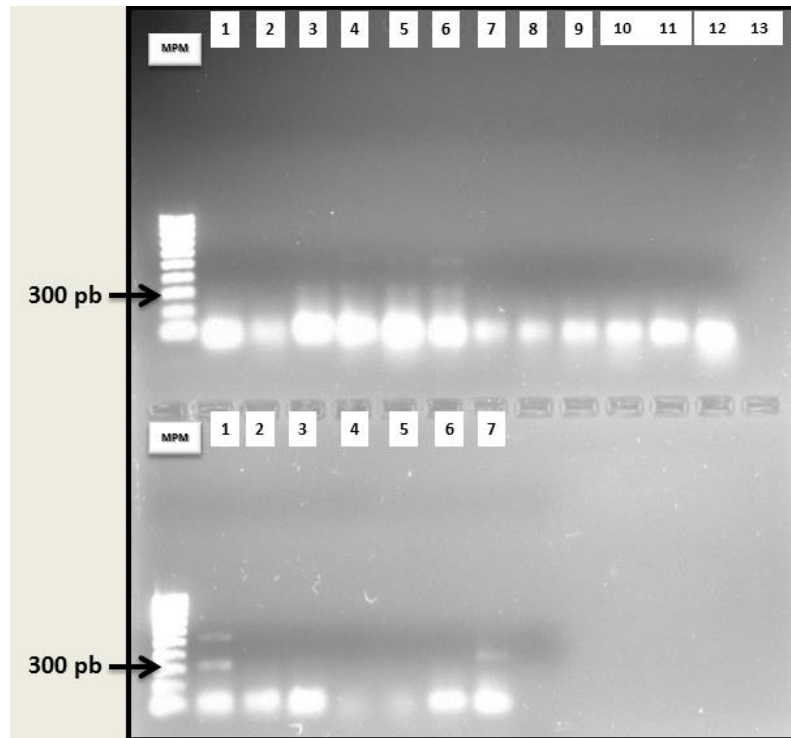
muestras volvemos a observar que no hay muestras positivas a RV por detección RT-PCR punto final.



**Figura 25.** Detección de RV RT-PCR punto final del pool de muestras por estación del año. En los carriles 1 superior e inferior el MPM *Hyperladder IV*. Superior: Carril 1-3: Control negativo. Carril 4-6. Control positivo. Carril 7-9: primavera. Carril 10-12: verano. Carril 13: otoño. Inferior: Carril 1-2: otoño. Carril 3-5: invierno.

#### 8.1.14 Detección de Norovirus. Pool de muestras.

En la Figura 26 se observa la amplificación (por triplicado) de un solo concentrado durante las estaciones del año 2013 en el PNCB, donde el control negativo está limpio y en los controles positivos se observa la banda esperada de 326 pares de bases que corresponde al tamaño del gen RdRp para la detección de NV. En las muestras se observa que 1/3 presentó una banda positiva durante el otoño y que corresponde a la banda esperada. Estos resultados nos permiten confirmar la presencia de Norovirus en el agua del PNCB durante el verano del 2013.

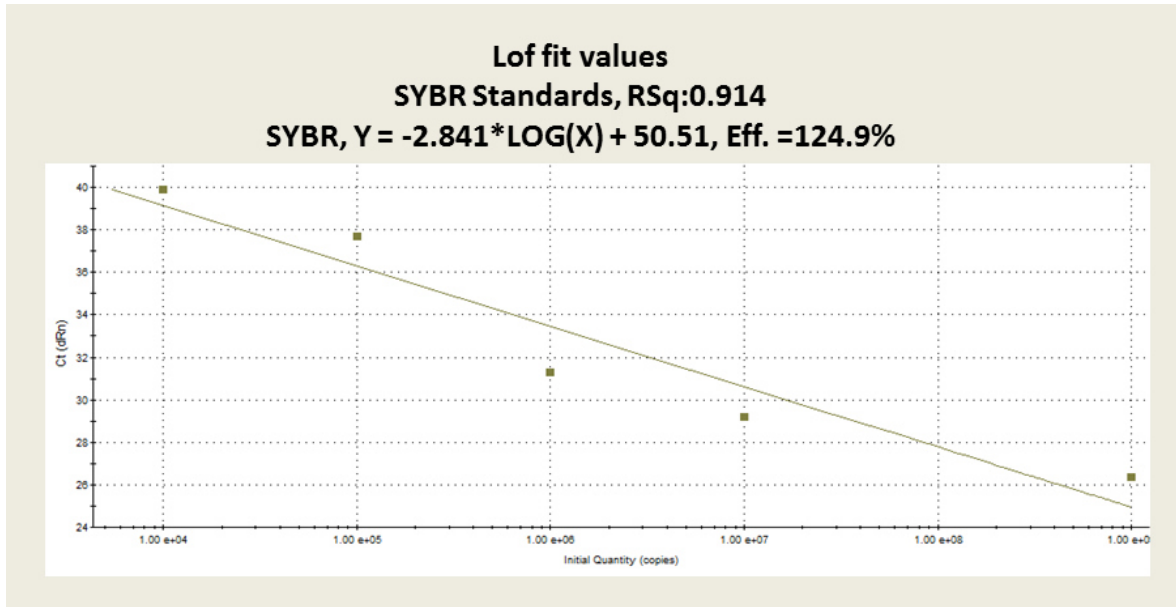


**Figura 26.** Detección de Norovirus por RT-PCR punto final del pool de muestras por estación del año. En los carriles 1 superior e inferior el MPM *Hyperladder IV*. Superior: Carril 1-3: Control negativo. Carril 4-6. Control positivo. Carril 7-9: primavera. Carril 10-12: verano. Carril 13: Vacío. Inferior: Carril 1-3: otoño. Carril 4-6: invierno. Carril 7: Control positivo.

### ***Detección de Rotavirus y Norovirus por RT-PCR en tiempo real***

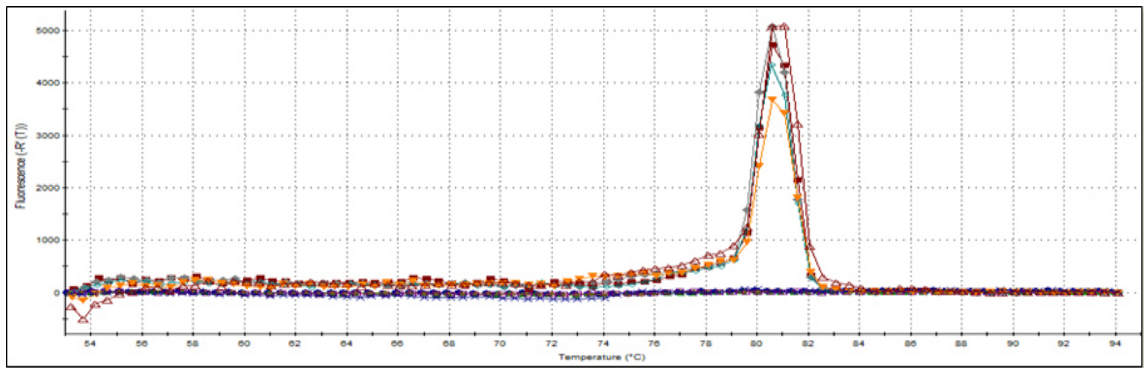
#### ***8.1.15 Detección de RV (CON2-CON3). Pool de muestras***

El realizar la ecuación de la recta de la curva de calibración con los datos obtenidos para la detección de RV (Figura 27), observamos que la curva tuvo una eficiencia del 124.9% lo que se sale de los estándares, ya que según Gunson y colaboradores (2006) la eficiencia oscila entre los valores de 85 a 110%. De igual forma el valor de la pendiente, que fue de -2.84 para este experimento, también se encuentra por fuera de los estándares, ya que deben de estar entre -3.18 a -3.45, esto nos indica que existe contaminantes que alteran los resultados de la curva (Ward *et al.*, 2013).



**Figura 27.** Ecuación de la recta de la curva de calibración para la detección RV (Con2 y Con3). Para obtener los puntos se calculó despejando el valor de X en la ecuación de la recta y el valor de Y se sustituyó por el valor de la Ct de cada dilución desde  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^9$ . Luego se calculó el valor de R y la eficiencia de la qPCR.

Al analizar la curva de disociación de la RT-PCR en tiempo real con el amplicón de 887 pb, se observó que los amplicones se disociaron a una temperatura arriba de los  $80^\circ\text{C}$ , lo que según Dorak (2007) sí corresponde al producto esperado (Figura 28).



**Figura 28.** Curva de disociación de los productos obtenidos por qPCR para la detección de Rotavirus (Con2 y Con3).

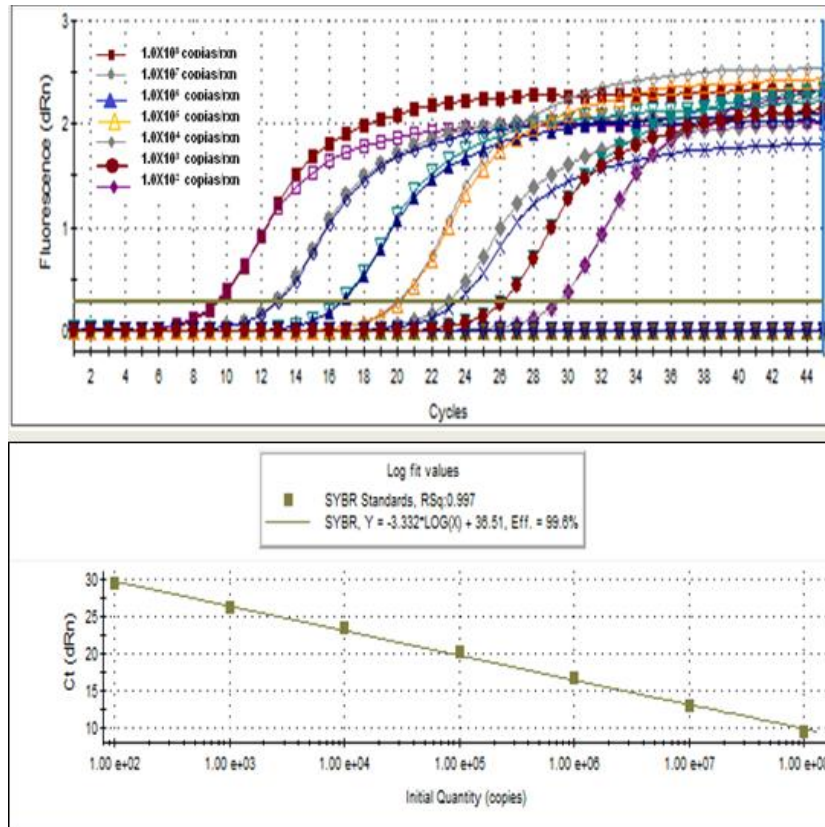
Con los juegos de *primers* Con2 y Con3 no se obtuvo el porcentaje de eficiencia adecuada ni el valor de la pendiente según la literatura, por lo que se decidió que probablemente el amplicón de 887 pb era demasiado grande para la amplificación y se



eligió amplificar solo una parte del gel de VP8 con el juego de *primers* CON3 e IT1 con un amplicón más pequeño de 345 pb.

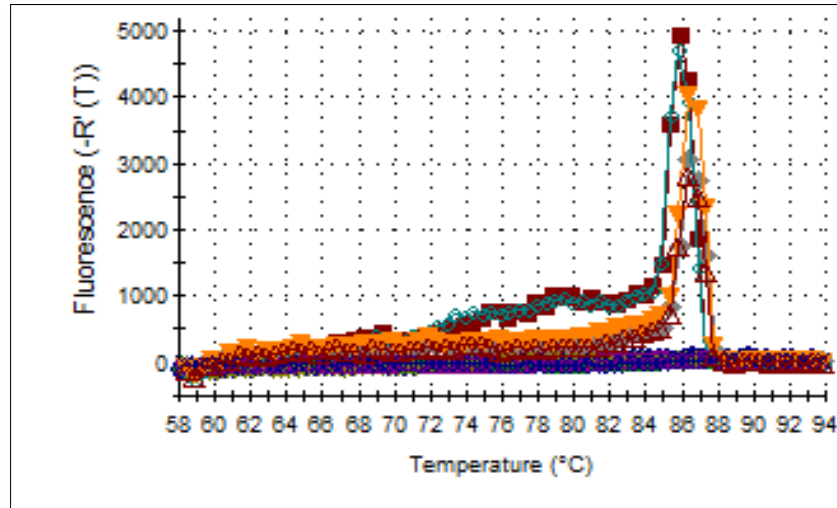
### 8.1.16 Detección de Rotavirus (CON3-IT1). Pool de muestras

La curva de calibración en la parte superior y la gráfica de la ecuación de la recta en la parte inferior para la detección de RV con un amplicón de 345 pb, muestra una eficiencia del 99.6%, que según Gunson y colaboradores (2006) se encuentra dentro de los parámetros aceptados; de igual forma el valor de la pendiente fue de -3.33 encontrándose dentro de los estándares según Ward y colaboradores (2013) de entre -3.18 a -3.45 (Figura 29).



**Figura 29.** Detección de RV por RT-qPCR (Con3-IT1). Parte superior: Curva de calibración desde  $1 \times 10^8$  hasta  $1 \times 10^2$  de izquierda a derecha por duplicado. Parte inferior: Ecuación de la recta de la curva de calibración para la detección RV (Con3-IT1). Para obtener los puntos se calculó despejando el valor de X en la ecuación de la recta y el valor de Y se sustituyó por el valor de la Ct de cada dilución desde  $1 \times 10^2$  hasta  $1 \times 10^8$ . Luego se calculó el valor de R y la eficiencia de la qPCR.

Al analizar la curva de disociación con estos *primers* (Figura 30), se observó que todos los amplicones se disociaron arriba de los 80°C, mostrando la banda de amplificación esperada de 345 pb para la detección de RV en el *pool* de muestras por estación del año.



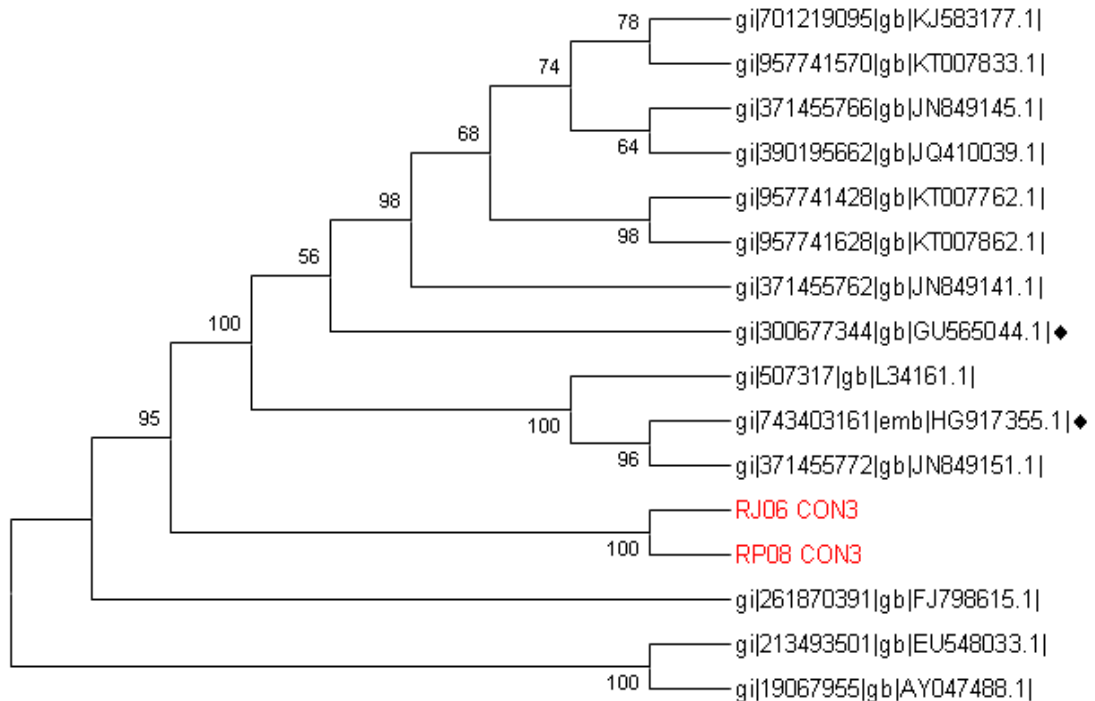
**Figura 30.** Curva de disociación de los productos obtenidos por qPCR para la detección de Rotavirus (Con3-IT1)

Los resultados de la carga viral se obtuvieron mediante la cuantificación de copias por reacción del control positivo y los pool de muestras con la ecuación de la recta de la curva de calibración y se dividió en la cuarta columna entre los litros de muestra analizados, donde se analizó 1-Litro de muestra con 1-mL de muestra positiva a RV y 12 litros del pool de muestras de primavera, ya que una no se pudo tomar por cuestiones no seguras para la toma de muestras, y 11 litros durante el verano, ya que 2 de los arroyos que se muestrearon se secaron, tal y como se muestra en la tabla 23.

**Tabla 23.** Cuantificación de copias virales en muestras positivas a RV.

Ecuación de la recta: $Y = -3.332 * (\text{Log}X) + 38.51$			
Muestra	Copias virales	Litros analizados	Copias virales/litro
Control Positivo	360	1	360
Primavera	94	12	8
Verano	180	11	16

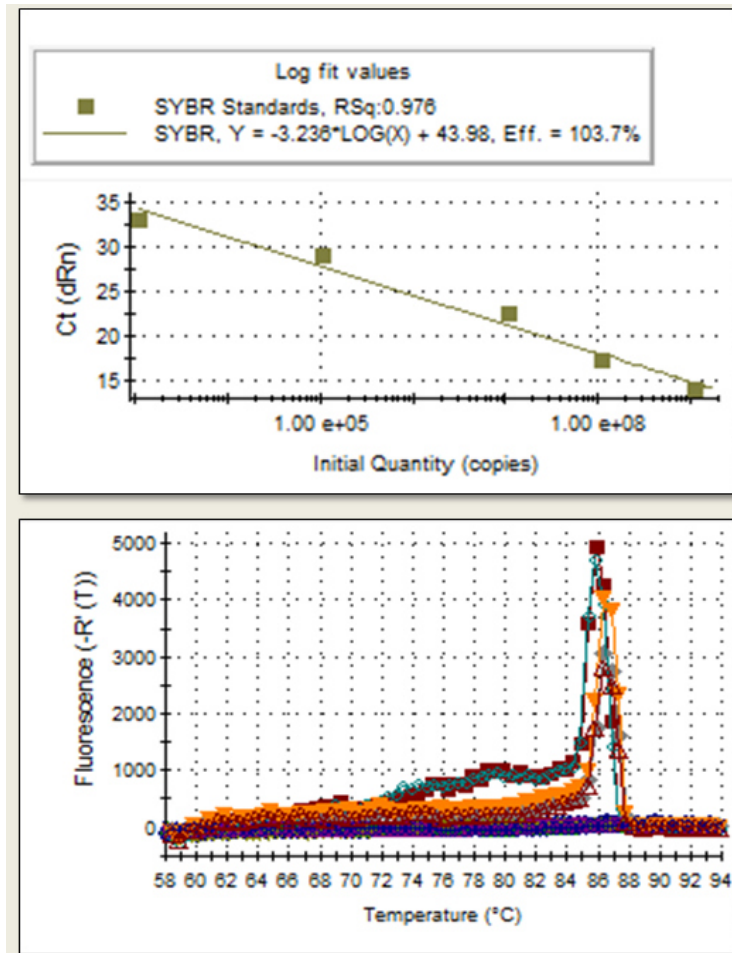
Las muestras positivas a RV se enviaron a secuenciar para corroborar su identificación. En la Figura 31 se muestra el árbol filogenético de las muestras positivas a RV, donde RJ03 corresponde a la muestra positiva durante el verano y RP08 a la muestra positiva durante la primavera. El árbol filogenético de la Figura 31 muestra que las muestras positivas son idénticas entre sí y corresponden al genotipo P[8] de rotavirus.



**Figura 31.** Análisis filogenético de las secuencias de RV por qRT-PCR. RJ06 corresponde a la muestra positiva de verano. RP08 corresponde a la muestra positiva de primavera. El resto de las secuencias corresponden a secuencias que se encuentran en el Gen-Bank determinadas como Norovirus.

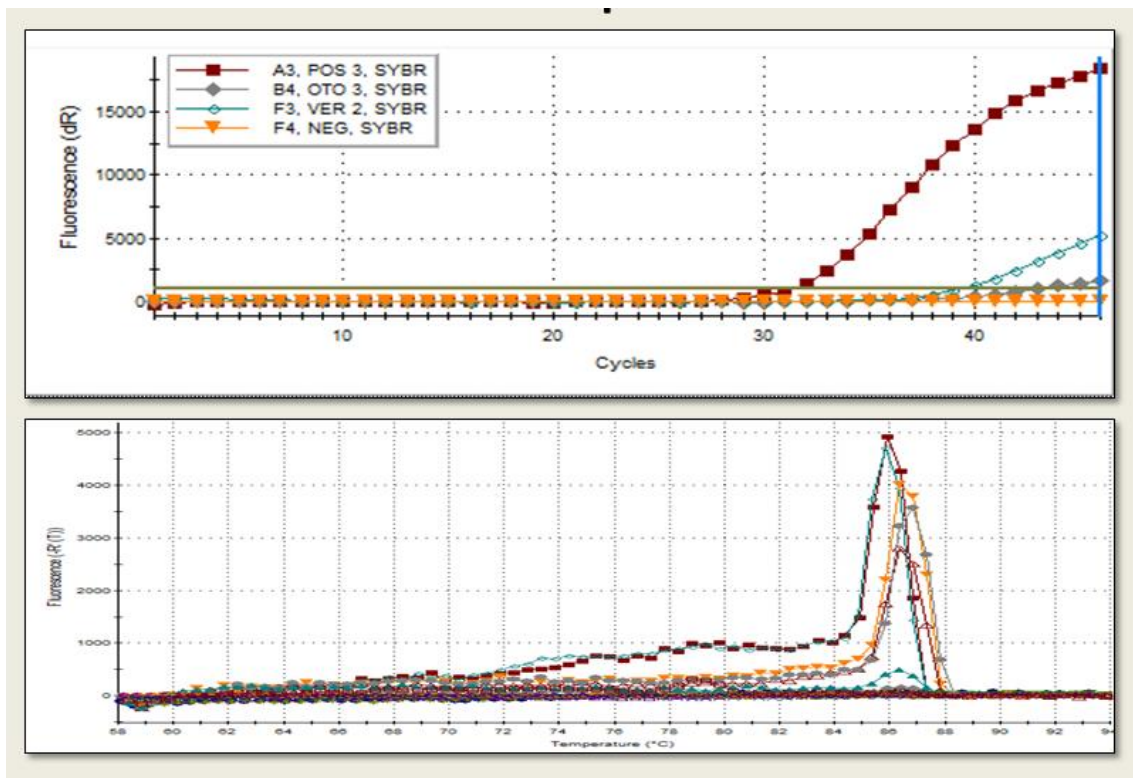
### 8.1.17 Detección de Norovirus (JV12 y JV13). Pool de muestras

Para la detección de Norovirus se usaron los *primers* JV12 y JV13. La ecuación de la recta de la curva de calibración de los resultados, se obtuvo una eficiencia del 103.7%. Según Gunson y colaboradores (2006) la eficiencia puede oscilar de 85% a 110%. La pendiente tuvo un valor de -3.23, encontrándose dentro de los estándares según lo describen Ward y colaboradores (2013) de entre -3.18 a -3.45 (Figura 32). En la parte inferior de la Figura 32 se observa la curva de disociación donde los amplicones se disociaron hasta los 80°C, indicando ser los amplicones esperados.



**Figura 32.** Detección de NV por RT-qPCR (JV12-JV13). Parte superior: Esquema de la ecuación de la recta de la curva de calibración para la detección NV. Para obtener los puntos se calculó despejando el valor de  $X$  en la ecuación de la recta y el valor de  $Y$  se sustituyó por el valor de la  $Ct$  de cada dilución desde  $1 \times 10^2$  hasta  $1 \times 10^8$ . Luego se calculó el valor de  $R$  y la eficiencia de la qPCR. Parte inferior: Curva de disociación de los productos de qPCR.

Con la anterior curva de calibración se analizaron los pool de muestras por estación del año, obteniendo resultados positivos para las épocas de otoño y verano. Las muestras positivas para NV en el verano amplificaron a 39 ciclos ( $Ct=39$ ) y en el otoño a 32 ciclos ( $Ct=42$ ), al igual que el control positivo ( $Ct=32$ ) (Figura 33).



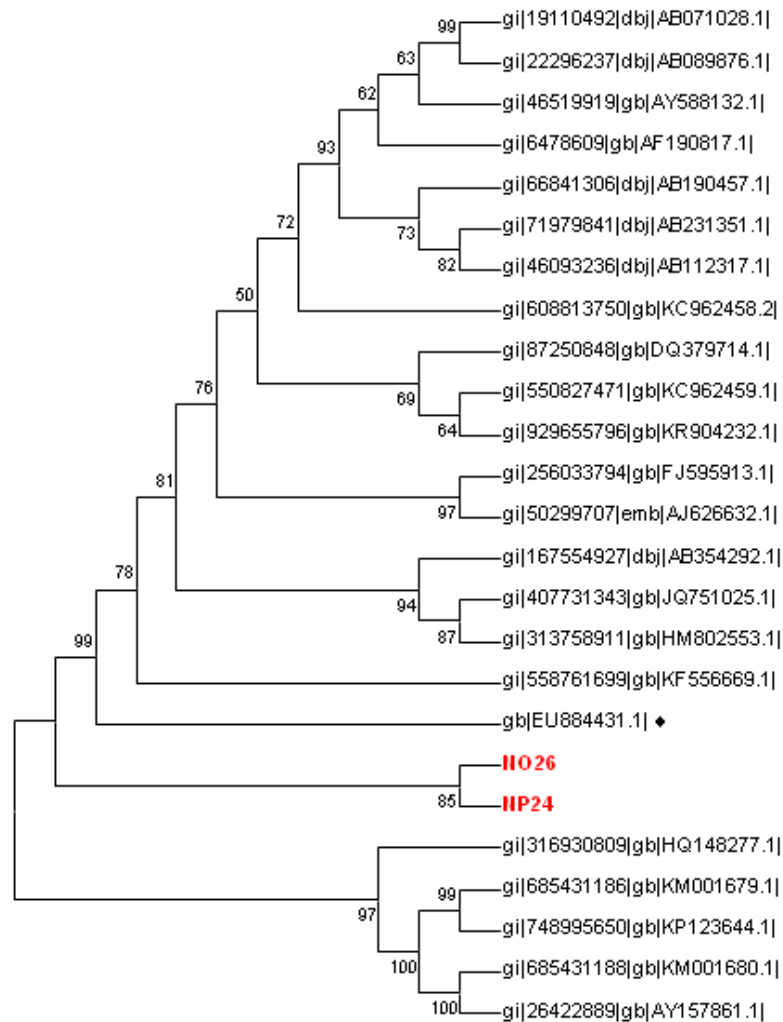
**Figura 33.** Muestras positivas a Norovirus por RT-PCR tiempo real (JV12 y JV13). Parte superior la amplificación del control positivo (■), control negativo (▼), el pool de muestras de otoño en rombo (◆) y el pool de muestras de verano en rombo transparente. Parte inferior la curva de disociación de los productos obtenidos.

El total de copias virales que se detectaron en los pool de muestras de verano, otoño y el control positivo se muestra en la tabla 24. En la columna dos se muestran las copias virales, en la tres los litros analizados y en la última las copias virales por litro de muestra. El control positivo tuvo el mayor número de copias por litro de muestra, mientras que en el verano se detectaron 9 copias por litro y en el otoño se lograron detectar 388 copias de norovirus por litro de muestra.

**Tabla 24.** Cuantificación de copias virales en muestras positivas a NV.

<b>Ecuación de la recta: <math>Y = -3.236(\text{Log}X) + 43,96</math></b>			
<b>Muestra</b>	<b>Copias virales</b>	<b>Litros analizados</b>	<b>Copias virales/L</b>
<b>Control Positivo</b>	<b>603</b>	<b>1</b>	<b>603</b>
<b>Verano</b>	<b>100</b>	<b>11</b>	<b>9</b>
<b>Otoño</b>	<b>5,036</b>	<b>13</b>	<b>388</b>

Los productos de qRT-PCR positivos a norovirus se enviaron a secuenciar para corroborar la identificación. En la Figura 34 se muestra el árbol filogenético de las secuencias positivas a NV, donde NO26 corresponde a la muestra positiva de otoño y la NP24 corresponde a la muestra positiva durante el verano.



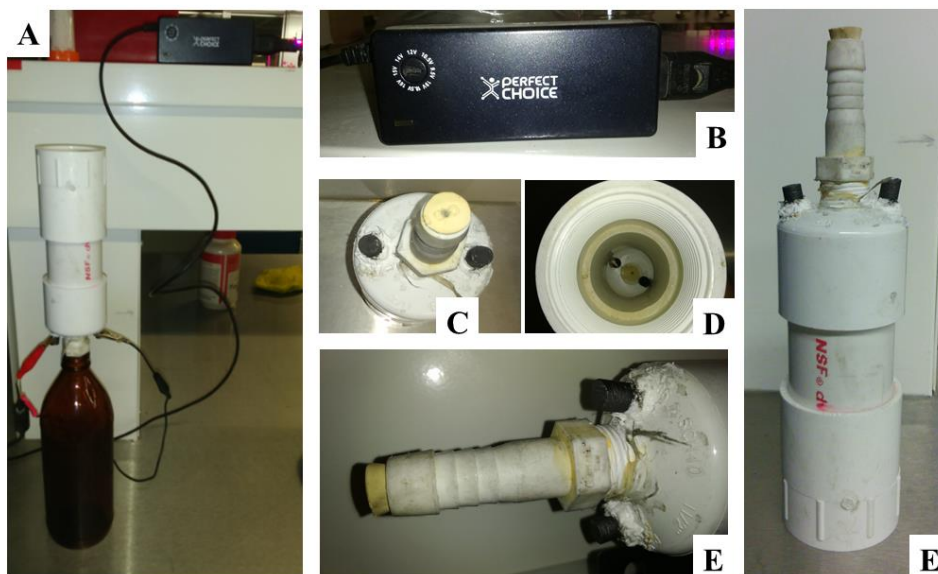
**Figura 34.** Análisis filogenético de las secuencias de NV por qRT-PCR. NO26 corresponde a la muestra positiva de otoño. NP24 corresponde a la muestra positiva de verano. El resto de las secuencias corresponden a secuencias que se encuentran en el Gen-Bank determinadas como Norovirus.

### ***Diseño del generador de cloro por electrólisis***

Se diseñó un prototipo económico para generar cloro germicida con agua, sal de mesa y electricidad de bajo voltaje. Se utilizó un tubo de PVC de 1½" acoplado a una tapa hembra para tubo de PVC de la misma medida y se perforó el fondo para insertar



un cople de inserción de poliducto cerrado con un tapón de hule y sellado con cemento para PVC. Dos electrodos de grafeno se insertaron en la parte inferior del prototipo para dirigir que la reacción se lleve cabo en el fondo. La altura del prototipo fue de 22 cm y los tubos de PVC tuvieron un grosor de 1½" (Figura 35).

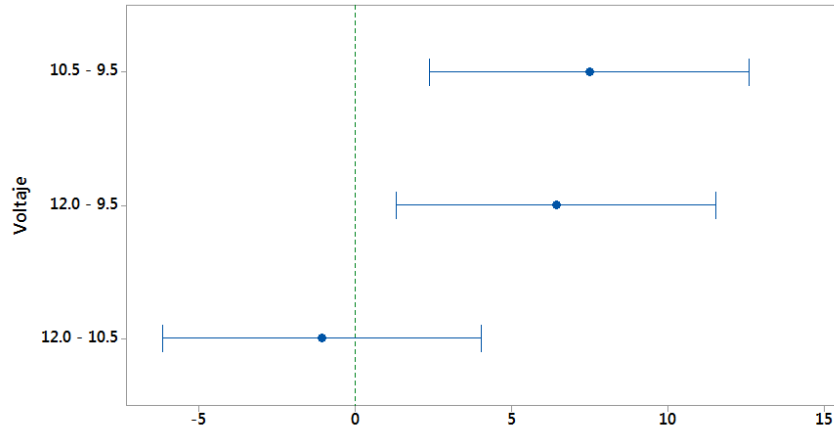


**Figura 35.** Prototipo del generador de cloro por electrólisis. A) Sistema del generador de cloro por electrólisis. B) Fuente de poder de variación de voltaje para pruebas de laboratorio. C) Electrodo de grafeno en la base de la tapa hembra. D) Vista interior del prototipo al final los electrodos de grafeno. E) Cople de inserción de poliducto y tapón de hule. F) Prototipo del generador de cloro.

### *Evaluación de la efectividad del generador de cloro*

Para la estandarización de la energía del prototipo generador de cloro se evaluaron tres diferentes voltajes (9.5, 10.5 y 12 V) y se analizó la efectividad del voltaje contra la concentración de cloro generado, con un análisis estadístico de ANOVA con modelo lineal general y comparación mediante el método de Tukey. El análisis describe que hay diferencias significativas ( $p=0.002$ ) en la generación de cloro (g/L) y el voltaje utilizado con un valor de  $n=10$  por cada voltaje analizado. En la comparación por el método de Tukey no se observó diferencia entre 10.5 y 12 V, sin embargo, entre 9.5 contra 10.5 y 12 V si hay diferencias significativas; siendo menor la concentración de cloro generada a 9.5 V con una media de 11.72 g/L comparada con la media observada cuando se utilizó 10.5 V fue de 19.19 g/L y para 12 V una media de

18.1 g/L. En la Figura 36 se describen las diferencias de medias para la concentración de cloro (g/L) a diferentes voltajes con intervalos de confianza de 95% de Tukey.



**Figura 36.** Análisis del generador de cloro. Voltaje vs [Cloro] en g/L. Se muestran los intervalos entre los voltajes analizados, si el intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

En un segundo análisis se llevó a cabo la comparación de la cantidad requerida de sal de mesa en gramos (18 g y 36 g) contra la generación de cloro (g/L). Este análisis se llevó a cabo mediante una prueba de t de student de 2 muestras. Donde se observó que hay diferencias significativas ( $p=0.002$ ) entre la concentración de sal para generar cloro con un valor de  $n=10$  cada una. Cuando se usaron 18 g de sal de mesa, se obtuvo una media de 11.72 g/L con una desviación estándar de 2.4, mientras que al utilizar 36 g se obtuvo una media de 23.10 g/L con una desviación estándar de 4.9. Estos datos demuestran que la generación de cloro aumenta proporcionalmente en función a la cantidad de sal añadida en nuestro sistema. Sin embargo, la reacción a 36 g de sal genera mucha energía en forma de calor y se derrite el pegamento del prototipo, por lo que se decidió utilizar una cantidad de sal de 18 g, que es aproximadamente una cucharada sopera de sal de mesa, lo que permitiría a los usuarios un manejo más amigable con el prototipo.

En un tercer análisis se evaluaron dos tratamientos con el cloro generado a dos tiempos de desinfección (15 min y 60 min) contra las UFC/mL que se obtuvieron después del tratamiento; el tiempo de desinfección hace referencia al lapso que transcurrió una vez agregado el cloro generado en el agua de prueba hasta realizar el



análisis de mesófilos aerobios. Los resultados del análisis demostraron que si hay diferencias significativas entre el tiempo de desinfección y la concentración en UFC/mL ( $p=0.032$ ) con una  $n=10$  por cada tiempo de desinfección. La media en UFC/mL para 15 min fue de 54.8 y para 60 min 14.3. En base a estos resultados, el mejor tiempo de desinfección con el cloro generado del prototipo fue de 60 min, en comparación con el cloro comercial que es de 15 min.

Finalmente, la evaluación total del prototipo se llevó a cabo mediante el %RBMA; se calculó la media aritmética de las pruebas de agua sin tratar menos la media aritmética de agua tratada, entre la media aritmética de agua sin tratar por 100. En la tabla 25 se muestran las pruebas que se realizaron por triplicado y se calcularon las medias aritméticas de la concentración del cloro (g/L) y de la cantidad de mesófilos aerobios del agua de prueba sin tratamiento y del agua de prueba con tratamiento, con estos datos se calculó el porcentaje de reducción bacteriana de mesófilos aerobios. Se observó que todos los tratamientos tuvo un %RBMA arriba del 99%; en la NOM-244-SSA1-2008 se establece que una prueba de potabilidad aceptable es cuando el %RBMA es igual o mayor a 95% para organismos mesófilos aerobios, por lo que se logró un índice de potabilidad aceptable en nuestro generador de cloro a base de sal de mesa (Diario Oficial de la Federación, 2008).

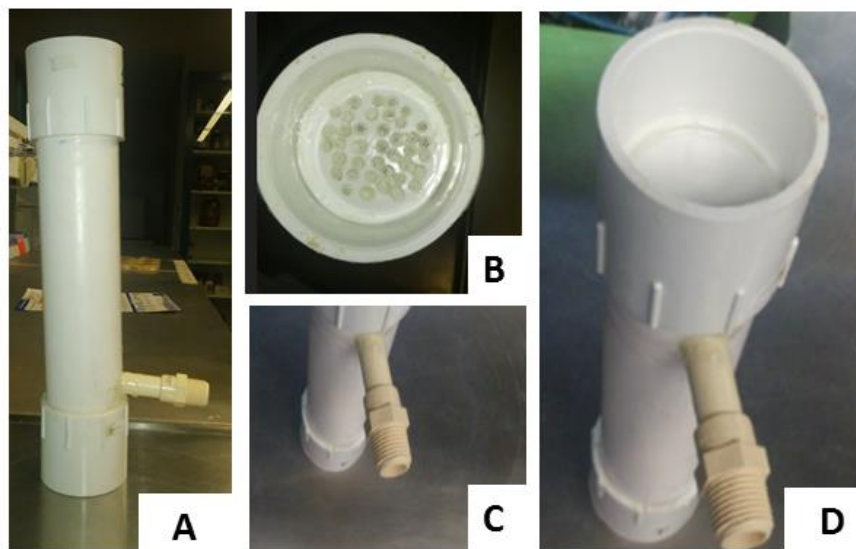
El generador de cloro por electrolisis se estandarizó con 18 g de sal de mesa en 200 mL de agua con energía de 12 V esto es importante porque equivale actualmente a lo que genera una mini celda solar. El costo del generador se calculó con un valor de \$250.00 (Doscientos cincuenta pesos 00/100 M.N) a la fecha, incluyendo la celda solar de 12.5 V. En total. el prototipo funcionó en 125 corridas que generaron 23 L de cloro a base de sal de mesa

**Tabla 25.** Evaluación de la efectividad del generador de cloro.

Voltaje	Sal (g)	Agua	Cloro (g/L)	Tiempo de desinfección (7 mL)	Mesófilos aerobios (UFC/mL) sin tratamiento	Mesófilos aerobios (UFC/mL) con tratamiento	%RBMA
9.5 V	18 g	200 mL	11.75	60 min	125,400	0	99.9%
9.5 V	36 g	200 mL	23.1	60 min	71,820	0	99.9%
12 V	18 g	200 mL	18.1	15 min	940,500	14.3	99.9%
10.5 V	18 g	200 mL	20.1	15 min	1,379,400	54.8	99.9%

### ***Diseño del prototipo de membranas de ultrafiltración***

Para el diseño del filtro a base de membranas de ultrafiltración se utilizaron membranas comerciales marca Yoeven®, colocados en un tubo de PVC cédula 40 de 2” sellados con epóxico avalado por la FDA conectados en los extremos a conexiones hembras de 2” de diámetro, las cuales sirvieron para unirse a una conexión macho que se acopló a un cubeta de plástico como recolector de agua sin tratar (Figura 37 A). Cuarenta membranas fueron colocadas de un extremo a una tapa de 2” con perforaciones exactas para el diámetro de cada membrana, selladas a la tapa con el epóxico (Figura 37 B). En la parte inferior del filtro las membranas de ultrafiltración se sellaron y fijaron a una tapa, con el fin que no hubiera filtración de agua contaminada hacia dentro tubo de PVC (Figura 37 D). A un costado del tubo de PVC se realizó un orificio donde se colocó una llave o tubo colector para dar salida al agua tratada (Figura 37 C).



**Figura 37.** Prototipo del filtro con membranas de ultrafiltración. A) Vista completa del filtro B) Parte anterior del filtro. C) Tubo colector. D) Parte posterior del filtro.

Se construyeron 3 prototipos de la misma manera, para evaluar su reproducibilidad y se compararon por triplicado con un filtro control familiar de 5L (LifeStraw, Suiza)

### ***Evaluación del prototipo de membranas de ultrafiltración.***

La evaluación del prototipo con membranas de ultrafiltración se llevó a cabo mediante el %RBMA; se calculó la media aritmética de las pruebas de agua sin tratar menos la media aritmética de agua tratada, entre la media aritmética de agua sin tratar por 100. En la tabla 26 se muestran las pruebas que se realizaron por triplicado para el control y tres prototipos construidos de la misma forma, la cantidad de mesófilos aerobios del agua de prueba sin tratamiento y del agua de prueba con tratamiento, con estos datos se calculó el porcentaje de reducción bacteriana de mesófilos aerobios. Se observó que todos los tratamientos tuvo un %RBMA arriba del 99%; en la NOM-244-SSA1-2008 se establece que una prueba de potabilidad aceptable es cuando el %RBMA es igual o mayor a 95% para organismos mesófilos aerobios, por lo que se logró un índice de potabilidad aceptable en nuestro prototipo de membranas de ultrafiltración (Diario Oficial de la Federación, 2008).

**Tabla 26.** Evaluación del prototipo de membranas de ultrafiltración.

Filtros	Repeticiones	Mesófilos aerobios (UFC/mL) sin tratamiento	Mesófilos aerobios (UFC/mL) con tratamiento	%RBMA
Control	1	456,000,000	0	99.9%
Control	2	4,000,000	0	99.9%
Control	3	100,000	0	99.9%
Filtro 1	1	720,000	0	99.9%
Filtro 1	2	330,000	0	99.9%
Filtro 1	3	100,000	0	99.9%
Filtro 2	1	1,000,000	48	99.9%
Filtro 2	2	6,000,000	0	99.9%
Filtro 2	3	15,000,000	4	99.9%
Filtro 3	1	1,100,000	0	99.9%
Filtro 3	2	3,100,000	0	99.9%
Filtro 3	3	3,300,000	0	99.9%

El prototipo de membranas de ultrafiltración tuvo un costo total de aproximadamente \$750.00 (Setecientos cincuenta pesos 00/100 M.N.) incluyendo la cubeta que se usa como depósito.

## DISCUSIÓN

---

La cascada de Basaseachi es la segunda cascada más alta (807 pies de altura) en México y se encuentra en el Parque Nacional Cascada de Bassaseachic en el Cañón de Basaseachi en la región de Barrancas del Cobre en el noroeste de México, cerca de Creel, Chihuahua. En esta área se ha observado brotes diarreicos entre los habitantes, los cuales carecen de acceso a agua potable y no disponen de un sistema de drenaje apropiado. Por desgracia, no se dispone de datos oficiales clínicos debido a la pobreza y las deficiencias en los análisis de muestras entre los habitantes que presentan diarrea. Por otra parte, las instalaciones médicas son insuficientes y los tratamientos con antibióticos convencionales no son muy eficaces para controlar la diarrea. Como resultado, las personas más enfermas (con cuadros de diarrea aguda) deben atenderse en otros hospitales cercanos para obtener la atención médica adecuada, siendo más difícil de obtener los datos clínicos entre los habitantes de Basaseachi. Estos brotes diarreicos han llevado a evaluar la contaminación del agua, además de los microorganismos responsables que puedan estar relacionadas con dichos brotes, además de determinar si los microorganismos presentes son resistentes a los antibióticos recomendados para el control médico de diarreas (proyecto aprobado por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas CONANP/DR03/08/PN01/PROCOCODES/1259/13). El objetivo del presente estudio fue identificar las poblaciones y los perfiles de resistencia a los antibióticos de bacterias coliformes presentes en el río Basaseachi y corrientes dentro del parque, para detectar la contaminación microbiana que pueden ser resistentes a los tratamientos farmacológicos convencionales. Las muestras se colectaron cerca de los asentamientos rurales, incluyendo el pozo cascada y el mirador del Parque Nacional Bassaseachic Falls.

*Análisis de pH y conductividad:* El pH de las muestras de agua se vio principalmente afectado durante el verano en la mayoría de las muestras, observándose una elevación del pH de las muestras. En ríos y arroyos de agua dulce este tipo de variaciones de alcalinidad afecta directamente a las especies nativas, en este caso la trucha (Rivera *et al.*, 2004).

En el estudio de conductividad ninguna de las muestras mostró mayor cantidad de iones disueltos que lo que marca la norma. Durante las estaciones del año 2013, se observó que durante la primavera y el verano se obtuvieron los valores más altos de conductividad, todo lo contrario durante el otoño y el invierno, a excepción de la muestra 11 que mantuvo una conductividad alta durante el otoño; cabe señalar que todas las muestras se encuentran bajo un rango adecuado de concentración de sales. Estos resultados concuerdan con los de Dorador y colaboradores (2003) quienes encontraron el más bajo valor de conductividad durante los meses de septiembre y los más altos durante mayo.

*Análisis fisicoquímico. Muestreo de Primavera:* Los valores de alcalinidad del agua se encuentran dentro de los estándares de calidad, según la norma oficial mexicana NOM-042-SSA1-1993. La alcalinidad nos sirve como buen indicativo para saber si es viable la vida acuática, siendo el máximo permisible de 300 mg/L (Diario Oficial de la Federación, 1993). La dureza presentó un valor medio de 11.2 mg/L que corresponde a dureza intermedia, considerada medianamente productiva (entre 10 y 25 mg/L). Esta clase de cuerpos de agua posee una flora y una fauna variadas, pero son menos productivas en términos de biomasa (Posa *et al.*, 2000).

*Análisis fisicoquímico. Muestreo de Verano:* Durante el verano el pH aumentó considerablemente en la mayoría de las muestras de agua. La alcalinidad se relaciona directamente con las variaciones bruscas de pH, y su estabilidad está dada por la presencia de lo que se conoce como reserva alcalina o sistema tampón, que depende directamente de las aguas de carbonato y bicarbonato (Rivera *et al.*, 2004).

*Análisis fisicoquímico. Muestreo de Otoño e Invierno:* Para el análisis fisicoquímico de otoño y verano se observó que todos los parámetros permanecieron normales. La restitución de los parámetros analizados hasta la normalidad durante la época de otoño, probablemente está dada por la gran cantidad de lluvias que se presentaron atípicamente en el año 2013 en esta época. En esta época los valores elevados de alcalinidad que se presentaron durante el verano se ven contrarrestados por

las lluvias, ya que son ácidas debido a la contaminación atmosférica, que puede llegar hasta un pH de 4 (Fraga, 1976).

*Conteo de coliformes fecales y coliformes totales en agua:* La búsqueda de coliformes como indicadores de contaminación fecal, ha sido una práctica establecida desde finales del siglo XIX; en 1895 se propuso la prueba de *E. coli* como índice para determinar la potabilidad del agua, marcando así el comienzo de los coliformes como indicadores patógenos (Gesche *et al.*, 2003). Davino y colaboradores (2015) reportaron resultados similares en un estudio en la playa de Jatiúca, Brasil, donde la cantidad de coliformes fecales aumentó durante las épocas de lluvia comparada con las épocas secas. De igual forma nuestros resultados concuerdan con los Becerra y Botello (1995) quienes encontraron que durante la época de lluvia en otoño en Chantuto Panzacola, Chiapas induce una disminución de la temperatura, lo que favorece el establecimiento de coliformes, tanto fecales como totales.

Nuestros resultados también concuerdan con el estudio en la franja litoral de Bahía Banderas por Cortés-Lara (2003) donde se determinó una variación de bacterias coliformes de 3 hasta 24,000 NMP/100 mL y ellos describen que los valores reportados son evidencia de contaminación fecal en el sistema y que probablemente se atribuyan a las aguas de desecho doméstico, granjas, chiqueros y restaurantes que no cuentan con medios de sanidad. Refieren también que es importante tomar en consideración estos valores tan altos, ya que a concentraciones mayores a 1,000 NMP/100mL hay un 50% de probabilidad de encontrar *Salmonella spp.*

Estos resultados nos dan un indicativo que la cantidad de contaminantes sanitarios que se están desechando en los efluentes exceden la capacidad de los mismos. Para estos datos se tomó en cuenta la población existente y la actividad agropecuaria del municipio de Ocampo, donde los datos más recientes reportados por el INEGI hasta el 2007, describen que hay 6,730 cabezas de ganado vacuno, 1,160 cabezas de ganado equino, 876 de ganado porcino, 146 de ganado ovino y 9,725 aves de corral, y no se registraron corrales de crianza, sino que estos se encuentran dispersos por todo el municipio (2,037 Km<sup>2</sup>). En comparación con el estudio de Gutiérrez y colaboradores (2008), donde también se analizaron la calidad de agua través del NMP, ellos

encontraron una relación de la presencia de coliformes con la actividad agropecuaria en un estudio en el municipio de Delicias, Chih., ya que en este municipio se encuentran establecidas 60,064 cabezas de ganado en una extensión total de tierra de 335.40 km<sup>2</sup> (INEGI, 2007). En ese estudio observaron medias de 1,729.99 NMP/100mL para coliformes totales y 814.18 NMP/100mL, valores más pequeños que los calculados en este trabajo, donde cuantificamos medias de 5,742.30 NMP/100mL para coliformes totales y 3,948.25 para coliformes fecales, a pesar de que la cantidad de cabezas de ganado por Km<sup>2</sup> es menor en el área de nuestro estudio, lo que nos permite inferir que la mayor parte de la contaminación proviene de la sobre-población que habita cerca o dentro del PNCB.

*Caracterización Microbiológica:* De los géneros y especies que se encontraron durante la caracterización microbiológica, se encontraron géneros como *Escherichia* que es un indicador de contaminación fecal de agua (Gesche *et al.*, 2003); la presencia de *Shigella* spp., está estrictamente asociada a patógenos humanos y se ha visto asociada con contaminación fecal (Van de Bogaard y Stobberingh, 2000).

Se seleccionó un total de 33 cepas Gram negativas (*gamma-Proteobacteria*) que mostraron diferencias macroscópicas y microscópicas, para identificar las poblaciones de enterobacterias presentes en las cataratas del río Bassaseachic del parque. Los análisis de identificación bioquímica las agruparon en 16 diferentes géneros y especies de las familias Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae, Vibrionáceas y Moraxellaceae (Tabla 27). Los aislamientos seleccionados identificados en el presente estudio se presentan comúnmente en agua en los países en desarrollo donde se han reportado los brotes epidémicos (Ashbolt, 2004; Gesche *et al.*, 2003; Hassan *et al.*, 2014), lo que explica los brotes de diarrea observados entre los habitantes de la cascada Basaseachi, sobre todo los niños. Las enfermedades gastrointestinales se asocian con la mayoría de los patógenos bacterianos encontrados en este estudio, y vinculados con la contaminación de aguas residuales para agua de pozo (tabla 27).

**Tabla 27.** Identificación de los aislamientos bacterianos del muestreo realizado en la Cascada Nacional de Bassaseachic durante el 2013 y referencias internacionales de la misma bacteria encontrada en cuerpos de agua y relacionada con brotes diarreicos.

<b>Familia</b>	<b>Identificación y Referencia<sup>1</sup></b>	<b>ID</b>	<b>Sitio</b>	<b>Estación</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (Chester) Stanier (Agger <i>et al.</i> , 1985)	1	3	Otoño
	<i>Citrobacter freundii</i> Werkman & Gillen (Cabral, 2010; Abbott & Janda, 2011)	2	2,5	Verano- Invierno
	<i>Enterobacter cloacae</i> Jordan/Hormaeche (Cabral, 2010)	3	1,3,6	Otoño- Invierno
	<i>Escherichia coli</i> Escherich (Cabral, 2010)	7	1,6,11,13	Todos
	<i>Hafnia alvei</i> Møller (Abbott & Janda, 2011)	3	1,2,3	Primavera- Verano
	<i>Klebsiella oxytoca</i> Flügge/Lautrop (Cabral, 2010)	4	1,8,10,11	Primavera- Verano
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Uber (Cabral, 2010)	1	11	Verano
	<i>Salmonella</i> spp. (Threlfall, 2002)	1	5	Otoño
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A (Ex Kauffmann & Edwards) Le Minor & Popoff (Cabral, 2010; Threlfall, 2002)	2	1,12	Primavera- Invierno
	<i>Shigella</i> sp. Castellani & Chalmers (Cabral, 2010)	1	13	Primavera
	<i>Tatumella</i> sp. Hollis <i>et al.</i> (Janda & Abbot, 2006)	1	13	Primavera
	<i>Yersinia enterocolitica</i> (Schleifstein & Coleman) (Thompson & Gravel, 1986)	1	10	Primavera
	<i>Pasterurellaceae</i>	<i>Pasteurella multocida</i> Pasteur (Poblete, 2009) <sup>2</sup>	2	4,7
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio cholerae</i> Pacini (Cabral, 2010)	2	11,12	Verano- Otoño
	<i>Vibro parahemolyticus</i> Fujino <i>et al.</i> /Sakazaki <i>et al.</i> (Cabral, 2010)	1	8,11	Verano
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i> Brisou & Prévot (Heéger <i>et al.</i> , 2010)	1	6	Invierno

<sup>1</sup>Referencias de diarrea (incluyendo brotes diarreicos) por las bacterias que se encuentran en este estudio, relacionado con la contaminación de las aguas residuales de agua de pozo.

<sup>2</sup>La infección está vinculado a una exposición de animales infectados, pero en los casos de bacteriemia, el 50% de los pacientes no tuvieron contacto con animales (Poblete, 2009)



El género *Escherichia* identificado, es un indicador de contaminación fecal en agua (Payment & Locas, 2011). *E. coli* es conocida como una bacteria comensal del intestino de humanos y animales vertebrados; hoy en día, los ambientes acuáticos son también un hábitat secundario donde algunas cepas también pueden sobrevivir (Berthe *et al.*, 2013). *E. coli* genera numerosos casos de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo, a través de la ingestión de aguas contaminadas; entre los grupos patogénicos el más peligroso lo representa la *E. coli* entero-hemorrágica (O157:H7) (Michaine, 2003).

Además, la presencia de *Shigella* spp., un patógeno estrictamente humano, también puede estar asociado con la contaminación fecal humana (Van den Bogaard & Stobberingh, 2000). Los patógenos bacterianos se consideran contaminantes del agua (contaminantes biológicos) debido a la escorrentía de las zonas urbanas y agrícolas, las fugas de alcantarillas y sistemas sépticos y derrames de aguas negras (Girones *et al.*, 2010).

La presencia de *Salmonella* sp. en agua y comida es considerada un riesgo en cuestión de salud pública; no es una bacteria común en ambientes acuáticos y es el agente que más frecuentemente causa gastroenteritis, ya que solo son necesarias de 15 a 100 células bacterianas por mililitro (Sidhu y Toze, 2009).

*Yersinia* también se ha visto asociada con contaminación de comida y agua, además de estar relacionado a brotes epidémicos. *Klebsiella* spp., son bacterias nosocomiales oportunistas y solamente *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* son patógenos para humanos; los brotes que se generan en los hospitales son regularmente causados por una nueva cepa de *Klebsiella* sp. con perfil de multiresistencia (Podschun *et al.*, 2001).

Por otra parte también se encontraron bacterias ambientales, tales como *Acinetobacter lwoffii* que es comúnmente aislada de alimentos comprimidos. *Aeromonas hydrophila* causa enfermedades a peces pero en los últimos años se ha visto que es capaz de ser patógeno oportunista, sobre todo en enfermedades gastrointestinales en la diarrea del viajero y gastroenteritis pediátrica (Carriero *et al.*, 2016). *Tatumella* sp. es aislada

regularmente de muestras de suelo (Hollis *et al.*, 1981). Por otra parte *Hafnia alvei* ha sido aislado de mamíferos, aves, reptiles, peces, suelo, agua y también de muestras de aguas residuales, ésta bacteria entérica no es considerada como patógeno para humanos y en muy raros casos se ha presentado como oportunista (Miranda y Zemelman, 2002).

*Perfil de resistencia a antibióticos:* En el perfil de resistencia a antibióticos en la categoría de aminoglucósidos se observó que solamente una cepa (17) presentó resistencia a ampicilina, dos cepas (19 y 22) resistencia intermedia a tobramicina y ampicilina respectivamente y ninguna presentó resistencia a gentamicina. Los aminoglucósidos son ampliamente utilizados en la práctica clínica contra bacilos Gram negativos aerobios; se ha visto en varios estudios que este tipo de antibióticos genera nefrotoxicidad y ototoxicidad por lo que se ha sugerido utilizar mono-dosis, en su mayoría en infecciones en vías urinarias y muchas veces se utilizan en infecciones graves en conjunto con betalactámicos (Pualomino y Pachón, 2003).

Para la categoría de *carbapenems* se observó que ninguna de las cepas presentó resistencia total a estos, mientras que las cepas 8 y 22 presentaron solamente resistencia intermedia, estos resultados concuerdan con lo reportado por Bonfiglio y colaboradores (2002), donde reportan la presencia de enzimas degradadoras de estos antibióticos todavía muy baja. Los carbapenems son antibióticos  $\beta$ -lactámicos con amplio espectro de actividad bactericida, caracterizados por la presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico con un carbono en lugar de un azufre en la posición 4 del anillo tiazolidínico, los carbapenems son reconocidos por ser muy resistentes a las betalactamasas (Birnbaum *et al.*, 1985).

Se ha visto una resistencia natural de *C. freundii*, *E. cloacae* y *Y. enterocolitica* para las *cefalosporinas de primera generación* (Navarro *et al.*, 2010). Sin embargo, las cepas 16, 17, 21, 22 y 31, identificadas como *E. coli*, *K. oxytoca* y *V. cholerae*, también presentaron resistencia a las cefalosporinas de primera generación como la cefazolina y son utilizadas para el tratamiento de infecciones urinarias complicadas e infecciones abdominales, además de ser útiles en la profilaxis en cirugía (histerectomía, cirugía valvular, cirugía cardíaca, cesárea y colicistectomía). La cefuroxima es una

cefalosporina de segunda generación y es muy útil en los tratamientos donde se ve implicado *Haemophilus influenzae* (Maguiña *et al.*, 2006).

En la tabla 22 se observa que las cepas 9, 17, 22 y 33, que corresponden a *C. freundii*, *E. coli*, *K. oxytoca* y *E. cloacae*, presentaron resistencia contra *cefalosporinas de tercera generación* como la cefotaxima, que se utiliza para el tratamiento contra microorganismos Gram positivos y es muy efectiva. La ceftazidima se usa ampliamente contra infecciones causadas por *Pseudomonas spp.* La ceftriaxona ayuda mucho en las infecciones adquiridas en la comunidad, ya que su dosis es única por día y se ha usado en la enfermedad de Lyme y en enfermedades de transmisión sexual. Las cefalosporinas de tercera generación pueden penetrar el líquido cefalorraquídeo y se utilizan ampliamente en el tratamiento de meningitis (Klein y Cunja, 1995).

En el presente estudio solamente la cepa 22 correspondiente a *Klebsiella oxytoca*, presentó resistencia al cefotetan. Las *cefamicinas* como el Cefotetan son parecidas a las cefalosporinas con la diferencia que tienen un grupo metoxi en el ácido 7-aminocefalosporánico, este tipo de antibióticos es utilizado como profilaxis en las operaciones colono-rectal (Itani *et al.*, 2006).

En la tabla 22 se observa que dos de las cepas de *E. coli* (18-19) presentaron resistencia total a las *fluoroquinolonas*, mientras que las cepa de *E. coli* (17) y de *K. oxytoca* (22) presentaron resistencia intermedia. Las fluoroquinolonas son antibióticos sintéticos de amplio espectro, actúan por la inhibición de DNA girasa y topoisomerasa IV. Se utilizan para las infecciones del tracto genito-urinario y funcionan muy bien contra Gram negativos (Leyva y Leyva, 2008).

Las cepas 1, 17, 18 y 19 correspondientes a *A. hydrophyla* (1) y *E. coli* presentaron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol. Las *sulfonamidas* son análogos del ácido *p*-aminobenzóico y su espectro es amplio tanto para Gram-negativos como para Gram-positivos, son bacteriostáticos e interfieren en la formación de ácido fólico,

actuando como inhibidores competitivos del ácido *p*-aminobenzóico (Brugueras y García, 1999).

El Aztreonam es un *monobactámico* derivado del *Chromobacterium violaceum*, es un betalactámico monocíclico, su actividad se parece a la de los aminoglucósidos y es muy activo frente la gonorrea y *H. influenzae*. Es muy bien tolerado por el organismo humano y no genera reacción cruzada en sujetos alérgicos a las penicilinas y cefalosporinas. La mayoría de los microorganismos Gram-positivos anaerobios son resistentes al aztreonam (Bush *et al.*, 1982). En el presente estudio 2 cepas de *E. coli* (16 y 17) y una de *K. oxytoca* (22) presentaron resistencia al aztreonam; mientras que la cepa 9 de *C. freundii* presentó resistencia intermedia.

Las *penicilinas* inhiben selectivamente diferentes pasos en la síntesis del peptidoglicano de casi todas las bacterias excepto los *Mycoplasmas* (Tipper y Strominger, 1965). *Klebsiella*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *Hafnia alvei* y *Yersinia enterocolítica* son cepas que presentan resistencia intrínseca o natural a ampicilina (Navarro *et al.*, 2010). En el presente estudio las cepas de *E. coli* que presentaron perfil de resistencia, mostraron resistencia a por lo menos una de las penicilinas solas o combinadas.

En el presente trabajo la cepa *C. freundii* (9) presentó resistencia a cefepime. En el 2013, Kumar y colaboradores reportaron que *C. freundii* había sido resistente a ticarcilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, gentamicina, tobramicina, mientras que todavía podrían ser considerados como agentes antimicrobianos efectivos cefepime, imipinem y meropenem.

Magiorakos y colaboradores (2012) describieron la clasificación de cepas con patrones de multirresistencia y definieron como cepas multirresistentes (MDR, por sus siglas en inglés) aquellas que presentaran resistencia a por lo menos 1 antibiótico en 3 categorías diferentes (Tabla 22); y extremadamente resistentes (XDR, por sus siglas en

inglés) a todas aquellas cepas que tuvieran resistencia a toda clase de antibióticos. En el presente trabajo se aislaron 5 bacterias MDR (Tabla 22, representadas con un x), 2 de 4 (2/4) aislamientos fueron identificados como *K. oxytoca* (21\* y 22\*), 2/7 *E. coli* (16\*, 17\*), y 1/3 de *E. cloacae* (33\*). Estos patrones de resistencia a muchos antibióticos clave en tratamientos terapéuticos son considerados de riesgo para la salud pública. Se ha visto también que los brotes que se generan en los hospitales son regularmente causados por una nueva cepa de *Klebsiella* sp. con perfil de multirresistencia (Podschun *et al.*, 2001). En un estudio en el río Almendares, Cuba, también se identificaron cepas MDR de la familia *Enterobacteriaceae* (Graham *et al.*, 2011).

La distribución de este tipo de bacterias resistentes del agua de desagüe hacia el ambiente a través del agua podría representar una amenaza para el ambiente natural (Baquero *et al.*, 2008). Una gran variedad de antibióticos activos pueden ser descargados en cantidades considerables en forma de desagüe desde zonas sobrepobladas por humanos. Las bacterias nativas pueden ser expuestas a estos antibióticos, particularmente a aquellos que son más resistentes en este tipo de ambientes tales como las fluoroquinolonas y tetraciclinas ya que son más estables (Larsson, 2014). En los últimos años se ha visto que el incremento en la tasa de microorganismos resistentes es un problema ecológico serio (Threlfall, 2002).

Los resultados del estudio bacteriológico en este estudio demuestran que los patrones de resistencia a antibióticos detectados en los aislamientos de muestras de agua colectadas del PNCB podría ser la razón del control inefectivo de las enfermedades gastrointestinales en dicha localidad.

*Detección de Rotavirus y Norovirus por RT-PCR en tiempo real:* Para la detección de rotavirus mediante PCR en tiempo real primero se utilizó el juego de *primers* CON2 y CON3 los cuales flanquean el gen de la proteína completa de VP8 de RV, con un tamaño esperado de 887 pb. Con este juego de *primers* se observó una calibración ineficiente arriba del 110% (Gunson *et al.*, 2006). De igual forma el valor de la pendiente que fue de -2.84 para este experimento también se encuentra por fuera de

los estándares donde de acuerdo a Ward y colaboradores (2013). A pesar de que la curva de disociación informó que los productos obtenidos corresponden con los esperados, debido a la calibración ineficiente se decidió utilizar otro juego de primers con un amplicon de menor talla molecular.

*Detección de Rotavirus (CON3-IT1). Pool de muestras:* Con los juegos de primers Con3-IT1, se obtuvo una eficiencia del 99.6% y un valor de la pendiente de -3.33, lo que nos permitió identificar copias virales de rotavirus durante la primavera y el verano, esto concuerda con lo reportado por Grassi *et al.* (2010), donde también reportan la presencia de RV en aguas superficiales en Otranto, Italia, particularmente durante la primavera. Las muestras positivas a RV se enviaron a secuenciar para corroborar su identificación. El árbol filogenético que se muestra en la figura 31, muestra que las muestras positivas son idénticas entre sí y corresponden al genotipo P[8] de rotavirus; este genotipo es el usado comúnmente para formular las vacunas (Chieochansin, 2016).

*Detección de Norovirus (JV12 y JV13). Pool de muestras:* Para la detección de Norovirus se obtuvo una eficiencia del 103.7% y un valor de la pendiente de -3.23, lo que nos permitió detectar Norovirus en muestras de verano y otoño. Estos datos concuerdan con los reportados por Cheng y colaboradores en el 2012, donde encontró Norovirus en el 75% de sus muestras durante el verano en agua proveniente de una planta tratadora en Irlanda.

En el presente trabajo no se logró la detección de norovirus durante el invierno. Esto difiere con lo reportado con Kitajima y colaboradores en el 2009 donde la detección de norovirus en agua fue durante el invierno en agua de río en Japón. Cheng y colaboradores en el 2012 concuerdan con Kitajima, encontrando Norovirus en el 100% de sus muestras durante el invierno. Estos datos se correlacionan con los picos de incidencia de Norovirus durante la temporada invernal (La Rosa, 2010).

Los resultados del presente trabajo demuestran que en la actualidad es posible encontrar Norovirus durante el verano, ya que se ha observado que tiene un periodo de

sobrevivencia debido a factores como humedad y temperatura que propician un ambiente idóneo para que el virus persista por más tiempo (Rohayem *et al.*, 2009).

En cuanto a la genotipificación se encontró mediante análisis de secuenciación que las muestras encontradas durante el verano y el otoño son idénticas entre sí y corresponden a NV del genogrupo tipo II. Este genogrupo, distribuido en todo el mundo, está asociado directamente con brotes epidémicos (Fongaro *et al.*, 2015; Kitajima *et al.*, 2009).

En cuanto a la carga viral observada por temporada, se considera peligro para la salud pública debido a que solo se necesitan de 100 viriones para infectar a un individuo sano. Por lo que es necesario que los pobladores de la zona tomen medidas de desinfección e higiene en el consumo de agua y alimentos, además de dar mantenimiento a sus letrinas (CDC, 2014).

## CONCLUSIONES

---

1. El estudio poblacional realizado demostró que más del 40% del total de las viviendas en las principales zonas rurales cerca o dentro del PNCB no cuentan con servicio de drenaje, siendo las que generan la mayor contaminación a los afluentes del mismo.
2. Análisis fisicoquímicos de las muestras de agua mostraron que se vio afectada la alcalinidad durante el verano del 2013, pero los valores de otros parámetros además de composición iónica y metales pesados se encuentran dentro de los valores de norma oficial.
3. El análisis de las muestras de agua reveló un aumento considerable de coliformes totales durante el verano o sequía, mientras que los valores más altos de coliformes fecales se detectaron en otoño del 2013, especialmente en aquellas colectadas de sitios cercanos a poblaciones rurales con el mayor número de habitantes.
4. A partir de las muestras de agua que excedieron las normas mexicanas del NMP para coliformes fecales se aislaron 33 microorganismos de 16 géneros y especies diferentes asociados a enterobacterias patógenas para humanos, además de cepas nativas de ambientes acuáticos.
5. El perfil de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas, demostró que 5/33 cepas presentaron multirresistencia a por lo menos un antibiótico en más de tres categorías, esto se reporta como riesgo en cuestión de salud pública. De estos aislados se observaron cepas como *Hafnia alvei* y *Tatumella sp.* con resistencia a cefuroxima, ampicilina y ampicilina-sulbactam, por lo que se concluye que esto podría en un futuro representar riesgo en salud pública.
6. En aguas naturales del PNCB se detectó Rotavirus durante la primavera y una co-infección con Norovirus durante el verano. Norovirus también fue identificado durante el otoño del 2013.
7. Se probó la efectividad del prototipo de uso casero para generación de cloro por electrolisis a base de sal de mesa y prototipo de membranas de ultrafiltración que actualmente podrían ser consideradas como nuevas opciones económicas para potabilizar agua en zonas rurales.



## **PERSPECTIVAS**

---

Es importante avanzar en el conocimiento científico de los consorcios microbianos naturales para impulsar su aplicación potencial al saneamiento y abasto de agua para consumo humano y uso doméstico, con un aprovechamiento sustentable de los recursos naturales en zonas rurales para fortalecer los esquemas de manejo de ecosistemas y su biodiversidad para su salud y el mantenimiento de las poblaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abbott**, S.L., Janda, J.M. (2011). Revisiting bacterial gastroenteritis: Issues, possible approaches, and an ever-expanding list of etiologic agents, Part II. *Clin. Microbiol. Newsletter*. 33, 79–86, doi:10.1016/j.clinmicnews.2011.05.001.
- Agger**, W.A., McCormick, J.D., Gurwith, M.J. (1985). Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 21, 909–913.
- Al-Bayatti**, K.K., Al-Arajy, K.H., Al-Nuaemy, S.H. (2012). Bacteriological and physicochemical studies on Tigris River near the water purification stations within Baghdad Province. *Journal of environmental and public health*, 2012. doi:10.1155/2012/695253
- Albinana-Gimenez**, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J.M., Courtois, S., Girones, R. (2009). Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *Journal of Virological Methods*, 158(1), 104-109. doi:10.1016/j.jviromet.2009.02.004.
- Amdiouni**, H., Maunula, L., Hajjami, K., Faouzi, A., Soukri, A., Nourlil, J. (2012). Recovery comparison of two virus concentration methods from wastewater using cell culture and real-time PCR. *Current Microbiology*, 65(4), 432-437. doi:10.1007/s00284-012-0174-8.
- American Public Health Association, & American Water Works Association (APHA)**. (1981). Standard methods for the examination of water and wastewater: selected analytical methods approved and cited by the United States Environmental Protection Agency. *American Public Health Association*. 17th edition. <http://hdl.handle.net/1969.3/24401>
- Angulo**, F.J., Tippen, S., Sharp, D.J., Payne, B.J., Collier, C., Hill, J.E. ... Swerdlow, D.L. (1997). A community waterborne outbreak of salmonellosis and the effectiveness of a boil water order. *American Journal of Public Health*, 87(4), 580-584. doi:10.2105/AJPH.87.4.580.
- Arboleda**, J. (2000). Teoría y práctica de la purificación del agua. McGraw-Hill.

- Arnold, M.M., Sen, A., Greenberg, H.B., Patton, J.T. (2013).** The battle between rotavirus and its host for control of the interferon signaling pathway. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003064. doi:10.1371/journal.ppat.1003064.
- Ashbolt, N. J. (2004).** Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, 198(1), 229-238. doi:10.1016/j.tox.2004.01.030.
- Baquero, F., Martínez, J.L., Cantón, R. (2008).** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 19, 260-265. doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006.
- Becerra, N., Botello A. (1995).** Bacterias coliformes totales, fecales y patógenas en sistema lagunar Chantuto Panzacola, Chiapas, México. *Hidrobiológica*. 5(1-2), 87-94. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57850207>
- Bergeisen, G.H., Hinds, M.W., Skaggs, J.W. (1985).** A waterborne outbreak of hepatitis A in Meade County, Kentucky. *American Journal of Public Health*, 75(2), 161-164. doi:10.2105/ajph.75.2.161.
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., Petit, F. (2013).** Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4684-4693. doi.org/10.1128/aem.00698-13.
- Birnbaum, J., Kahan, F.M., Kropp, H., Macdonald, J.S. (1985).** Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: discovery and development of imipenem/cilastatin. *The American Journal of Medicine*, 78(6), 3-21. doi:10.1517/13543784.11.4.529.
- Bonfiglio, G., Russo, G., Nicoletti, G. (2002).** Recent developments in carbapenems. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11(4), 529-544. doi:10.1517/13543784.11.4.529.
- Borroto, R.J. (1998).** Supervivencia de *Vibrio cholerae* O1 en agua dulce superficial y cólera endémico: una hipótesis geocológica. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 4(6). doi.org/10.1590/S1020-49891998001200001.

- Bosch, A.** (1998). Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *International Microbiology*, 1(3), 191-196. <http://revistes.iec.cat/index.php/IM/article/viewFile/39/38>
- Bosch, A., Lucena, F., Diez, J.M., Gajardo, R., Blasi, M., Jofre, J.** (1991). Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *American Water Works Association*, 83(3), 80-83. <http://www.jstor.org/stable/41293174>
- Bounty, S., Rodriguez, R.A., Linden, K.G.** (2012). Inactivation of adenovirus using low-dose UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation. *Water Research*, 46(19), 6273-6278. doi:10.1016/j.watres.2012.08.036.
- Brooks, K.N., Ffolliott, P. F., Magner, J.A.** (2012). *Hydrology and the Management of Watersheds*. John Wiley & Sons.
- Brugueras, M.C., García, M.M.** (1999). Antibacterianos de acción sistémica. Parte III. Sulfonamidas y tetraciclinas. *Revista Cubana de Medicina General e Integral*, 15(2), 156-67. [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol15\\_2\\_99/mgi08299.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol15_2_99/mgi08299.htm)
- Bush, K., Freudenberg, J.S., Sykes, R.B.** (1982). Interaction of azthreonam and related monobactams with beta-lactamases from Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(3), 414-420. doi:10.1128/AAC.22.3.414.
- Cabral, J.P.** (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 3657–3703, doi:10.3390/ijerph7103657.
- Calgua, B., Fumian, T., Rusinol, M., Rodriguez-Manzano, J., Mbayed, V.A., Bofill-Mas, S., ... Girones, R.** (2013). Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Research*, 47(8), 2797-2810. doi:10.1016/j.watres.2013.02.043.
- Carriero, M.M., Mendes-Maia, A.A., Moro-Sousa, R. L., Henrique-Silva, F.** (2016). Characterization of a new strain of *Aeromonas dhakensis* isolated from diseased pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*) in Brazil. *Journal of fish diseases*. doi:10.1111/jfd.12457.

- CDC** Data & Statistics Feature: Surveillance for Norovirus Outbreaks.(2014)  
<http://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks.html>. revisado 10 de Diciembre de 2015.
- Cheng, H. W. A.,** Lucy, F. E., Broaders, M. A., Mastitsky, S. E., Chen, C. H., & Murray, A. (2012). Municipal wastewater treatment plants as pathogen removal systems and as a contamination source of noroviruses and *Enterococcus faecalis*. *Journal of water and health*, *10*(3), 380-389. doi: 10.2166/wh.2012.138
- Chieochansin, T.,** Vutithanachot, V., Phumpholsup, T., Posuwan, N., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y. (2016). The prevalence and genotype diversity of Human Rotavirus A circulating in Thailand, 2011–2014. *Infection, Genetics and Evolution*, *37*, 129-136. doi:10.1016/j.meegid.2015.11.011.
- Contreras, J.F.,** Menchaca, G.E., Infante, R., Hernandez, C.E., Rodriguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R.S. (2010). Evidence of conserved epitopes in variable region of VP8x subunit of VP4 protein of rotaviruses of P [8]-1 and P [8]-3 lineages. *Acta Virologica*, *55*(3), 273-278. doi:10.4149/av\_2011\_03\_265
- Cortés-Lara, M.** (2003). Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la Franja Litoral de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. *Revista de Biomedicina*, *14*, 121-123.  
<http://www.uady.mx/~biomedic/rb031429.pdf>
- Davino, A.M.,** Melo, M.B., Caffaro-Filho, R.A. (2015). Assessing the sources of high fecal coliform levels at an urban tropical beach. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*, 1019-1026. doi:10.1590/S1517-838246420140466.
- Di Pasquale, S.,** Paniconi M., De Medici D., Suffredini E., Croci L. (2010). Duplex real time PCR for the detection of hepatitis A virus in shellfish using Feline Calicivirus as a process control. *Journal of Virological Methods*. *163*(1), 96-100. doi:10.1016/j.jviromet.2009.09.003
- Diario** Oficial de la Federación. (1993). Norma oficial mexicana NOM-042-SSA1-1993, bienes y servicios. Hielo potable y hielo purificado. Especificaciones sanitarias. México, D. F.

- Diario** Oficial de la Federación. (1994a). NOM-092-SSA1-1994, Método para la cuenta de organismos mesofílicos aerobios. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- Diario** Oficial de la Federación. (1994b). NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número más Probable. DV 14(19). Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- Diario** Oficial de la Federación. (1994c). NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. pp 108-112. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- Diario** Oficial de la Federación. (1997). Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas en aguas y bienes nacionales. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- Diario** Oficial de la Federación. (2000). NMX-AA-093-SCFI-2000. Análisis de agua - determinación de la conductividad electrolítica - método de prueba (cancela a la NMX-AA-093-1984). México D.F.
- Diario** Oficial de la Federación. (2001a). NMX-AA-036-SCFI-2001, Análisis de agua - determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F. 52 pp.
- Diario** Oficial de la Federación. (2001b). NMX-AA-072-SCFI-2001, Análisis de agua - determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- Diario** Oficial de la Federación. (2001c). NMX-AA-073-SCFI-2001, Análisis de agua - determinación de cloruros totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
- Diario** Oficial de la Federación. (2005). Proyecto PROY-NMX-AA-042-SCFI-2005. Calidad del agua.-determinación del número más Probable (NMP) de coliformes

totales, coliformes Fecales (termotolerantes) y *Escherichia Coli* Presuntiva (cancelará a la NMX-AA-042-1987). México, D. F.

**Diario** Oficial de la Federación. (2006). Norma Oficial mexicana. NMX-AA-124-SCFI-2006. Potabilización del agua para uso y consumo humano – hipocloritos de sodio y calcio – especificaciones y métodos de prueba. México, D. F.

**Diario** Oficial de la Federación. (2008). Norma Oficial mexicana NOM-244-SSA1-2008, equipos y sustancias germicidas para tratamiento domestico de agua. Requisitos sanitarios. México, D. F.

**Diario** Oficial de la Federación. (2011). NMX-AA-008-SCFI-2011. Análisis de agua - determinación del pH - método de prueba- (cancela a la NMX-AA-008- SCFI-2000). México D.F.

**Diario** Oficial de la Federación. (2014). Proyecto de norma oficial mexicana PROY NOM-250-SSA1-2014, agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua y requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados, su control y vigilancia. Procedimiento sanitario de muestreo. México, D. F.

**Donato**, C., Hoa, N.T., Hoa, T.M., Ngan, T.T.D., Van Kinh, N., Trung, N.V., Vijaykrishna, D. (2016). Genetic characterization of Enterovirus 71 strains circulating in Vietnam in 2012. *Virology*, 495, 1-9. doi:10.1016/j.virol.2016.04.026.

**Dorador**, C., Pardo, R., Vila, I. (2003). Variaciones temporales de parámetros físicos, químicos y biológicos de un lago de altura: el caso del lago Chungará. *Revista Chilena de Historia Natural*, 76(1), 15-22. doi.org/10.4067/S0716-078X2003000100002.

**Dorak**, M. T. (Ed.). (2007). *Real-time PCR*. Taylor & Francis.

**Escartin**, E.F., Lozano, J.S., Garcia, O.R., Cliver, D.O. (2002). Potential *Salmonella* transmission from ornamental fountains. *Journal of Environmental Health*, 65(4), 9. 2a6e0c2bea70fbc3fa31962084131e.pdf

**Espinosa**, A.C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., Arias, C.F. (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in

- groundwater and surface water. *Water Research*, 42(10), 2618-2628. doi:10.1016/j.watres.2008.01.018
- Fisher**, M.B., Iriarte, M., Nelson, K.L. (2012). Solar water disinfection (SODIS) of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., and MS2 coliphage: effects of additives and alternative container materials. *Water Research*, 46(6), 1745-1754. doi:10.1016/j.watres.2011.12.048.
- Fongaro**, G., Padilha, J., Schissi, C.D., Nascimento, M.A., Bampi, G.B., Viancelli, A., Barardi, C.R.M. (2015). Human and animal enteric virus in groundwater from deep wells, and recreational and network water. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 20060-20066. doi:10.1007/s11356-015-5196-x.
- Fraga**, F. (1976). Fotosíntesis en la Ría de Vigo. *Instituto de investigaciones pequeras*. <http://www.icm.csic.es/scimar/index.php/secId/8/IdArt/1877/>
- García-Gámez**, C., Gortáres P., Drogui P. (2011). Tratamientos biológicos y de oxidación avanzada combinados para una solución a la biotecnología ambiental. *CONCYTEG*. 6(71), 585-605.
- Geldreich**, E.E. (1997). Amenaza mundial de los agentes patógenos transmitidos por el agua. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental (Buenos Aires)*, 30, 44-57.
- Gentsch**, J.R., Glass, R. I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J., ... Bhan, M.K. (1992). Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(6), 1365-1373.
- Gesche**, E., Vallejos, A., Sáez, M. (2003). Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 35(1), 99-107. doi:10.4067/S0301-732X2003000100011.
- Girones**, R., Ferrus, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., ... Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44(15), 4325-4339. doi:10.1016/j.watres.2010.0630.
- Gopinath**, S., Carden, S., Monack, D. (2012). Shedding light on *Salmonella* carriers. *Trends in Microbiology*, 20(7), 320-327. doi:10.1016/j.tim.2012.04.004.



- Gouvea, V.,** Glass, R. I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H. F., Forrester, B., Fang, Z. Y. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of clinical microbiology*, 28(2), 276-282.
- Goyal, S.M.,** Gerba, C.P. (1983). Viradel method for detection of rota virus from seawater. *Journal of virological methods*, 7(5), 279-285. doi:10.1016/0166-0934(83)90080-0
- Graham, D.W.,** Olivares-Rieumont, S., Knapp, C.W., Lima, L., Werner, D., Bowen, E. (2011). Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares River near Havana, Cuba. *Environmental Science and Technology*. 45, 418–424. doi:10.3389/fmicb.2012.00396.
- Grassi, T.,** Bagordo, F., Idolo, A., Lugoli, F., Gabutti, G., De Donno, A. (2010). Rotavirus detection in environmental water samples by tangential flow ultrafiltration and RT-nested PCR. *Environmental Monitoring and Assessment*, 164(1-4), 199-205. doi:10.1007/s10661-009-0885-x.
- Greenberg, H. B., & Estes, M. K.** (2009). Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*, 136(6), 1939-1951. doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.076
- Gruber, J.S.,** Reygadas, F., Arnold, B.F., Ray, I., Nelson, K., Colford, J.M. (2013). A stepped wedge, cluster-randomized trial of a household UV-disinfection and safe storage drinking water intervention in rural Baja California Sur, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(2), 238-245. doi:10.4269/ajtmh.13-0017.
- Gunson, R.N.,** Collins, T.C., Carman, W.F. (2006). Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *Journal of Clinical Virology*, 35(4), 355-367. doi.org/10.1016/j.jcv.2005.12.006.
- Gutiérrez, L. R.,** Quintana, R., Rubio, H., Ortega, J., Pinedo, C. (2008). Índice de calidad del agua en la cuenca baja del Río San Pedro, Chihuahua, México. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 4(2), 108-115.
- Hassan, K.E.,** Mansour, A., Shaheen, H., Amine, M., Riddle, M.S., Young, S.Y., Sebeny, P., Levin, S. (2014). The impact of household hygiene on the risk of

- bacterial diarrhea among Egyptian children in rural areas, 2004–2007. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8, 1541-1551. doi:10.3855/JIDC.4539.
- Heéger**, Z., Vargha, M., Márialigeti, K. (2010). Detection of potentially pathogenic bacteria in the drinking water distribution system of a hospital in Hungary. *Clinical Microbiology Infections*, 16, 89–92, doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02795.x.
- Hernández**, N., Ríos, R. (2002). Evaluation of coliphages and fecal coliforms densities on the principal canal of the irrigation system in the southwestern of Puerto Rico. FEMISCA. *Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. pp. 1-6. [www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico26/vii-011.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico26/vii-011.pdf)
- Herring**, A.J., Inglis, N. F., Ojeh, C.K., Snodgrass, D.A., Menzies, J.D. (1982). Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(3), 473-477.
- Hollis**, D.G., Hickman, F.W., Fanning, G.R., Farmer, J.J., Weaver, R.E., Brenner, D.J. (1981). *Tatumella ptyseos* gen. nov., sp. nov., a member of the family Enterobacteriaceae found in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(1), 79-88. <http://jcm.asm.org/content/14/1/79.full.pdf+html>
- Hörman**, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Torvela, N., Heikinheimo, A., Hänninen, M.L. (2004). *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 87-95. doi:10.1128/AEM.70.1.87-95.2004.
- Horton**, R.E. (1945). Erosional development of streams and their drainage basins; hydrophysical approach to quantitative morphology. *Geological Society of America Bulletin*, 56(3), 275-370. doi:10.1130/0016-7606(1945)56[275:edosat]2.0.co;2.
- Ikner**, L.A., Gerba, C.P., Bright, K.R. (2012). Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food and Environmental Virology*, 4(2), 41-67. doi:10.1007/s12560-012-9080-2.

- Itani**, K.M., Wilson, S.E., Awad, S.S., Jensen, E.H., Finn, T.S., Abramson, M.A. (2006). Ertapenem versus cefotetan prophylaxis in elective colorectal surgery. *New England Journal of Medicine*, 355(25), 2640-2651. doi:10.1056/nejmoa054408.
- Janda**, J.M., Abbot, S.L. (2006). Uncommon enterobacterial genera associated with clinical specimens. In *The Enterobacteria*, 2nd ed.; American Society Microbiology: Washington, DC, USA, pp. 357–375.
- Kitajima**, M., Haramoto, E., Phanuwat, C., Katayama, H., & Ohgaki, S. (2009). Detection of genogroup IV norovirus in wastewater and river water in Japan. *Letters in applied microbiology*, 49(5), 655-658. doi: 10.1111/j.1472-765x.2009.02718.x
- Klein**, N.C., Cunha, B.A. (1995). Third-generation cephalosporins. *The Medical Clinics of North America*, 79(4), 705-719. PMID:7791418.
- Kottaridi**, C., Spathis, A. T., Ntova, C. K., Papaevangelou, V., Karakitsos, P. (2012). Evaluation of a multiplex real time reverse transcription PCR assay for the detection and quantitation of the most common human rotavirus genotypes. *Journal of virological methods*, 180(1), 49-53. doi:10.1016/j.jviromet.2011.12.009
- Kovač**, K., Gutiérrez-Aguirre, I., Banjac, M., Peterka, M., Poljšak-Prijatelj, M., Ravnikar, M., ... Raspor, P. (2009). A novel method for concentrating hepatitis A virus and Caliciviruses from bottled water. *Journal of Virological Methods*, 162(1), 272-275. doi:10.1016/j.jviromet.2009.07.013.
- Kumar**, P., Ghosh, S., Rath, D., Gadpayle, A.K. (2013). Multidrug resistant *Citrobacter*: an unusual cause of liver abscess. *BMJ Case Reports*, doi:10.1136/bcr-2013-008714.
- La Rosa**, G., Fratini, M., della Libera, S., Iaconelli, M., Muscillo, M. (2012). Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 48(4), 397-406. doi.org/10.4415/ann\_12\_04\_07.
- Larsson**, D.G. (2014). Antibiotics in the environment. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119, 108-112. doi:10.3109/03009734.2014.896438.

- Lewis, G.D., Metcalf, T.G.** (1988). Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), 1983-1988. <http://aem.asm.org/content/54/8/1983.full.pdf+html>
- Leyva, S., Leyva, E.** (2008). Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Boletín de la Sociedad de Química de México*. 2(1), 1-13. [http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401543/Alistamiento\\_quimica\\_agricola\\_2015-II/Alistamiento\\_2015-2\\_archivos/Leyva\\_2008.pdf](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/401543/Alistamiento_quimica_agricola_2015-II/Alistamiento_2015-2_archivos/Leyva_2008.pdf)
- Liga, M.V., Maguire-Boyle, S.J., Jafry, H.R., Barron, A.R., Li, Q.** (2013). Silica decorated TiO<sub>2</sub> for virus inactivation in drinking water—simple synthesis method and mechanisms of enhanced inactivation kinetics. *Environmental Science & Technology*, 47(12), 6463-6470. doi:10.1021/es400196p.
- Logan, C., O’Leary, J.J., O’Sullivan, N.** (2007). Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *Journal of Virological Methods*, 146(1), 36-44. doi:10.1016/j.jviromet.2007.05.031.
- Lopes, A. C. S., Rodrigues, J. F., Cabral, A. B., da Silva, M. E., Leal, N. C., da Silveira, V. M., de Moraes Júnior, M. A.** (2016). Occurrence and analysis of irp2 virulence gene in isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. from microbiota and hospital and community-acquired infections. *Microbial Pathogenesis*. doi:org/10.1016/j.micpath.2016.04.018
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., ... Monnet, D.L.** (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug -resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18, 268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Maguiña, C., Ugarte, C.A., Montiel, M.** (2006). Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Médica Peruana*, 23(1), 15-20. <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n1/a04v23n1.pdf>

- Manso**, C.F., Romalde, J.L. (2013). Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in mussels from Galicia (NW Spain). *Food and Environmental Virology*, 5(2), 110-118. doi:10.1007/s12560-013-9108-2.
- Mardaneh**, J., Dallal, M.M.S., Taheripoor, M., Rajabi, Z. (2014). Isolation, identification and antimicrobial susceptibility pattern of *Tatumella ptyseos* strains isolated from powdered infant formula milk consumed in neonatal intensive care unit: First report from Iran. *Jundishapur journal of microbiology*, 7(6).
- Martin**, P.S. (1998). Gentry's Rio Mayo Plants: The Tropical Deciduous Forest & Environs of Northwest Mexico. Martin, P.S. (Ed.), University of Arizona Press. ISBN: 0816517266
- Mäusezahl**, D., Christen, A., Pacheco, G.D., Tellez, F.A., Iriarte, M., Zapata, M.E., ... Smith, T.A. (2009). Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhea in rural Bolivia: a cluster-randomized, controlled trial. *PLoS Medicine*, 6(8), e1000125. doi.org/10.1371/journal.pmed.1000125.
- Meleg**, E., Bányai, K., Martella, V., Jiang, B., Kocsis, B., Kisfali, P. Szűcs, G. (2008). Detection and quantification of group C rotaviruses in communal sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3394-3399. doi: 10.1128/AEM.02895-07.
- Michaine**, S. (2003). *Escherichia coli* O157:H7: La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. *Énfasis Alimentos, Ganados & Carnes. Buenos Aires*, 3, 40-42. <http://bpmyhaccp.com.ar/publicaciones/3.%20Escherichia%20coli.pdf>
- Miranda**, C.D., Zemelman, R. (2002). Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Science of the Total Environment*, 293(1), 207-218. doi:10.1016/S0048-9697(02)00022-0.
- Montero**, J.G. (2004). Tratamiento antibiótico de las infecciones graves por *Acinetobacter* spp. <http://remi.uninet.edu/sepsis/curso.htm>
- Navarro**, F., Miró, E., Mirelis, B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(9), 638-645. doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.002.
- Nicoletti**, V.G., Condorelli, D.F. (1993). Optimized PEG method for rapid plasmid DNA purification: high yield from "midi-prep". *BioTechniques*, 14(4), 532.

- OMS**, Organización Mundial de la Salud (). (1979). Virus Humanos en el Agua, Aguas Servidas y Suelo. Ginebra, *Informe Técnico* 639. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41300/1/WHO\\_TRS\\_639\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/41300/1/WHO_TRS_639_spa.pdf)
- OMS**, Organización Mundial de la Salud. (2015). 2,4 mil millones de personas carecen de acceso a saneamiento. Centro de prensa Organización mundial de la salud. Ginebra Suiza. Comunicado de prensa conjunto OMS/UNICEF. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/jmp-report/es/>
- Ongley**, E.D. (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos (No. 55). *Food & Agriculture Organization*, Roma, Italia.
- Posada**, G., José, A., Roldán, P., Ramírez, R., & John, J. (2000). Caracterización fisicoquímica y biológica de la calidad de aguas de la cuenca de la quebrada Piedras Blancas, Antioquia, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 48(1), 59-70. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442000000100008](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442000000100008)
- Pérez-Castillo**, A.G., Rodríguez, A. (2008). Índice fisicoquímico de la calidad de agua para el manejo de lagunas tropicales de inundación. *Revista de Biología Tropical*, 56(4), 1905-1918. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v56i4.5769>
- Payment**, P., Locas, A. (2011). Pathogens in water: Value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water* 49, 4–11, doi:10.1111/J.1745-6584.2010.00710.X.
- Podschn**, R., Pietsch, S., Höller, C., Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3325-3327. doi:10.1128/AEM.67.7.3325-3327.2001.
- Podschn**, R., Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603. <http://cmr.asm.org/content/11/4/589.full.pdf+html>
- Poblete**, J. (2009). *Pasteurella multocida* bacteremia: Concern remains even in the absence of direct animal contact. *Infections Disease Clinical Practices*, 17, 77, doi:10.1097/IPC.0b013e3181a02d62.

- Pualomino, J., Pachón, J. (2003).** Aminoglucósidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(2), 105-115. doi:10.1016/S0213-005X(03)72893-6
- Ramakrishna, B. (1997).** Estrategias de extensión para el manejo integrado de cuencas hidrográficas: conceptos y experiencias en San José, CR. IICA-GTZ. *Serie Investigación y Educación en Desarrollo Sostenible*. 338 p.
- Rees, G., Kay D., Domingo S. (2009).** Management of shellfish harvesting waters for public health protection. *WHO emerging issues in water & Infectious diseases series*. Published jointly by International Water.
- Rivera, N.R., Encina, F., Muñoz-Pedreras, A., Mejias, P. (2004).** La calidad de las aguas en los ríos Cautín e Imperial, IX Región-Chile. *Información Tecnológica*, 15(5), 89-101. doi.org/10.4067/S0718-07642004000500013
- Rohayem, J. (2009).** Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(6), 524-527. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02846.x
- Sahoo, P.K., Swaminathan, T.R., Abraham, T.J., Kumar, R., Pattanayak, S., Mohapatra, A., ... Pradhan, P.K. (2016).** Detection of goldfish haematopoietic necrosis herpes virus (Cyprinid herpesvirus 2) with multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish: First evidence of any viral disease outbreak in ornamental freshwater aquaculture farms in India. *Acta Tropica*. doi:10.1016/j.actatropica.2016.05.004
- Schroeder, G.N., Hilbi, H. (2008).** Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1), 134-156. doi:10.1128/CMR.00032-07.
- Scipioni, A., Mauroy, A., Ziant, D., Saegerman, C., Thiry, E. (2008).** A SYBR Green RT-PCR assay in single tube to detect human and bovine noroviruses and control for inhibition. *Virology journal*, 5(1), 1. doi: 10.1186/1743-422X-5-94
- Shyamala, R., Shanthi M., Lalitha P. (2008).** Physicochemical analysis of Borewell water samples of Telungupalayam area in Coimbatore district, Tamilnadu, India. *E-Journal of Chemistry*. 5(4), 924-929. file:///C:/Users/LABGEN/Downloads/152383%20(1).pdf

- Sidhu, J.P., Toze, S.G. (2009).** Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environment International* 35, 187-201. doi: 10.1016/j.envint.2008.07.006.
- Simms, D., Cizdziel, P. E., Chomczynski, P. (1993).** TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 15(4), 532-535.
- Sinton, L.W., Finlay, R.K., Hannah, D.J. (1998).** Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32(2), 323-348. doi:pdf/10.1080/00288330.1998.9516828
- Soto, A. (2011).** Tesis diseño e implementación de una metodología para la captación y detección molecular de Rotavirus en muestras de agua. Pp. 41-43. Falta información
- Steyer, A., Torkar, K.G., Gutiérrez-Aguirre, I., Poljšak-Prijatelj, M. (2011).** High prevalence of enteric viruses in untreated individual drinking water sources and surface water in Slovenia. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 392–398. doi:10.1016/j.ijheh.2011.05.006.
- Strahler, A.N. (1957).** Quantitative analysis of watershed geomorphology. *Transactions of the American Geophysical Union*. 38(6), 913–920. doi: 10.1029/TR038i006p00913.
- Thompson, J.S., Gravel, M.J. (1986).** Family outbreak of gastroenteritis due to *Yersinia enterocolitica* serotype 0: 3 from well water. *Canadian Journal of Microbiology*, 32, 700–701, doi:10.1139/m86-127.
- Thorven, M., Grahn, A., Hedlund, K. O., Johansson, H., Wahlfrid, C., Larson, G., Svensson, L. (2005).** A homozygous nonsense mutation (428G→ A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. *Journal of virology*, 79(24), 15351-15355. doi: 10.1128/JVI.79.24.15351-15355.2005
- Threlfall, E.J. (2002).** Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 141-148. doi: 10.1111/j.15746976.2002.tb00606.x.
- Tipper, D.J., Strominger, J.L. (1965).** Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of*



*the National Academy of Sciences*, 54(4), 1133-1141.  
<http://www.pnas.org/content/54/4/1133.short>

- Toledo**, A. (2002). El agua en México y el Mundo. *Gaceta Ecológica*, (64), 9-18. A Toledo - Gaceta Ecológica, 2002 - dialnet.unirioja.es
- Van den Bogaard**, A.E., Stobberingh, E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 327-335. doi:10.1016/S0924-8579(00)00145-X.
- Vecchia**, A., Fleck J., Comerlato J., Kluge M., Bergamaschi B., Da Silva J., Da Luz, Teixeira T., ... Spilki, F. (2012). First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque Teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 72(2), 323-329. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842012000200013>
- Wang**, D., Xu X., Deng X., Chen C., Li B., Tan H., Wang H., Tang S., Qiu H., ... Kan B. (2010). Detection of *Vibrio cholera* O1 and O139 in environmental water samples by an immunofluorescent-aggregation assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), 87-95. doi:10.1128/AEM.02559-09.
- Ward**, P., Poitras, E., Leblanc, D., Gagnon, C. A., Brassard, J., Houde, A. (2013). Comparison of different RT-qPCR assays for the detection of human and bovine group A rotaviruses and characterization by sequences analysis of genes encoding VP4 and VP7 capsid proteins. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1435-1448. doi:10.1111/jam.12165.
- Werber**, D., Krause G., Frank C., Fruth A., Flieger A., Mielke M., Schaade L., Stark K. (2012). Outbreaks of virulent diarrheagenic *Escherichia coli* - are we in control?. *Biomed Central*. 10(11). doi:10.1186/1741-7015-10-11.
- Xue**, B., Jin M., Yang D., Guo X., Chen Z., Shen Z., Wang X., Qiu Z., Wang J., Zhang B., Li J. (2013). Effects of chlorine and chlorine dioxide on human rotavirus infectivity and genome stability. *Water Research*. 47(10), 3329-3338. doi:10.1016/j.watres.2013.03.025.
- Yang**, R., Ryan, U., Gardner, G., Carmichael, I., Campbell, A. J. D., Jacobson, C. (2016). Prevalence, faecal shedding and genetic characterisation of *Yersinia* spp.

in sheep across four states of Australia. *Australian Veterinary Journal*, 94(5), 129-137. doi: 10.1111/avj.12428

**Yin, J.L.**, Shackel, N.A., Zekry, A., McGuinness, P.H., Richards, C., Van Der Putten, K., ... Bishop, G.A. (2001). Real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT–PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunology and Cell Biology*, 79(3), 213-221. doi:10.1046/j.1440-1711.2001.01002.x

**Zhang, Y.**, Riley L., Lin M., Purdy G., Hu Z. (2013). Development of a virus concentration method using lanthanum-based chemical flocculation coupled with modified membrane filtration procedures. *Journal of Virological Methods*. 190(1-2), 1-8. doi:10.1016/j.jviromet.2013.03.017.

## APÉNDICE

---

### *APÉNDICE I: Preparación de soluciones*

**Buffer de corrimiento TBE 10X:** Pesar en una balanza 60.5 g de Tris-base, disolver el soluto anterior en 500 mL de agua destilada en agitación constante. Adicionar 30.5 g de ácido bórico, una vez disuelto, agregar 20 mL de EDTA 0.5M pH 7.9 posteriormente se afora la solución a 1,000 mL con agua destilada. Por último se esteriliza y se almacena a temperatura ambiente.

**Buffer de corrimiento TBE 1X:** Colocar 30 mL de buffer corrimiento TBE 10X en una probeta de 500 mL y aforar hasta 300 mL con agua destilada.

**Buffer de fosfatos: Solución de trabajo:** Tomar 1.25 mL de la solución concentrada y aforar a un litro, distribuir 9 mL en tubos de 10x100mm y esterilizar a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Conservar en refrigeración

**Buffer de fosfatos: Solución madre o concentrada:** Se pesaron 34 g de Fosfato de sodio monobásico y se disolvió en 500 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1 N y se aforó a un litro, se esterilizó en autoclave durante 15 min a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Conservar en refrigeración

**Buffer de Lisis 5X de extracción de RNA por trizol:** Para un volumen de 100  $\mu\text{L}$  colocar en un recipiente 65  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 25  $\mu\text{L}$  de SDS (2.5%), 5  $\mu\text{L}$  de EDTA (25 mM), 5  $\mu\text{L}$  Tris a pH de 7.8 (50 mM) y al final agregar 1- $\mu\text{L}$  de Proteinasa K. No esterilizar en autoclave y conservar en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Buffer STE (15% sacarosa, 50 mM Tris pH 7.9, 50 mM EDTA):** Para 100 mL de STE pesar con exactitud 15 gramos de sacarosa, 0.121 g de Tris/HCl y 1.861 de EDTA, agregar 80 mL de agua bi-destilada ajustar el pH a 8.0 con NaOH y luego aforar a 100 mL con agua bidestilada, no esterilizar en autoclave.

**Buffer TAE 50x:** Se pesan 242 g de Trizma-base y se disuelven en 500 mL de agua destilada. Aparte se pesan 18.61 g de EDTA sal disódica y se disuelven en 80 mL de agua destilada, luego se ajusta el pH a 8 con NaOH 12 M y se afora a 100 mL, para tener una solución final de 100 mL de EDTA sal disódica 0.5 M a pH de 8. Finalmente se mezclan el TRIZMA base con el EDTA y se adicionan 57.1-mL de ácido acético glacial y se afora a 1-L.

**Buffer TBE 10x:** Se pesan 108 gr de Trizma-base y 55 g de ácido bórico y se mezclan con 40 mL de EDTA 0.5 M a pH de 8, se afora a 1-L y se esteriliza en autoclave 15 min a 120°C con una 1 atm de presión.

**Buffer TE a pH DE 8.0** (10 mM Tris pH 7.9, 1mM EDTA pH 8): Se pesan 0.1576 gr de Tris-HCL y 0.03722 de EDTA y se disuelven en 80 mL de agua destilada. El pH se ajusta a 8.0 con NaOH 12 M y se afora a 100 mL con agua destilada.

**EDTA 0.5 M:** Se pesan 18.61 gr de EDTA sal disódica y se disuelven en 80 mL de agua destilada, luego se ajusta el pH a 8 con NaOH 12 M y se afora a 100 mL.

**Hidróxido de sodio 0.5 M:** Pesar 10 g de NaOH y hacer una suspensión en 500 mL de agua destilada.

**Indicador de Rojo de Metilo:** Pesar aproximadamente y con precisión 0,1 g de la sal de sodio del rojo de metilo y aforar a 100 mL con agua.

**Indicador negro de eriocromo T:** Pesar aproximadamente 0,5 g de indicador negro de eriocromo T y agregar 100 g de cloruro de sodio. Triturar en mortero hasta formar una mezcla homogénea. Guardar en un frasco color ámbar. Esta mezcla se conserva en buenas condiciones para su uso durante un año.

**NaCl 5M:** Se pesan 29.2 g de NaCl y se disuelven en 100 mL de agua destilada y se esterilizan en autoclave 15 min, 120°C a 1 atm de presión

**Preparación de la solución de EDTA 0.5M pH 7.9:** Pesar en una balanza analítica 1.861 g de EDTA y añadir 8 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.9 (si la solución esta básica adicionar gota a gota una solución 1:10 de HCl; si la solución esta acida adicionar gota a gota una solución 1:10 de NaOH). Aforar la solución a 10 mL, si se requiere preparar mayor cantidad seguir la misma relación. Esta solución no se esteriliza y se almacena a una temperatura de 4°C.

**SDS:** Se pesan 10 g de SDS y se disuelven en 100 mL de agua destilada.

**Solución buffer de fosfatos B (PBS B):** Pesar en una balanza analítica 0.1 g de cloruro de calcio, diluirlo en 50 mL de agua destilada en agitación constante y aforar la solución a 100 mL con agua destilada.

**Solución amortiguadora de carga de Azul de Bromofenol 6X:** Pesar en una balanza analítica 0.025 g de azul de bromofenol, colocar en un tubo cónico de 15 mL, añadir 3 mL de glicerol y aforar la solución a 15 mL de agua inyectable.

**Solución amortiguadora de carga de Naranja G 6X:** Pesar en una balanza analítica 0.06 g de azul Naranja G, colocar en un tubo cónico de 50 mL, añadir 18 mL de Glicerol y aforar la solución a 50 mL de agua inyectable.

**Solución amortiguadora para medir dureza total en agua:** Pesar 16,9 g de cloruro de amonio y disolver en 143 mL de amoniaco concentrado, añadir 1,25 g de sal de magnesio de EDTA y diluir hasta 250 mL con agua. Conservar la solución amortiguadora en un recipiente plástico o de vidrio; se debe desechar la solución cuando haya transcurrido más de un mes de su fecha de preparación o cuando al añadirse 1-mL o 2 mL a la muestra, ésta no pueda producir un pH de  $10,0 \pm 0,1$ . Tapar herméticamente para evitar pérdidas de amoniaco o adsorción de dióxido de carbono

**Solución buffer de fosfatos 1X (PBS 1X, Ca<sup>+</sup> y Mg<sup>+</sup>):** Colocar en una probeta 10 mL de PBS A, adicionar 10 mL de PBS C y por último se colocan 10 mL de PBS B. Se afora la solución a 100 mL con agua destilada. No alterar el orden en que se adicionan las soluciones.

**Solución buffer de fosfatos A (PBS A):** Pesar en una balanza analítica 0.8 g de cloruro de sodio, diluirlo en 50 mL de agua destilada en agitación constante, adicionar 0.2 g de cloruro de potasio y 0.2 g de bifosfato de potasio, por último añadir 1.44 g de bifosfato de sodio bihidratado y aforar la solución a 100 mL de agua destilada.

**Solución buffer de fosfatos C (PBS C):** Pesar en una balanza 0.1 g de cloruro de magnesio, diluirlo en 50 mL de agua destilada en agitación constante y aforar la solución a 100 mL de agua destilada.

**Solución de ácido clorhídrico (1:1):** Tomar 100 mL de ácido clorhídrico y diluya en 100 mL de agua

**Solución de Ácido Clorhídrico 1M:** Medir con una pipeta serológica 8.62 mL de HCl concentrado con 91-mL de agua previamente colocada en un vaso de precipitados.

**Solución de ácido sulfúrico (0,1N):** Tomar cuidadosamente 3 mL de ácido sulfúrico concentrado y llevar a 1-L.

**Solución de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico (0.1 N):** Diluir 8.3 mL de ácido clorhídrico concentrado o 2.8 mL de ácido sulfúrico concentrado en 1-L con agua libre de CO<sub>2</sub>.

**Solución de ácido sulfúrico o clorhídrico (0,02 N):** Diluir 200 mL de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico 0,1 N a 1-L de agua.

**Solución de carbonato de calcio (1mg/mL):** Pesar 1-g de carbonato de calcio anhidro en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Colocar un embudo en el cuello del matraz y añadir poco a poco el ácido clorhídrico (1:1) hasta la solución total del carbonato de calcio. Añadir 200 mL de agua y llevar a ebullición durante unos minutos para eliminar el CO<sub>2</sub>. Enfriar, añadir unas gotas de indicador rojo de metilo y ajustar al color naranja intermedio por adición de amoniaco 3 N o ácido clorhídrico (1:1), según se requiera. Transferir a un matraz y aforar a 1L con agua.

**Solución de EDTA 0.01 M:** Pesar aproximadamente y con precisión 3,723 g de sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético dihidratada y disolver en agua y diluir a 1L. Valorar con una solución de carbonato de calcio.

**Solución de Extracto de carne (1%-Glicina -Tween 80 pH 9):** Pesar en una balanza analítica 15 g de extracto de carne, 18.8 g de Glicina y medir 1-mL de Tween 80. En un matraz adicionar 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 9.00 y aforar la solución en un litro con agua destilada.

**Solución de hidróxido de sodio (0,02 N):** Transferir 200 mL de la solución de NaOH 0,1 N y aforar en un matraz volumétrico con 1-L de agua.

**Solución de hidróxido de sodio (0,1 N):** Pesar 4,0 g de hidróxido de sodio disolver y diluir a 1-L con agua.

**Solución de Hidróxido de sodio a 10M:** Pesar en balanza analítica 40g de NaOH y adicionar 40 mL de agua para disolver. Agregar agua hasta completar el volumen de 100mL

**Solución de tiosulfato de sodio pentahidratado (0,1 M):** Pesar 25,0 g de tiosulfato de sodio y diluir a 1-L con agua agregar 5 mL de cloroformo como preservador.

**Solución estándar de nitrato de plata (0,014N):** Moler aproximadamente 5,0 g de cristales de nitrato de plata y secar a 100°C durante 2 h. Pesar aproximadamente y con precisión 2,4 g de los cristales pulverizados de nitrato de plata (ver inciso 5.1) disolverlos en aproximadamente 1-L. Valorar contra la solución patrón de cloruro de sodio 0,014N (ver inciso 5.10).

**Solución fresca de lisis para MIDIPREP (0.2 M NaOH, 1% SDS):** Para 100 mL de solución pesar con exactitud un gramo de SDS y 0.8 g de NaOH y aforar con 100 mL de agua destilada. No esterilizar en autoclave

**Solución indicadora de cromato de potasio (5%):** Pesar aproximadamente y con precisión 50,0 g de cromato de potasio y disolver en 500 mL de agua y añadir solución patrón de nitrato de plata hasta que se produzca un precipitado rojo claro. Proteger la solución de la luz y dejar estabilizar durante 24 h después de la adición de la solución de nitrato de plata. Filtrar la solución para remover el precipitado y aforar a 1-L con agua.

**Solución indicadora de fenolftaleína:** Pesar 5,0 g de fenolftaleína y disolver en 500 mL de etanol, añadir 500 mL de agua con agitación constante. Filtrar si hay formación de precipitado.

**Solución indicadora de naranja de metilo:** Pesar 0,5 g del colorante naranja de metilo y aforar a 1L con agua. Filtrar la solución fría para remover cualquier precipitado que se forme. O bien pesar 0,5 g de la sal de sodio y diluir a 1-L con agua, si es necesario filtrar cuando esté fría la solución.

**Solución patrón de Cloruro de Potasio 0,01mol/L:** Diluir 100 mL de la solución de 0,1 mol/L con agua a 1 000mL a 25°C. La conductividad de la solución a 25°C es de 141 mS/m.

**Solución patrón de cloruro de sodio (0,014N):** Secar aproximadamente 3,0 g de cloruro de sodio a 140°C. Pesar aproximadamente y con precisión 824,1 mg de la sal seca disolver en agua y aforar a 1-L en un matraz volumétrico.

**Suspensión de hidróxido de aluminio:** Pesar aproximadamente y con precisión 125,0 g de sulfato de aluminio y potasio o sulfato de aluminio y amonio, y llevar a 1-L con agua. Calentar a 60°C y añadir 55 mL de amoniaco lentamente y agitando. Permitir reposar la solución durante unas horas, decantar el agua sobrenadante y lavar el precipitado por adiciones sucesivas de agua, mezclando bien y decantando. Repetir el procedimiento anterior hasta eliminar el olor a amoniaco. Cuando está recién preparada, la suspensión ocupa un volumen aproximado de 1-L.

**Tris 1 M (pH 7.5 y pH 8):** Se pesan 121.1 g de Trizma-base y se disuelven en 800 mL de agua destilada, se ajusta el pH (pH 7.5 u 8 según sea el caso) con HCl concentrado y se afora a 1-L.

**Preparación de Nefélometro de MacFarland:** En tubos limpios y estériles se prepararon 10 tubos con BaCl<sub>2</sub> al 10% en combinación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% según como lo indique tabla 26 (NOM-244-SSA1-2008) (Diario Oficial de la Federación, 2008).

**Tabla 27.** Modo de preparación de nefelómetro de MacFarland.

Solución de BaCl <sub>2</sub> al 10% (mL)	Solución de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 1% (mL)	Escala de McFarland	UFC millones/m
0,1	9,9	4,0	300
0,2	9,8	3,7	600
0,3	9,7	3,5	900
0,4	9,6	3,4	1 200
0,5	9,5	3,3	1 500
0,6	9,4	3,2	1 800
0,7	9,3	3,15	2 100
0,8	9,2	3,10	2 400
0,9	9,1	3,04	2 700
1,0	9,0	3,00	3 000



## APÉNDICE II: Preparación de medios de cultivo

**Agar Nutritivo A y B:** Cultivo y sub-cultivo de referencia: En la tabla 27 se muestra el modo de preparar el agar nutritivo A y B, para llevar a cabo la metodología de Método de prueba para evaluar la eficiencia en reducción bacteriana. (NOM-244-SSA1-2008) (Diario Oficial de la Federación, 2008).

Tabla 28. Preparación de medios para cultivos y sub-cultivos de referencia.

Reactivos	Agar nutritivo A	Agar nutritivo B
	Sub-cultivo de referencia	Cultivo de referencia
Extracto de carne	3 g	3 g
Peptona	5 g	5 g
Agar libre de sales	15 g	30 g
Agua destilada o desionizada	1 L	1 L
Distribuir en tubos	10*100 mm	22 *175 mm

**Agar MacConkey:** Suspender 50 g del medio en un litro de agua purificada. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Dejar reposar de 10 a 15 min. Calentar suavemente agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

**Agar TCBS:** Suspender 88 g del polvo en un litro de agua purificada. Mezclar perfectamente. Calentar agitando y hervir durante un minuto. Enfriar a 45 – 50°C y vaciar en placas Petri. No esterilizar en autoclave.

**Agua peptonada:** Suspender 10 g de peptona de carne y 5 g de cloruro de sodio en un litro de agua destilada, mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

**Caldo con 2% de sal:** Pesar 20 g de cloruro de sodio y disolver en un litro de agua destilada. Distribuir 10 mL de caldo en tubos. Esterilizar en autoclave a 121°C de 12 a 15 min.

**Caldo de Selenito:** Rehidratar 23 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta completa solución. No sobrecalentar. Distribuir en tubos de ensayo estériles. No esterilizar en autoclave. Conservar en refrigeración de 2° a 8°C. Puede presentarse un escaso precipitado color

naranja que no interfiere en el funcionamiento del medio. Es importante protegerlo de la luz.

**Caldo de soya tripticaseína con glicerol al 20%:** Hacer una suspensión de 1.5 g del polvo en un 40 mL de agua destilada, clarificar el medio, una vez frío agregar 10 mL de glicerol. Distribuir en criotubos y esterilizar en autoclave a 121°C pero no más de 15 lbs de presión durante 15 min. Conservar refrigerado.

**Caldo de soya tripticaseína:** Hacer una suspensión de 30 g del polvo en un litro de agua destilada, clarificar el medio. Distribuir en tubos en autoclave a 121°C pero no más de 15 lbs de presión durante 15 min.

**Caldo de Tetrionato:** Rehidratar 91.5 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1-min para disolverlo por completo. Enfriar aproximadamente a 45°C. Distribuir en tubos de ensayo estériles de 16x150 mm en volúmenes de 10 mL, agitando para homogeneizar el precipitado. No esterilizar en autoclave. Conservar en refrigeración de 2° a 8°C. Antes de usarlo agregar a cada tubo 0.2 mL de una solución Yodo-yodurada agitando perfectamente.

**Caldo EC:** Rehidratar 37 g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar ligeramente el medio para disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C de 12 a 15 min.

**Caldo lactosado 1X:** Suspender 13 g del polvo en un litro de agua purificada. Disolver y distribuir en tubos con campana de Durham. Esterilizar en autoclave a 121°C de 12 a 15 min.

**Caldo lactosado 2X:** Suspender 26 g del polvo en un litro de agua purificada. Disolver y distribuir en tubos con campana de Durham. Esterilizar en autoclave a 121°C de 12 a 15 min.

**Caldo LB:** Rehidratar 20 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta completa solución. Distribuir en tubos de ensayo o en matraces Erlenmeyer. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15-30 min. Conservar en refrigeración de 2° a 8°C.

**Caldo Nutritivo:** Rehidratar 23 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición

durante 1-min para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 min. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

**Caldo verde brillante:** Suspender 40 g del polvo en un litro de agua. Distribuir en tubos en porciones de 10 mL con campana de Durham cuando la muestra sea de 1-mL o menos. Si la muestra es más de 1-mL pesar 60 g de polvo en un litro de agua purificada disolver y distribuir en tubos con campana de Durham. Esterilizar en autoclave a 121°C de 12 a 15 min.

**APÉNDICE III: Interpretación de resultados**

**NMP, tabla de cálculos:** En la tabla 28 se puede obtener directamente el cálculo de NMP en tubos positivos con 3 repeticiones (PROY NMX-AA-042-SCFI-2005). Índice del NMP y límite confiable de 95 % para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 3 tubos con porciones de 10 mL, 3 tubos con porciones de 1-mL, 3 tubos con porciones de 0.1-mL (Diario Oficial de la Federación, 2005).

**Tabla 29.** Tabla de combinación de tubos positivos para calcular NMP

No. de tubos con reacciones positivas			Índice del NMP por 100 ml	Límite confiable de 95%	
3 tubos con 10 ml	3 tubos con 1 ml	3 tubos con 0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	<3		
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	3
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	>=2400		

**Interpretación de puntos de corte del AutoScan 4:** En la tabla 29, se muestran los puntos de corte para la interpretación del perfil de resistencia a antibióticos con el equipo AutoScan 4.

**Tabla 30.** Interpretación de puntos de corte para determinar susceptibilidad, resistencia o resistencia intermedia del Panel negativo combo 44 para enterobacterias.

Agentes antimicrobianos	Bacteria	Susceptible (µg/ml)	Intermediate (µg/ml)	Resistance (µg/ml)	
Amikacin	Enterobacteriaceae & <i>Vibrio cholerae</i>	≤16	32	≥64	
Ampicillin		≤8	16	≥32	
Ampicillin-sulbactam	Enterobacteriaceae & <i>Acinetobacter</i> spp.	≤8/4	16/8	≥ 32/16	
Aztreonam	Enterobacteriaceae	≤ 8	16	≥ 32	
Cefazolin		≤ 8	16	≥ 32	
Cefepime		≤ 8	16	≥ 32	
Cefotaxime		≤ 8	16 - 32	≥ 64	
Cefotetan		≤ 16	32	≥ 64	
Ceftazidime		≤ 8	16	≥ 32	
Ceftriaxone		≤ 8	16 - 32	≥ 64	
Cefuroxime		≤ 4	8 - 16	≥ 32	
Ciprofloxacin		≤1	2	≥ 4	
Gentamicina		≤ 4	8	≥ 16	
Levofloxacin		≤ 2	4	≥ 8	
Imipinem		≤ 4	8	≥ 16	
Meropenem		≤ 4	8	≥ 16	
Moxifloxacin		≤ 2	4	≥ 8	
Piperacillin-tazobactam		Enterobacteriaceae	≤ 64/4	32/4	≥ 128/4
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> & Gram negative bacteria	≤ 16/4	64/4	≥ 128/4
Ticarcillin-clavulanic acid		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> & Gram negative bacteria	≤ 64/2	32/2	≥ 128/2
Tobramycin	≤ 16/2		64/2	≥ 128/2	
Trimetoprim-sulphamethoxazole	≤ 4		8	≥ 16	

### Análisis estadístico: Coliformes fecales y totales en Minitab Versión 17:

Modelo lineal general: FECAL COLIFORMS vs. SEASON, SITE

Codificación de factores (-1, 0, +1)  
 Filas no utilizadas 3  
 Información del factor  
 Factor Tipo Niveles Valores  
 SEASON Fijo 4 AUTUMN, SPRING, SUMMER, WINTER  
 SITE Fijo 13 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SEASON	3	23.37	7.7903	11.35	0.000
SITE	12	13.35	1.1128	1.62	0.133
Error	33	22.65	0.6864		
Total	48	61.59			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.828469	63.22%	46.51%	19.15%

Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante	2.973	0.120	24.84	0.000	
SEASON					
AUTUMN	1.101	0.202	5.45	0.000	1.54
SPRING	0.047	0.209	0.23	0.822	1.60
SUMMER	-0.623	0.218	-2.87	0.007	1.65
SITE					
1	0.055	0.399	0.14	0.892	1.62
2	-0.180	0.399	-0.45	0.655	1.62
3	0.189	0.399	0.47	0.639	1.62
4	0.157	0.399	0.39	0.697	1.62
5	0.408	0.460	0.89	0.382	1.85
6	1.013	0.460	2.20	0.035	1.85
7	-0.359	0.399	-0.90	0.375	1.62
8	0.270	0.399	0.68	0.504	1.62
9	-1.215	0.399	-3.04	0.005	1.62
10	-0.536	0.399	-1.34	0.188	1.62
11	0.552	0.399	1.38	0.176	1.62
12	-0.351	0.399	-0.88	0.386	1.62

Ecuación de regresión

$$\text{FECAL COLIFORMS} = 2.973 + 1.101 \text{ SEASON\_AUTUMN} + 0.047 \text{ SEASON\_SPRING} - 0.623 \text{ SEASON\_SUMMER} - 0.525 \text{ SEASON\_WINTER} + 0.055 \text{ SITE}_1 - 0.180 \text{ SITE}_2 + 0.189 \text{ SITE}_3 + 0.157 \text{ SITE}_4 + 0.408 \text{ SITE}_5 + 1.013 \text{ SITE}_6 - 0.359 \text{ SITE}_7 + 0.270 \text{ SITE}_8 - 1.215 \text{ SITE}_9 - 0.536 \text{ SITE}_{10} + 0.552 \text{ SITE}_{11} - 0.351 \text{ SITE}_{12} - 0.003 \text{ SITE}_{13}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	FECAL COLIFORMS	Ajuste	Resid	Resid est.
16	4.541	2.539	2.003	2.93 R

Residuo grande R

## ANOVA unidireccional: FECAL COLIFORMS vs. SEASON

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$   
 Filas no utilizadas 3

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores  
 SEASON 4 AUTUMN, SPRING, SUMMER, WINTER

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SEASON	3	25.59	8.5284	10.66	0.000
Error	45	36.00	0.8001		
Total	48	61.59			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.894468	41.54%	37.64%	30.53%

Medias

SEASON	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
AUTUMN	13	4.074	0.899	(3.574, 4.574)
SPRING	12	3.021	1.040	(2.501, 3.541)
SUMMER	11	2.221	0.958	(1.678, 2.764)
WINTER	13	2.449	0.660	(1.949, 2.948)

Desv.Est. agrupada = 0.894468

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

SEASON	N	Media	Agrupación
AUTUMN	13	4.074	A
SPRING	12	3.021	B
WINTER	13	2.449	B
SUMMER	11	2.221	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ICs simultáneos de 95% de Tukey

### Comparaciones para FECAL COLIFORMS

### Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = FECAL COLIFORMS, Término = SEASON

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

SEASON	N	Media	Agrupación
AUTUMN	13	4.07395	A
SPRING	12	3.02072	B
WINTER	13	2.44854	B
SUMMER	11	2.34989	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ICs simultáneos de 95% de Tukey

### Modelo lineal general: TOTAL COLIFORMS vs. SEASON, SITE

Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

Filas no utilizadas 3

Información del factor

Factor Tipo Niveles Valores

SEASON Fijo 4 AUTUMN, SPRING, SUMMER, WINTER

SITE Fijo 13 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
SEASON	3	17.67	5.8889	12.62	0.000
SITE	12	15.94	1.3284	2.85	0.009
Error	33	15.40	0.4667		
Total	48	47.46			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.683182	67.55%	52.80%	29.90%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
---------	------	--------------	---------	---------	-----

Constante	3.5725	0.0987	36.20	0.000	
SEASON					
AUTUMN	0.597	0.166	3.58	0.001	1.54
SPRING	-0.530	0.173	-3.07	0.004	1.60
SUMMER	0.609	0.179	3.39	0.002	1.65
SITE					
1	0.014	0.329	0.04	0.966	1.62
2	-0.063	0.329	-0.19	0.850	1.62
3	-0.281	0.329	-0.85	0.399	1.62
4	0.205	0.329	0.62	0.539	1.62
5	0.430	0.380	1.13	0.265	1.85
6	1.158	0.380	3.05	0.004	1.85
7	-0.174	0.329	-0.53	0.601	1.62
8	0.350	0.329	1.06	0.296	1.62
9	-1.421	0.329	-4.31	0.000	1.62
10	-0.427	0.329	-1.30	0.204	1.62
11	0.577	0.329	1.75	0.089	1.62
12	-0.286	0.329	-0.87	0.391	1.62

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 \text{TOTAL COLIFORMS} = & 3.5725 + 0.597 \text{ SEASON\_AUTUMN} - 0.530 \text{ SEASON\_SPRING} \\
 & + 0.609 \text{ SEASON\_SUMMER} - 0.676 \text{ SEASON\_WINTER} + 0.014 \text{ SITE\_1} - 0.063 \text{ SITE\_2} - \\
 & 0.281 \text{ SITE\_3} + 0.205 \text{ SITE\_4} + 0.430 \text{ SITE\_5} + 1.158 \text{ SITE\_6} - 0.174 \text{ SITE\_7} \\
 & + 0.350 \text{ SITE\_8} - 1.421 \text{ SITE\_9} - 0.427 \text{ SITE\_10} + 0.577 \text{ SITE\_11} - \\
 & 0.286 \text{ SITE\_12} - 0.082 \text{ SITE\_13}
 \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	TOTAL COLIFORMS	Ajuste	Resid	Resid est.	
11	4.880	3.620	1.260	2.23	R
14	2.822	4.195	-1.373	-2.44	R
40	4.541	2.911	1.631	2.87	R

Residuo grande R

## Comparaciones para TOTAL COLIFORMS

**Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = TOTAL COLIFORMS, Término = SEASON**

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

SEASON	N	Media	Agrupación
SUMMER	11	4.18133	A
AUTUMN	13	4.16905	A
SPRING	12	3.04283	B
WINTER	13	2.89671	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ICs simultáneos de 95% de Tukey

### ANOVA unidireccional: TOTAL COLIFORMS vs. SEASON

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$
Filas no utilizadas	3

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
SEASON	4	AUTUMN, SPRING, SUMMER, WINTER

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust.	MC	Ajust.	Valor F	Valor p
SEASON	3	16.12	5.3728	7.71	0.000		
Error	45	31.34	0.6965				



Total 48 47.46  
 Resumen del modelo  
 S R-cuad. (ajustado) R-cuad. (pred)  
 0.834576 33.96% 29.56% 21.50%

Medias  
 SEASON N Media Desv.Est. IC de 95%  
 AUTUMN 13 4.169 0.746 (3.703, 4.635)  
 SPRING 12 3.050 1.017 (2.564, 3.535)  
 SUMMER 11 4.037 0.885 (3.530, 4.544)  
 WINTER 13 2.897 0.674 (2.431, 3.363)  
 Desv.Est. agrupada = 0.834576

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

SEASON	N	Media	Agrupación
AUTUMN	13	4.169	A
SUMMER	11	4.037	A
SPRING	12	3.050	B
WINTER	13	2.897	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### ICs simultáneos de 95% de Tukey

## Análisis estadístico: Generador de cloro por electrolisis Minitab Versión 17:

22/05/2016 9:18:59

### Modelo lineal general: Cloro (g/L) vs. Voltaje

Método

Codificación de factores (-1; 0; +1)

Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Voltaje	Fijo	3	9.5; 10.5; 12.0

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Voltaje	2	326.3	163.14	7.70	0.002
Error	27	572.3	21.20		
Total	29	898.6			

Resumen del modelo

S R-cuad. (ajustado) R-cuad. (pred)  
 4.60395 36.31% 31.59% 21.37%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
---------	------	--------------	---------	---------	-----

Constante	16.337	0.841	19.44	0.000		
Voltaje						
9.5	-4.62	1.19	-3.89	0.001	1.33	
10.5	2.85	1.19	2.40	0.024	1.33	

Ecuación de regresión

$$\text{Cloro (g/L)} = 16.337 - 4.62 \text{ Voltaje}_{9.5} + 2.85 \text{ Voltaje}_{10.5} + 1.77 \text{ Voltaje}_{12.0}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Cloro (g/L)	Ajuste	Resid	Resid est.	
13	7.10	19.19	-12.09	-2.77	R
20	28.40	19.19	9.21	2.11	R
28	28.40	18.11	10.29	2.36	R

Residuo grande R

## Comparaciones para Cloro (g/L)

### Comparaciones por parejas de Tukey: Respuesta = Cloro (g/L), Término = Voltaje

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Voltaje	N	Media	Agrupación
10.5	10	19.190	A
12.0	10	18.105	A
9.5	10	11.715	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## ICs simultáneos de 95% de Tukey

### Prueba T e IC de dos muestras: Cloro (g/L); Sal

T de dos muestras para Cloro (g/L)

Sal	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
18	10	11.72	2.40	0.76
36	6	23.10	4.90	2.0

Diferencia =  $\mu$  (18) -  $\mu$  (36)

Estimación de la diferencia: -11.38

IC de 95% para la diferencia: (-16.62; -6.15)

Prueba T de diferencia = 0 (vs.  $\neq$ ): Valor T = -5.32 Valor p = 0.002 GL = 6

## Prueba T e IC de dos muestras: UFC/mL; Tiempo de desinfección

T de dos muestras para UFC/mL

Tiempo de desinfección	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
1 hora	10	14.3	31.6	10
15 min	10	54.8	44.5	14

Diferencia =  $\mu$  (1 hora) -  $\mu$  (15 min)

Estimación de la diferencia: -40.5

IC de 95% para la diferencia: (-77.1; -3.9)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. ≠): Valor T = -2.35 Valor p = 0.032 GL = 16



Article

## Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Surface Water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico

Ma. Carmen E. Delgado-Gardea<sup>1,2</sup>, Patricia Tamez-Guerra<sup>1</sup>, Ricardo Gomez-Flores<sup>1</sup>,  
Francisco Javier Zavala-Díaz de la Serna<sup>2</sup>, Gilberto Eroza-de la Vega<sup>2</sup>,  
Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón<sup>2</sup>, María Concepción Pérez-Recoder<sup>3</sup>,  
Blanca Sánchez-Ramírez<sup>2</sup>, María del Carmen González-Horta<sup>2</sup> and Rocío Infante-Ramírez<sup>2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León Ave. Universidad s/n, San Nicolás de los Garza 66450, N.L., Mexico; carmen\_060@hotmail.com (M.C.E.D.-G.); patamez@hotmail.com (P.T.-G.); rgomez60@hotmail.com (R.G.-F.)
  - <sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Nuevo Campus Universitario s/n, Chihuahua 31125, Mexico; fzavala@uach.mx (F.J.Z.-D.S.); gerosa@uach.mx (G.E.-V.); vnevare@uach.mx (G.V.N.-M.); bsanche@uach.mx (B.S.-R.); carmengonzalez@uach (M.C.G.-H.)
  - <sup>3</sup> Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Dirección Regional Norte y Sierra Madre Occidental, Parque Nacional Cascada de Bassaseachic, Ocampo, Chihuahua 31203, Mexico; crecoder@conanp.gob.mx
- \* Correspondence: rir\_infante@yahoo.com.mx; Tel.: +52-(614)-236-6000 (ext. 4265)

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 4 May 2016; Accepted: 7 June 2016; Published: 16 June 2016

**Abstract:** Bacterial pathogens are a leading cause of waterborne disease, and may result in gastrointestinal outbreaks worldwide. Inhabitants of the Bassaseachic Falls National Park in Chihuahua, Mexico show seasonal gastroenteritis problems. This aim of this study was to detect enteropathogenic microorganisms responsible for diarrheal outbreaks in this area. In 2013, 49 surface water samples from 13 selected sampling sites along the Basaseachi waterfall and its main rivers, were collected during the spring, summer, autumn, and winter seasons. Fecal and total coliform counts were determined using standard methods; the AutoScan-4 system was used for identification of isolates and the antibiotic resistance profile by challenging each organism using 21 antibiotics. Significant differences among seasons were detected, where autumn samples resulted in the highest total ( $p < 0.05$ ) and fecal ( $p < 0.001$ ) coliform counts, whereas the lowest total coliform counts were recorded in spring. Significant differences between sampling sites were observed, where samples from sites 6, 8, and 11 had the highest total coliform counts ( $p < 0.009$ ), whereas samples from site 9 exhibited the lowest one. From the microbiological analysis, 33 bacterial isolates from 13 different sites and four sampling seasons were selected; 53% of isolates were resistant to at least one antibiotic, and 15% exhibited a multidrug resistance (MDB) phenotype. MDB were identified as *Klebsiella oxytoca* (two out of four identified isolates), *Escherichia coli* (2/7), and *Enterobacter cloacae* (1/3). In addition, some water-borne microorganisms exhibited resistance to cefazoline, cefuroxime, ampicillin, and ampicillin-sulbactam. The presence of these microorganisms near rural settlements suggests that wastewater is the contamination source, providing one possible transmission mechanism for diarrheal outbreaks.

**Keywords:** water; pollution; antibiotic; multidrug resistance; enteric; microorganisms; MPN; environment

### 1. Introduction

Bacteria are one of the most important pathogens in waterborne diseases, and these organisms cause gastrointestinal outbreaks worldwide. Many human diseases are transmitted as a result of the ingestion of contaminated water and food. There are nearly 1.7 billion cases of diarrhea per

year worldwide; this condition is the second leading cause of death in children less than five years old [1–3] and kills nearly 760,000 children per year. These health problems are common in rural areas in developing countries, which lack access to safe, fresh drinking water, and they remain a serious problem [4,5]. Enteric bacteria are present in the human gastrointestinal system and feces of all warm-blooded animals. These bacteria are commonly dumped into water environments through the runoff from farms and rural settlements with industrial and agricultural pollutants, lacking of wastewater treatment systems [1,6].

Bacterial pathogens potentially transmitted through water ingestion include *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Serovar Typhi, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Serovar Paratyphi, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter* sp., *Clostridium* spp., and *Bacillus anthracis*. Other bacterial pathogens that can survive in soil and water include *Legionella*, *Burkholderia pseudomallei* (also known as *Pseudomonas pseudomallei*), and atypical mycobacteria [1,2,5]. Since 1895, *E. coli* has been identified as an indicator of fecal pollution in water samples; not all species of *E. coli* are pathogenic, but a few of these bacteria, such as *E. coli* O157:H7, can be fatal [7,8]. The most probable number technique is commonly used as an index to determine the microbial safety of drinking water; this method is performed in multiple tubes showing the probabilistic value of the bacteria in 100 mL of water, as described in ISO 6461 [9].

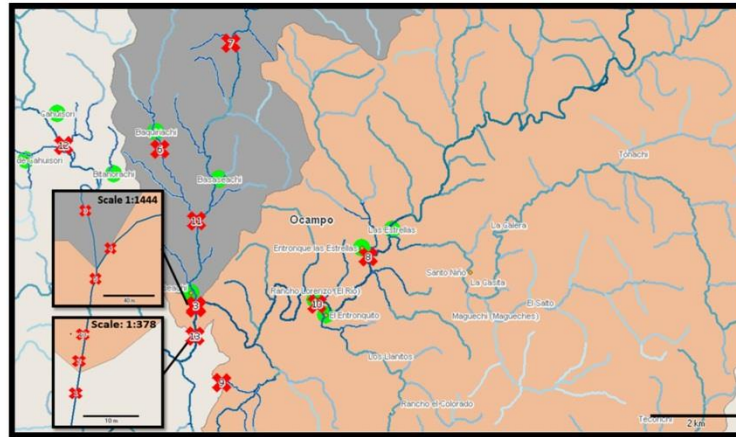
Untreated waste introduces additional resistant bacteria into water, likely also constituting an important mechanism for the dissemination of antibiotic-resistant bacteria (ARBs) in natural bacterial communities. ARBs are becoming a major global public health problem [10,11], and the extensive use of antimicrobial treatments in humans and animals may increase resistant bacterial populations in the aquatic environment [12]. Most antibiotic resistance research has focused on isolates from clinical patients, but ARBs are widespread in the environment, including water and soil [11]. In 2013, Bassaseachic Falls National Park in Chihuahua presented diarrhea outbreaks among inhabitants of the park, primarily in children, probably caused by contaminated water consumption. The aim of the present study was to identify the multidrug-resistant enteric pathogenic and native bacteria present in the surface water of Bassaseachic Falls National Park in Chihuahua, Mexico as a possible source of water outbreaks.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Sample Collection

Thirteen reference locations situated near rural settlements, waterfall wells, and the belvedere used by inhabitants to collect water for drinking, cooking or washing purposes, were selected in the Bassaseachic Falls National Park, Ocampo Municipality in the state of Chihuahua, Mexico (28°07'59"N 108°15'00"W, Figure 1).

A total of 49 sampling points were selected from 13 different points described in Table 1, and each location was selected near principal rural settlements. Samples 1, 2, and 13 refer directly to Basaseachi Falls; in addition, two samples were collected from the visitors' center (sample 9) and a small waterfall (sample 2) next to the Basaseachi waterfall. Four 1-L samples were collected at each location using 1.2-L polypropylene bottles previously sterilized under UV light for 3 h, according to Mexican sampling standards [13]). Each sample was collected approximately 30 cm below the water surface, and the bottles were open only under the water. Four liters of water from each sampling point was stored upright on ice in 1.2-L polypropylene bottles until further laboratory analysis. The seasons were defined as winter (December), spring (March), summer (June) and autumn (October). Two of the total water samples were lost as a result of the dry spell during the summer (samples 5 and 6), and one water sample was lost during the spring as a result of unsafe sampling conditions (sample 13). All collection sites were identified using GPS (Table 1). The presence of native and enteropathogenic bacteria was determined using microbiological and biochemical techniques for the identification of Gram-negative bacteria from all collected samples.



**Figure 1.** General scheme of Bassaseachic Falls National Park. The (X) symbols indicate the sampling sites: (●) Rural settlement within the studied area. Source: INEGI digital map, Cartographic Package 2010; Scale 1:64140. Samples 5 ( $28^{\circ}10'47.45''\text{N}$ ,  $108^{\circ}12'45.49''\text{W}$ ) and 6 ( $28^{\circ}12'40.80''\text{N}$ ,  $108^{\circ}13'20.49''\text{W}$ ) were lost during the summer, and sample 13 was lost during the spring ( $28^{\circ}10'27.36''\text{N}$ ,  $108^{\circ}12'44.97''\text{W}$ ).

**Table 1.** Description of the freshwater sample sites at Bassaseachic Falls National Park during 2013.

Sample	Sample Points Sample Site	Geographical Coordinates	
		North (N)	West (W)
1	Basaseachi waterfall well	$28^{\circ}10'26.95''\text{N}$	$108^{\circ}12'44.99''\text{W}$
2	"La ventana" waterfall	$28^{\circ}10'27.17''\text{N}$	$108^{\circ}12'44.88''\text{W}$
3	"El Durazno" river	$28^{\circ}10'48.24''\text{N}$	$108^{\circ}12'45.09''\text{W}$
4	Basaseachi river	$28^{\circ}10'49.19''\text{N}$	$108^{\circ}12'45.86''\text{W}$
5	Y. Basaseachi junction of the river and Durazno river.	$28^{\circ}10'47.45''\text{N}$	$108^{\circ}12'45.49''\text{W}$
6	"Baquiriachi" stream	$28^{\circ}12'40.80''\text{N}$	$108^{\circ}13'20.49''\text{W}$
7	Basaseachi water supply stream	$28^{\circ}13'59.55''\text{N}$	$108^{\circ}12'26.07''\text{W}$
8	"Las Estrellas" stream	$28^{\circ}11'30.06''\text{N}$	$108^{\circ}10'27.09''\text{W}$
9	Visitors center of Bassaseachic Falls National Park	$28^{\circ}09'54.7''\text{N}$	$108^{\circ}12'21.7''\text{W}$
10	"Betorachi" stream	$28^{\circ}10'54.08''\text{N}$	$108^{\circ}11'6.84''\text{W}$
11	Creek next to the oxidation pond	$28^{\circ}11'50.25''\text{N}$	$108^{\circ}12'47.88''\text{W}$
12	"Cahuisori" stream	$28^{\circ}12'40.58''\text{N}$	$108^{\circ}14'38.92''\text{W}$
13	Belvedere of Basaseachi waterfall	$28^{\circ}10'27.36''\text{N}$	$108^{\circ}12'44.97''\text{W}$

## 2.2. Microbiological Analysis

### 2.2.1. Total/Fecal Coliform Determination

Total and fecal coliform counts were determined using the multiple-tube fermentation technique and were reported as the most probable number (MPN) of organisms present per 100 mL of sample. The MPN analysis was performed within 24 h of sampling, according to the Mexican Standard [14]. Briefly, 10-, 1-, and 0.1-mL aliquots of the season/site samples were inoculated in triplicate into 10 mL of lactose broth (Merck, Naucalpan de Juárez, México) in an inverted Durham tube and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h; gas formation indicated a positive result. One milliliter of the gas-positive samples was inoculated into 10 mL of standard broth for total coliform counts and was incubated at  $44^{\circ}\text{C}$ . Another milliliter of the gas-positive sample was inoculated in brilliant green broth for fecal coliform



confirmation and was incubated at 37 °C. The negative samples were incubated for an additional 48 h as a confirmative test.

### 2.2.2. Microbial Isolation

Water samples that exceeded the Mexican Standard (1000 MPN/100 mL) were analyzed using standard microbiological techniques for the enumeration of bacteria and the identification of pathogens. To isolate pure cultures, the freshwater samples were placed in pre-selection media, followed by selective media (Supplementary Material Figure S1). From the initial bacterial growth, pure culture isolates were separated and analyzed further through macroscopic and microscopic characterizations. Each isolate was characterized based on its colony macroscopic morphology (shape, size, type of edge, transmitted or reflected light) and Gram stain. For isolation, the method of Al-Bayatti *et al.* [15] was followed, with minor modifications. Briefly, to obtain pure cultures, 10 mL of freshwater sample was inoculated into 10 mL of BBL-buffered peptone water (Difco, supplied by Productos Químicos Viqmar, Tlalnepantla Estado de México, México), 2% sodium chloride broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), tetrathionate broth (Difco) and selenite broth (Difco). The cultures were incubated overnight at 37 °C using an oven (model 314, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 10 mL of the freshwater sample was also inoculated into nutrient broth (MCD Lab, Tlalnepantla, Estado de México, México) and incubated overnight at 42 °C. The bacteria grown on selenite and tetrathionate broth as an original source were re-inoculated in Salmonella-Shigella (SS) to recover *Salmonella* and *Shigella* isolates (SS, Bioxon supplied by Productos Químicos Viqmar) and were incubated overnight at 37 °C. Bacteria grown in BBL-buffered peptone water and 2% NaCl broth were re-inoculated onto thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS, BD Bioxon, Estado de México, México) to recover a variety of *Vibrio* spp. [16]. In addition to nutrient broth, the samples were re-inoculated onto nutrient agar to increase the range of the recovered Gram-negative bacteria and onto MacConkey agar to presumptively identify the *Escherichia coli* isolates. The purified colonies were subsequently cultured on MacConkey agar and TCBS for further analysis and stored at –20 °C in trypticase soy broth (Bioxon) containing 30% glycerol.

### 2.3. Biochemical Identification

Pure colonies were recovered from MacConkey and TCBS agar for biochemical identification using the AutoSCAN-4 system (DADE Behring MicroScan-Plus, Kennett Square, PA, USA) to identify fermentative and non-fermentative Gram-negative bacilli. The AutoScan ID panel was prepared according to the manufacturer's instructions. Identification was based on the detection of pH changes determined via modified and chromogenic tests, substrate utilization, and growth in the presence of antimicrobial agents after 16–42 h of incubation at 35 °C. Rapid Combo panel NEG-44 was selected to identify Gram-negative bacteria based on conventional and chromogenic tests in 96-well microplates and on 27 dehydrated substrates. The results were analyzed using Labpro software to identify microorganisms and to generate an antibiotic resistance profile. Only Gram negative bacteria were further analyzed. Similarly, only one isolate from isolates showing similar macroscopic (colonial) and microscopic characteristic was selected.

### 2.4. Antibiotic Resistance Analyses

The antimicrobial susceptibility tests are miniaturizations of the broth dilution susceptibility test, using dehydrated samples. Pure colonies tested for biochemical identification were also tested to growth in the presence of antimicrobial agents for antibiotic resistance profiling using the AutoSCAN-4 system. The rapid combo panel NEG-44-tested antibiotics included: amikacin, ampicillin-sulbactam, ampicillin, aztreonam, cefazolin, cefepime, cefotetan, ceftazimide, ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, levofloxacin, meropenem, moxifloxacin, piperacillin-tazobactam, ticarcillin-clavulanic acid, tobramycin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. The breakpoint combo panels used concentrations equivalent to the categorical breakpoints of the

CLSI, and the minimum inhibitory concentrations (MICs) [17,18]. If two or more isolates from the same sampling point exhibited identical results according to the microscan biotype flinging number, then only one of the isolates was analyzed further.

2.5. Statistical Analysis

For the MPN analysis, the data were normalized through the logarithmic transformation of the quantitative MPN results, and ANOVA with the general linear model was used to test for determinations of statistical significance. Comparisons among groups were obtained using Tukey test. Minitab statistical software was used for data analysis. For each season, the calculation of the geometric mean included all sites, whereas the calculation of the geometric mean for each site included all seasons, with confidence intervals of 95% (Minitab v17).

3. Results

3.1. Microbiological Analysis

The samples collected from Bassaseachic Falls National Park during 2013 were analyzed for total and fecal coliform enumeration. Results showed that calculated data were exceeding Mexican standards among total and fecal coliform counts. The total coliform counts from the sampling season and sampling sites are shown in Figure 2A. Similarly, the fecal coliform counts from the sampling season and sampling sites are shown in Figure 2B. The samples collected at site 9 showed the lowest total and fecal coliform counts compared with the other sample sites.

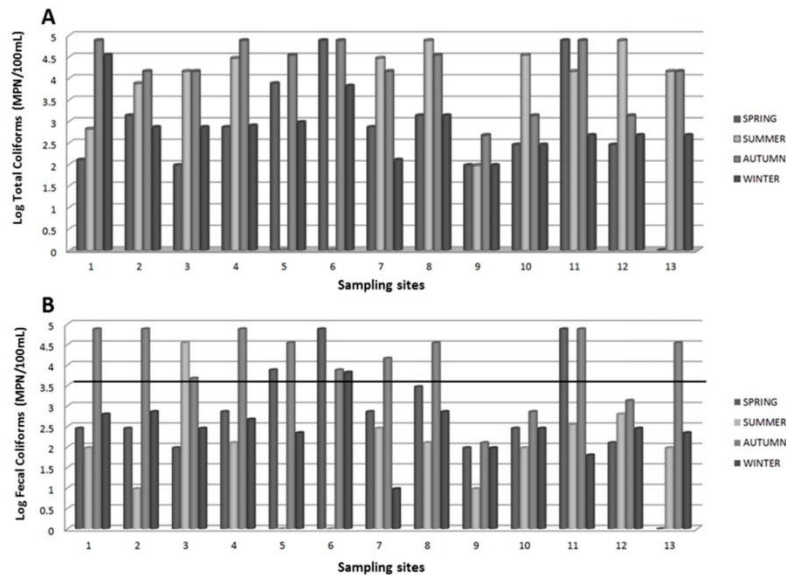


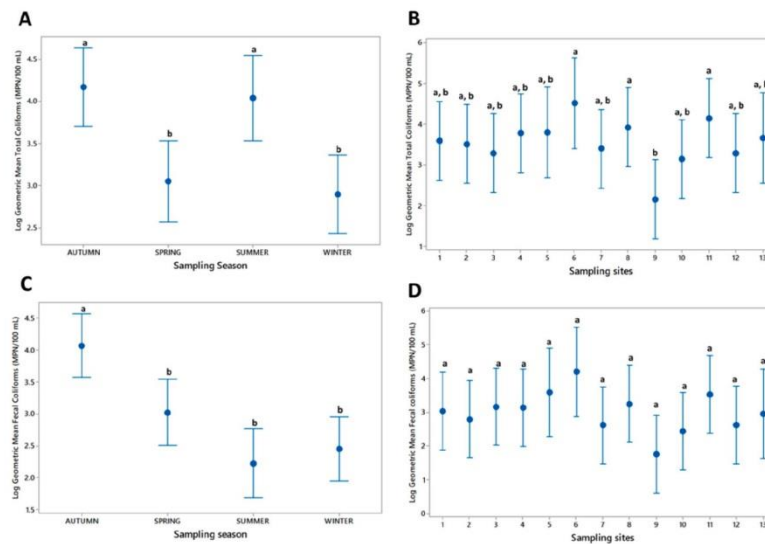
Figure 2. Log MPN counts of (A) total coliforms and (B) fecal coliforms per sampling site in the water samples collected from Bassaseachic Falls National Park, Ocampo, Chihuahua, México, during 2013. The black line across Figure 2B on 3.5 MPN indicates the [19].

In contrast, the samples collected from sites 5, 6, 8, and 11 exhibited the highest counts, where the total coliforms were higher than the fecal coliforms. Except for samples 9, 10 and 12, the collected



water samples had greater than 1000 MPN/100 mL (3.5 MPN) fecal coliforms during the autumn and summer seasons.

The pooled MPN geometric mean was used to calculate the intervals, with a 95% confidence interval (Figure 3). The total coliform counts are shown in Figure 3A,B. ANOVA revealed significant differences ( $p < 0.001$ ) between the total coliform counts from the autumn and summer (highest) and spring and summer (lowest) seasons. ANOVA also revealed significant differences between the total coliforms ( $p < 0.05$ ) at the sampling sites. The results of Tukey test revealed that samples 6, 8, and 11 had the highest coliform counts and that sample 9 had the lowest count (Figure 3B).



**Figure 3.** The geometric means considering all sites and all seasons in logarithmic scale and with confidence intervals of 95%. (A) Total coliforms per sampling season; (B) Total coliforms per sampling site; (C) Fecal coliforms per sampling season; (D) Fecal coliforms per sampling site. Bars showing different letter are significantly different (Tukey,  $p < 0.05$ ).

The geometric mean of the fecal coliforms significantly varied among the seasons ( $p < 0.001$ ), where most of the samples collected during autumn exhibited significant differences compared with the remaining samples collected during the 2013 seasons by Tukey test ( $p < 0.05$ ) (Figure 3C). Tukey test also revealed no significant differences between the fecal coliform geometric means of the sampling sites from pooled seasons ( $p = 0.133$ ; Figure 3D).

### 3.2. Biochemical and Antibiotic Resistance Profiles

A total of 33 Gram negative isolates showing different macroscopic and microscopic characteristics were recovered from 23 river water samples. The 33 bacterial isolates were selected for biochemical identification and to determine their antibiotic resistance profile. Results revealed that all 33 belonged to *gammaproteobacteria*, whereas the AutoScan-4 analysis revealed 16 different Gram-negative genera and species. Isolates were identified as belonging to the *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Vibrionaceae*, and *Moraxellaceae* families (Table 2).

**Table 2.** Identified bacterial isolates recovered from freshwater at Bassaseachic Falls National Park during 2013.

Family	Isolate Identification and References <sup>1</sup>	Number of Isolates	Sampling Site	Sampling Season
Enterobacteriaceae	<i>Aeromonas hydrophila</i> (Chester) Stanier [20]	1	3	Autumn
	<i>Citrobacter freundii</i> Werkman & Gillen [21,22]	2	2,5	Summer–Winter
	<i>Enterobacter cloacae</i> Jordan/Hormaeche [21]	3	1,3,6	Autumn–Winter
	<i>Escherichia coli</i> Escherich [21]	7	1,6,11,13	Spring-Summer-Autumn-Winter
	<i>Hafnia alvei</i> Möller [22]	3	1,2,3	Summer-Autumn
	<i>Klebsiella oxytoca</i> Flügge/Lautrop [21]	4	1,8,10,11	Spring-Summer
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Uber [21]	1	11	Summer
	<i>Salmonella</i> spp. [23]	1	5	Autumn
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A (Ex Kauffmann & Edwards) Le Minor & Popoff [21,23]	2	1,12	Spring-Winter
	<i>Shigella</i> sp. Castellani & Chalmers [21]	1	13	Spring
	<i>Tatumella</i> sp. Hollis <i>et al.</i> [24]	1	13	Spring
	<i>Yersinia enterocolitica</i> (Schleifstein & Coleman) [25]	1	10	Spring
	Pasteurellaceae	<i>Pasteurella multocida</i> Pasteur [26] <sup>2</sup>	2	4,7
Vibrionaceae	<i>Vibrio cholerae</i> Pacini [21]	2	11,12	Summer-Autumn
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Fujino <i>et al.</i> /Sakazaki <i>et al.</i> [21]	1	8,11	Summer
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter lwooffii</i> Brisou & Prévot [27]	1	6	Winter

<sup>1</sup> References of diarrhea (including diarrhetic outbreaks) by the bacteria found in this study, linked to wastewater contamination to well water. <sup>2</sup> Infection is linked to an infected animal exposure, but in bacteremia cases, 50% of patients reported no contact with animals [26]

The antibiotic susceptibility analysis to detect multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) or pandrug resistant (PDR) bacteria among enterobacteria isolates was performed using 21 different antibiotics. By a proposed definition, any strain presenting a resistance phenotype in  $\geq 3$  classes of antibiotics is an MDR bacterium [28]. The breakpoint combo panel for each isolate showing lower inhibition by each exposed antibiotic is listed in Supplementary Material Table S1 [17,18]. Antibiotic resistance results are listed in Table 3 and Supplementary Material Tables S1 and S2. Accordingly to the resistance phenotype definition, we isolated five MDR bacteria: 2/4 bacteria were identified as *K. oxytoca* (77704370 and 77714372), 2/7 bacteria were identified as *E. coli* (77115010 and 77113010), and 1/3 bacteria were identified as *E. cloacae* (77103173). The individual profiles of the single isolates showing resistance to at least one antibiotic revealed that *Hafnia alvei* exhibited intrinsic antibiotic resistance against either cefuroxime (biotype 43005103) or cefazolin (biotypes 43005103, 43005103 and 76103172). Similarly, *Aeromonas hydrophila* biotype 60010150 exhibited resistance against trimetoprim-sulfamethoxazole and ampicillin-sulbactam, whereas *Tatumella* sp. (biotype 600000110) exhibited resistance against ampicillin or the ampicillin-sulbactam complex (Supplementary Table S2).

**Table 3.** Identification of enterobacteria demonstrating antibiotic resistance using the AutoScan ID panel database.<sup>1</sup>

Antimicrobial Category	Antimicrobial Agent	Antimicrobial Susceptibility	Species with Intrinsic Resistance to Antimicrobial Agents or Categories (51)a
Aminoglycosides	Gentamicin	S	All isolates
	Tobramycin	IR	<i>Escherichia coli</i> (1/7) (IR)
	Amikacin	R	<i>Escherichia coli</i> (1/7) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) (IR)
Antipseudomonal penicillin + $\beta$ -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid	R	<i>Escherichia coli</i> (1/7)
	Piperacillin-tazobactam (Pip/tazo)	R	<i>Enterobacter cloacae</i> (1/3) <i>Escherichia coli</i> (1/7) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4)
Carbapenems	Imipenem	IR	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) (IR) <i>Tatumella sp.</i> (1/1) (IR)
	Meropenem	S	All isolates
Non-extended spectrum Cephalosporin: 1st and 2nd generation cephalosporins	Cefazolin	R	<i>Escherichia coli</i> (1/7) <i>Escherichia coli</i> (1/7) (IR) <i>Klebsiella oxytoca</i> (2/4) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) (IR) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1/1) (Vibrionaceae)
	Cefuroxime	R	<i>Enterobacter cloacae</i> (1/2) <i>Escherichia coli</i> (1/7) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) (IR) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1/1) (Vibrionaceae) (IR)
Extended-spectrum Cephalosporin: 3rd and 4th generation cephalosporins	Cefotaxime or ceftriaxone	R	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1/1) (IR) <i>Citrobacter freundii</i> (1/2) (IR) <i>Enterobacter cloacae</i> (1/3) (IR) <i>Escherichia coli</i> (1/7) <i>Klebsiella oxytoca</i> (3/4) <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , serovar <i>Paratyphi A</i> (1/2)
	Ceftazidime	R	<i>Citrobacter freundii</i> (1/2) <i>Enterobacter cloacae</i> (1/3) <i>Escherichia coli</i> (1/7)
	Cefepime	R	<i>Escherichia coli</i> (1/7) <i>Enterobacter cloacae</i> (1/3) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) (IR)
Cephamecins	Cefotetan	R	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4)
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	R	<i>Escherichia coli</i> (2/7) <i>Escherichia coli</i> (1/7) (IR) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) (IR)
	Moxifloxacin	R	<i>Escherichia coli</i> (2/7) <i>Escherichia coli</i> (1/7) (IR) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) (IR)
	Levofloxacin	R	<i>Escherichia coli</i> (2/7) <i>Escherichia coli</i> (1/7) (IR) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , serovar <i>Paratyphi A</i> (1/2) (IR)
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulfamethoxazole	R	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1/1) <i>Escherichia coli</i> (3/7)

Table 3. Cont.

Antimicrobial Category	Antimicrobial Agent	Antimicrobial Susceptibility	Species with Intrinsic Resistance to Antimicrobial Agents or Categories (51) <sup>a</sup>
Monobactams	Aztreonam	R	<i>Citrobacter freundii</i> (1/2) (IR) <i>Enterobacter cloacae</i> (1/2) <i>Escherichia coli</i> (2/7) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4)
Penicillin	Ampicillin	R	<i>Escherichia coli</i> (2/7) <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , serovar Paratyphi A (1/2) (IR) <i>Shigella</i> sp. (1/1) <i>Tatumella</i> sp. (1/1) <i>Vibrio cholerae</i> (2/2) (Vibrionaceae)
Penicillin + β-lactamase inhibitors	Ampicillin-sulbactam	R	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1/1) <i>Enterobacter cloacae</i> (1/3) <i>Escherichia coli</i> (2/7) <i>Hafnia alvei</i> (2/3) (IR) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/4) <i>Shigella</i> sp. (1/1) <i>Tatumella</i> sp. (1/1)

<sup>1</sup> Enterobacteria were isolated from samples collected during 2013 at Bassaseachic Falls National park, Ocampo, Chihuahua, Mexico. See information regarding the biotypes in Supplementary Table S2. Antimicrobial categories: R = resistant; S = susceptible; IR = Intermediate resistance.

An evaluation of the antibiotic resistance of the antibiotic tested revealed that all 33 isolates were susceptible to gentamicin, imipenem, meropenem and tobramycin. In addition, 3% to 6.1% of the isolates presented intermediate resistance to most other antimicrobials tested, including imipenem and tobramycin (Figure 4, Supplementary Table S2).

ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE

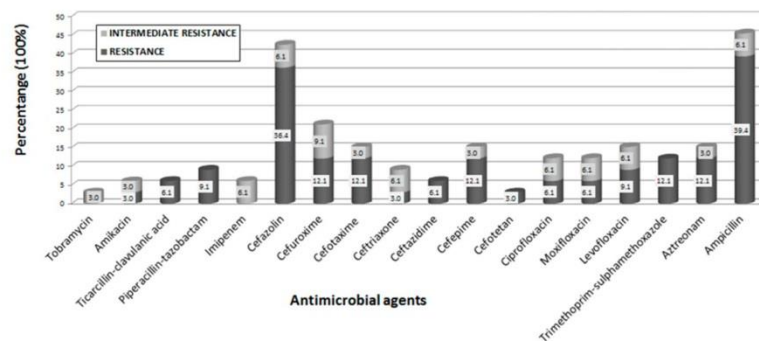


Figure 4. Antibiotic resistance profiles (%) among the isolates from samples collected during 2013 and sampling sites in the Bassaseachic Falls National park, Ocampo, Chihuahua, Mexico, using the AutoScan ID panel database.

Additionally, 39.4% of isolates were resistant to ampicillin; 36.4% of isolates were resistant to cefazolin; 21.2% of isolates were resistant to ampicillin-sulbactam; 12.1% of isolates were resistant to aztreonam, cefepime, cefotaxima, cefuroxima and trimethoprim-sulfamethoxazole; 9.1% of isolates were resistant to levofloxacin and piperacillin-tazobactam; and 6.1% of isolates were resistant to ceftazidime, ciprofloxacin, moxifloxacin and ticacillin-clavulanic acid. Only 3% of isolates were resistant to amikacin, cefotetan and ceftriaxone. In the present study, *Tatumella* sp. did not exhibit

resistance to any antibiotic tested; however, this bacterium exhibited intermediate resistance to imipenem, similar to the *K. oxytoca* isolate. In the present study, we identified one *E. coli* isolate exhibiting intermediate resistance to tobramycin (Supplementary Table S2). The antibiotic resistance profiles comparing freshwater native and enterobacterial species/biotypes collected at Basaseachi river revealed intermediate resistance in 48% (16/33) of all isolates detected in the present study (Supplementary Table S2).

#### 4. Discussion

Basaseachi river and waterfalls is the second-highest waterfall (807 feet tall) in Mexico and is located in the Bassaseachic Falls National Park at Cañon Basaseachi in the Copper Canyon region of northwest Mexico, near Creel, Chihuahua. Diarrheic outbreaks have been observed among inhabitants of this area, whom lack to access to non-contaminated water and appropriate sewage disposal. Unfortunately, clinical official data are not available due to ill inhabitants' poverty and deficiencies in sample analyses. Moreover, medical facilities are insufficient and conventional antibiotic treatments are not quite effective to control the diarrhea symptoms. As a result, most ill people with acute diarrhea must go to other closer hospitals to get proper medical attention, being more difficult to get clinical data of Basaseachi inhabitants. These diarrheic outbreaks have prompted to evaluate the water contamination, looking after responsible microorganisms that may be related to this outbreak event, and if those microorganisms are resistant to the recommended antibiotics for diarrhea medical control (project approved by the National Commission of Protected Natural Areas CONANP/DR03/08/PN01/PROC0DES/1259/13). The aim of the present study was to identify the populations and antibiotic resistance profiles of coliforms present in the Basaseachi river and streams within the park to detect microbial contamination that may be resistant to conventional drug treatments. The samples were collected near rural settlements, including the waterfall well and the belvedere of Bassaseachic Falls National Park.

Mexican standard regulations established a limit of 1000 MPN/100 mL (3.5 MPN) fecal coliforms from sewage pollutants dumped in natural environments [19]. After analyzing the total coliform populations among the seasons, the highest population was detected during rainfall in the summer of 2013 (Figure 3A). For fecal coliform counts, autumn exhibited the highest value among the seasons of the year (Figure 3C). The results may indicate water movement during rain and higher temperatures (above 35 °C in daylight) during summer. In contrast, the lowest total coliform counts were observed in summer and winter as lower rain/humidity and temperatures (not higher than 20 °C) are present (Figure 3C). Davino *et al.* [29] reported similar results after analyzing the coliform counts in Jatiúca Beach, Brazil. These authors reported that the fecal coliform count was higher during the wet seasons (May, June, and July) than during the dry seasons (November, December, and January).

Analysis of the data for total and fecal coliform enumerations at the sampling sites revealed that, except for sampling sites 9, 10, and 12, the collected samples possessed more than 1000 MPN/100 mL (3.5 MPN) fecal coliforms during the autumn and summer seasons (Figure 2A,B). Samples 6 and 8 were collected near the biggest rural settlements, and sample 11 was obtained from an oxidation lagoon that might be filtered into the Bassaseachic Falls National Park River. Sample 9, which exhibited the lowest coliform count, was collected from a rural settlement belonging to the park keepers and inhabited by approximately 20 people. This site was likely associated with lower sanitary discharges and fecal pollution (Figure 2A,B).

A total of 33 Gram negative isolates showing macroscopic and microscopic differences (*gamma-proteobacteria*) were selected to identify enterobacteria populations present in the Bassaseachic Falls National Park River. Biochemical identification analyses grouped them in 16 different genera and species from the *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Vibrionaceae*, and *Moraxellaceae* families (Table 2). Selected isolates identified in the present study are commonly reported in epidemic water outbreaks in developing countries [4,9,30], thereby explaining the diarrhea outbreaks observed among the Basaseachi waterfalls inhabitants, primarily the children. Gastrointestinal diseases were associated



with most bacterial pathogens found in this study, and linked with wastewater contamination to well water (Table 2). The identified genera included *Escherichia*, a fecal indicator of polluted waters [31]. Furthermore, the presence of *Shigella* sp., a strictly human pathogen, may also be associated with human fecal pollution [32]. Bacterial pathogens are considered water pollutants (biological contaminants) due to the run-off from urban and agricultural areas, leakage from sewers and septic systems, and sewer overflows [33]. The presence of *Salmonella* sp. in food and water is considered a Public Health risk, since such as bacterium is not a common water inhabitant [34].

*Salmonella* is the most frequent causative agent of bacterial gastroenteritis [34,35]. It is difficult to isolate from environmental water samples; nevertheless, the presence of *Salmonella* represents a Public Health risk as the infective dose can be as low as 15 to 100 bacterial cells per milliliter [34]. Furthermore, chicken is a major vehicle for the transmission of this bacterium, which is considered a major problem in the poultry industry [35]. The chicken poultry breeding is a common practice within the Basaseachi river inhabitants.

In addition, *Yersinia* has been associated with seafood contamination and water outbreaks, whereas *E. coli* O157:H7, frequently isolated from waters worldwide, has been identified in 2% of raw sludge [32]. Multidrug resistance patterns have been also detected in *E. coli* isolates isolated from river water in Osun State, Nigeria [36] and from the holy city of Mathura, India [37].

Nevertheless, seven of our enterobacterial isolates are rarely pathogens, but they were observed in nosocomial infections, mostly among immunosuppressed patients [21]. Diseases related with these less common enteropathogens include acute diarrheas, gastroenteritis, septicemia, meningitis, and wound infections by *A. hydrophila* [20,21]; diarrhea by *C. freundii* (after having or acquiring the ability to produce an enterotoxin) [21,22]; community-acquired and nosocomial infections such as urinary tract infections and bacteremia by *E. cloacae* [21]; acute diarrhea and Traveler's diarrhea by *Hafnia alvei* [38]; nosocomial intestinal and urinal infections by *K. oxytoca* [21]; gastroenteritis by *Tatumella* sp. [24]; and gastritis, cellulitis, endocarditis, endophthalmitis by *A. lwoffii* [27]. The only isolated bacterium that has not been associated with water contamination, but by an infected animal direct contact is *P. multocida*. Nevertheless, in a 30-year study, the Detroit Medical Center observed this bacterium causing infections in 14 patients, half of which reported no contact with animals [26].

As stated before, *Klebsiella* members are opportunistic nosocomial pathogens; only *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* are human pathogens. Hospital outbreaks frequently result from a new strain type of multidrug-resistant *Klebsiella* sp. Among the environmental water samples, the number of *Klebsiella* spp. was low (usually one to five colony-forming units [CFU]/250 mL), regardless of season. Podschun *et al.* [39] reported that among the *Klebsiella* sp. isolated, *K. pneumoniae* was the most common (52%), followed by *K. oxytoca* (27%). In the present study, the *K. oxytoca* population was higher (four isolates) compared with the *K. pneumoniae* population (one isolate). In addition, 50% of the *K. oxytoca* isolates (2/4) were identified as multidrug-resistant bacteria.

As previously described, after two or more isolates from the same sampling point were identified as identical (same biotype flinging number), only one isolate was selected for further analyses. Seven of 33 isolates total were identified with the same biotype, thus suggesting they were similar strains; however, these strains were isolated from different sample points and did not present the same resistance profile [1,40].

*A. lwoffii*-like species are commonly isolated from pelletized food, and *A. hydrophila* has been associated with fish disease [20,41], whereas the *Tatumella* sp. [42] has been associated with soil inhabitants [43]. Similarly, *H. alvei* has been isolated from mammals, birds, reptiles, fish, soil, water, and sewage samples. These enteric bacteria are considered non-human-associated bacteria and rare opportunistic pathogens [38]. *A. lwoffii*, *A. hydrophila*, and *Tatumella* sp. are saprophyte bacteria. In the wild, these microbes are not considered human health risk bacteria [7,44].

In the present study, we evaluated the antibiotic susceptibility of 33 selected enterobacterial isolates from the collected freshwater samples to identify bacteria considered as Public Health threats by showing multidrug resistance patterns. According to the international standard definitions for any

MDR microorganism [28], we isolated five MDR bacteria; two isolates were identified as *K. oxytoca*, two as *E. coli*, and one as *E. cloacae*. Nevertheless, same genera and species isolates were identified, representing the 50% (2/4) the MDR isolates identified as *K. oxytoca*, 28.57% (2/7), the MDR isolates identified as *E. coli* and 33.33% (1/3) the MDR isolate identified as *E. cloacae*. This pattern of resistance to several key antibiotics commonly used in therapeutic treatments is considered a public health threat [28]. Similarly, MDR isolates from the *Enterobacteriaceae* family have been identified in the Almendares River in Cuba [45]. As mentioned above, from 33 isolates, seven presented a similar biotype; however, identical isolates did not possess the same resistance profile, thus indicating a potential antibiotic resistance selection [1,40,44].

Active antibiotics can be discharged in considerable amounts in the forms of human waste. Native bacteria in natural environments can be exposed to these antibiotics, particularly those with higher persistence in the environment, such as fluoroquinolones and tetracyclines. Fluoroquinolones and tetracyclines are more stable and remain in the environment for longer periods of time, facilitating bacterial antibiotic resistance selection [46]. The increasing rate of antibiotic-resistant microorganisms is recognized as a serious ecological problem [47].

Overall, the results of the present study demonstrated that the antibiotic resistance patterns detected in the isolates collected from Bassaseachic Falls National Park, may be the reason for the ineffective control using antibiotics to control gastrointestinal infections, resulting in lower alternatives for therapeutic treatments. Some of the identified bacteria in the present study were coliforms/enteropathogenic species, thus indicating a human or animal waste source. Animal and human waste, mostly generated in rural locations, is discharged into water bodies, and play an important role in diarrhea outbreaks observed within inhabitants of this northwest Mexican area.

## 5. Conclusions

Surface water samples from Bassaseachic Falls National Park revealed the presence of bacterial pathogens that are considered public health risks. Five isolates showing multidrug (antibiotic) resistance (MDR) profiles from this natural water environment were identified. Overall, the microorganisms detected may cause future problems and represent a health threat to the people who live near this park. MDR agents constitute a major threat to Public Health and should receive more attention. The monitoring of antibiotics resistance genes and the presence of resistant bacteria in the environment are increasingly viewed as ecological problems for which further studies are needed to provide solutions that preserve seasonal water bodies, such as ponds, rivers, lakes, and waterfalls, and their productive ecosystems.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/1660-4601/13/6/597/s1](http://www.mdpi.com/1660-4601/13/6/597/s1), Figure S1: Diagram of the microbiology analysis flux, Table S1: Interpretative breakpoints, Table S2: Native and enterobacterial species/biotypes isolated from freshwater samples collected from the Bassaseachic National Park, México.

**Acknowledgments:** This project was financially supported through grants from the Laboratorio de Inmunología y Virología, in Facultad de Ciencias Biológicas at Universidad Autónoma de Nuevo León, México (DEMI-FCB-UANL), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (scholarship to MCEdG and project CB2010/155771 to PTG), Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH) and Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) (project CONANP/DR03/08/PN01/PROCODES/1259/13) to RIR. The authors would like to thank Noé Ortega Corral and Guillermo Delgado Gardea from the University of Texas at El Paso (UTEP) for technical advice and Blanca Alanís Rodríguez and Alan Muñoz Payán for technical support.

**Author Contributions:** Ma. Carmen E. Delgado-Gardea carried out the biological analysis, worked on the microbiology characterization and drafted the manuscript, Patricia Tamez-Guerra participated in the design of the study, and drafted the manuscript, Ricardo Gómez-Flores characterized the community of microorganisms and worked on the manuscript, Francisco Javier Zavala-Díaz De La Serna participated in the design of sampling sites, Gilberto Erosa-de La Vega participated on the characterization of multidrug resistance bacteria, Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón participated in the design of the study, performed statistical analysis and worked on the manuscript, Blanca Sánchez-Ramírez and María Del Carmen González-Horta participated on the biological activity, María Concepción Pérez-Recoder facilitate field installations as representative of CONANP and Rocio Infante-Ramírez conceived the study, worker on data analysis and worked on the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that there are no conflict of interest.

## References

1. Baquero, F.; Martínez, J.L.; Cantón, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 260–265. [CrossRef] [PubMed]
2. Korzeniewska, E.; Korzeniewska, A.; Harnisz, M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2013**, *91*, 96–102. [CrossRef] [PubMed]
3. Figueras, M.J.; Borrego, J.J. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 4179–4202. [CrossRef] [PubMed]
4. Ashbolt, N.J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* **2004**, *198*, 229–238. [CrossRef] [PubMed]
5. World Health Organization. Diarrhoeal Disease Fact Sheet. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/> (accessed on 31 March 2016).
6. Amdiouni, H.; Maunula, L.; Hajjami, K.; Faouzi, A.; Soukri, A.; Nourilil, J. Recovery comparison of two virus concentration methods from wastewater using cell culture and real-time PCR. *Curr. Microbiol.* **2012**, *65*, 432–437. [CrossRef] [PubMed]
7. Edqvist, L.; Pedersen, K. Antimicrobials as growth promoters: Resistance to common sense. In *Late Lessons from Early Warnings: The Precautionary Principle 1896–2000*; Harremoës, P., Gee, D., MacGarvin, M., Stirling, A., Keys, J., Wynne, B., Guedes Vaz, S., Eds.; European Environmental Agency: Copenhagen, Denmark, 2001; pp. 93–100.
8. Brown, M.G.; Balkwill, D.L. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microb. Ecol.* **2009**, *57*, 484–493. [CrossRef] [PubMed]
9. Gesche, E.; Vallejos, A.; Sáez, M. Eficiencia de anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). *Arch. Med. Vet.* **2003**, *35*, 99–107. [CrossRef]
10. Bush, K.; Courvalin, P.; Dantas, G.; Davies, J.; Eisenstein, B.; Huovinen, P.; Jacoby, G.A.; Kishony, R.; Kreiswirth, B.N.; Kutter, E.; et al. Tackling antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 894–896. [CrossRef] [PubMed]
11. Port, J.A.; Cullen, A.C.; Wallace, J.C.; Smith, M.N.; Faustman, E.M. Metagenomic frameworks for monitoring antibiotic resistance in aquatic environments. *Environ. Health Perspect.* **2014**, *122*, 222–228. [CrossRef] [PubMed]
12. Munir, M.; Wong, K.; Xagorarakis, I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res.* **2011**, *45*, 681–693. [CrossRef] [PubMed]
13. Diario Oficial de la Federación (1994). NOM-014-SSA1-1993. Procedimientos Sanitarios para el Muestreo de Agua para uso y Consumo Humano en Sistemas de Abastecimiento de Agua Públicos y Privados. Secretaría de Salud. México, D.F. Available online: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html> (accessed on 14 June 2016).
14. Diario Oficial de la Federación (2005). Proyecto PROY-NMX-AA-042-SCFI-2005. Calidad del Agua.-Determinación del Número más Probable (NMP) de Coliformes Totales, Coliformes Fecales (Termotolerantes) y *Escherichia coli* Presuntiva (Cancelará a la NMX-AA-042-1987). México, D.F. Available online: <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/nmx-AA-05/proy-nmx-aa-042-scfi-2005.pdf> (accessed on 14 June 2016).
15. Al-Bayatti, K.K.; Al-Arajy, K.H.; Al-Nuaemy, S.H. Bacteriological and physicochemical studies on Tigris River near the water purification stations within Baghdad Province. *J. Environ. Public Health* **2012**, *2012*, 695253. [CrossRef] [PubMed]
16. Rhodes, J.B.; Smith, H.L.; Ogg, J.E. Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* serovars from surface waters in western Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 1216–1219. [PubMed]
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard. *CLSI document M07-A10*; Wayne, PA, USA, 2015, 10th ed. Available online: [http://shop.clsi.org/site/Sample\\_pdf/M07A10\\_sample.pdf](http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M07A10_sample.pdf) (accessed on 31 March 2016).
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLSI Document M100-S24*; Wayne, PA, USA, 2014. Available online: [http://ncipd.org/control/images/NCIPD\\_docs/CLSI\\_M100-S24.pdf](http://ncipd.org/control/images/NCIPD_docs/CLSI_M100-S24.pdf) (accessed on 31 March 2016).



19. Diario Oficial de la Federación. (1997) DOF-001-ECOL-1996, que Establece los Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en las Descargas de Aguas Residuales a los Sistemas en Aguas y Bienes Nacionales. Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F. Available online: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997) (accessed on 14 June 2016).
20. Agger, W.A.; McCormick, J.D.; Gurwith, M.J. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **1985**, *21*, 909–913. [PubMed]
21. Cabral, J.P. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 3657–3703. [CrossRef] [PubMed]
22. Abbott, S.L.; Janda, J.M. Revisiting bacterial gastroenteritis: Issues, possible approaches, and an ever-expanding list of etiologic agents, Part II. *Clin. Microbiol. Newslett.* **2011**, *33*, 79–86. [CrossRef]
23. Threlfall, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: Problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, *26*, 141–148. [CrossRef] [PubMed]
24. Janda, J.M.; Abbot, S.L. Uncommon enterobacterial genera associated with clinical specimens. In *The Enterobacteria*, 2nd ed.; American Society Microbiology: Washington, DC, USA, 2006; pp. 357–375.
25. Thompson, J.S.; Gravel, M.J. Family outbreak of gastroenteritis due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 from well water. *Can. J. Microbiol.* **1986**, *32*, 700–701. [CrossRef] [PubMed]
26. Poblete, J. *Pasteurella multocida* bacteremia: Concern remains even in the absence of direct animal contact. *Inf. Dis. Clin. Pract.* **2009**, *17*, 77. [CrossRef]
27. Heéger, Z.; Vargha, M.; Márialigeti, K. Detection of potentially pathogenic bacteria in the drinking water distribution system of a hospital in Hungary. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 89–92. [CrossRef]
28. Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [CrossRef] [PubMed]
29. Davino, A.M.; Melo, M.B.; Caffaro Filho, R.A. Assessing the sources of high fecal coliform levels at an urban tropical beach. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 1019–1026. [CrossRef] [PubMed]
30. Hassan, K.E.; Mansour, A.; Shaheen, H.; Amine, M.; Riddle, M.S.; Young, S.Y.; Sebeny, P.; Levin, S. The impact of household hygiene on the risk of bacterial diarrhea among Egyptian children in rural areas, 2004–2007. *J. Infect. Dev. Countr.* **2014**, *8*, 1541–1551. [CrossRef] [PubMed]
31. Payment, P.; Locas, A. Pathogens in water: Value and limits of correlation with microbial indicators. *Ground Water* **2011**, *49*, 4–11. [CrossRef] [PubMed]
32. Van den Bogaard, A.E.; Stobberingh, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *14*, 327–335. [CrossRef]
33. Girones, R.; Ferrús, M.A.; Alonso, J.L.; Rodríguez-Manzano, J.; Calgua, B.; de Abreu Corrêa, A.; Hundesa, A.; Carratala, A.; Bofill-Mas, S. Molecular detection of pathogens in water—The pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* **2010**, *44*, 4325–4339. [CrossRef] [PubMed]
34. Sidhu, J.P.; Toze, S.G. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ. Int.* **2009**, *35*, 187–201. [CrossRef] [PubMed]
35. Grant, A.; Hashem, F.; Parveen, S. *Salmonella* and *Campylobacter*: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. *Food Microbiol.* **2016**, *53*, 104–109. [CrossRef] [PubMed]
36. Titilawo, Y.; Obi, L.; Okoh, A. Occurrence of virulence gene signatures associated with diarrhoeagenic and non-diarrhoeagenic pathovars of *Escherichia coli* isolates from some selected rivers in South-Western Nigeria. *BMC Microbiol.* **2015**, *15*, 204. [CrossRef] [PubMed]
37. Amit, A.; Kumar, A.; Kumar, M.; Rahal, A. Multidrug resistant pathogenic *Escherichia coli* status in water sources and Yamuna River in and around Mathura, India. *Pak. J. Biol. Sci.* **2014**, *17*, 540–544. [CrossRef]
38. Miranda, C.D.; Zemelman, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci. Total Environ.* **2002**, *293*, 207–218. [CrossRef]
39. Podschun, R.; Pietsch, S.; Höller, C.; Ullmann, U. Incidence of *klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 3325–3327. [CrossRef] [PubMed]
40. Sayah, R.S.; Kaneene, J.B.; Johnson, Y.; Miller, R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1394–1404. [CrossRef] [PubMed]

41. Debarry, J.; Garn, H.; Hanuszkiewicz, A.; Dickgreber, N.; Blümer, N.; von Mutius, E.; Bufe, A.; Gatermann, S.; Renz, H.; Holst, O.; et al. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2007**, *119*, 1514–1521. [CrossRef] [PubMed]
42. Hollis, D.G.; Hickman, F.W.; Fanning, G.R.; Farmer, J.J., III; Weaver, R.E.; Brenner, D.J. *Tatumella ptyseos* gen. nov., sp. nov., A member of the family Enterobacteriaceae found in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **1981**, *14*, 79–88. [PubMed]
43. Toranzos, G.; Marcos, R. Human enteric pathogens and soil borne-disease. In *Soil Biochemistry*; Bollag, J.-M., Stotzky, G., Eds.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 2000; pp. 461–481.
44. Kellfy, B.G.; Vespermann, A.; Bolton, D.J. Gene transfer events and their occurrence in selected environments. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 978–983. [CrossRef] [PubMed]
45. Graham, D.W.; Olivares-Rieumont, S.; Knapp, C.W.; Lima, L.; Werner, D.; Bowen, E. Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares River near Havana, Cuba. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 418–424. [CrossRef] [PubMed]
46. Larsson, D.G. Antibiotics in the environment. *Upsala J. Med. Sci.* **2014**, *119*, 108–112. [CrossRef] [PubMed]
47. Iliev, I.; Marhova, M.; Gochev, V.; Tsankova, M.; Trifonova, S. Antibiotic resistance of Gram-negative benthic bacteria isolated from the sediments of Kardzhali Dam (Bulgaria). *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29*, 274–280. [CrossRef] [PubMed]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).