



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“MONITOREO DE GENES DE VIRULENCIA DE *E. coli*
EN EL RIO ALSESECA”**

TESIS

Que para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

VICTOR ALFARO MARTÍNEZ

Director de Tesis:

D.C. EDITH CHÁVEZ BRAVO

**Asesores: Dr. Alejandro Isaías Augusto Alonso
Calderón**

Ing. Antonio Herrera Bonilla

Noviembre 2019

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE GRAFICAS	6
I. RESUMEN	8
II. INTRODUCCIÓN	10
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general.	16
4.2 Objetivos particulares.....	16
V. HIPÓTESIS	18
5.1 H1	18
5.2 H0	18
VI. MARCO TEÓRICO.....	20
6.1 Problemática mundial y nacional del agua residual.....	20
6.2 Antecedentes del Rio Alseseca.	21
6.3 Indicadores de contaminación.....	23
6.4 Patogrupos diarrogénicos de <i>Escherichia coli</i>	24
6.5 ETEC.....	24
6.6 EPEC	25
VII. METODOLOGÍA	28
7.1 Área de estudio	28
7.2 Zona de Muestreo	28
7.3 Material utilizado para la toma de muestra.....	29
7.4 Preparación de la muestra para su estudio microbiológico.....	29
7.5 Concentrado de la muestra.	29
7.6 Extracción de DNA de la muestra de agua.....	30
7.7 Caracterización molecular de cepas <i>E. coli</i>	30
VIII. RESULTADOS.....	34
8.1 Recolección de muestras de agua residual.	34

8.2 Registro del monitoreo del agua residual del río Alseseca.	35
8.3 Validación de los tres métodos de extracción de DNA.....	35
8.4 Elección del método de extracción de DNA.....	36
8.5 Detección de cepas patógenas de <i>E. coli</i> (ETEC y EPEC) en las muestras de agua del río Alseseca.	37
8.7 Genes específicos de virulencia de <i>E.coli</i> enterotoxigenica (ETEC) en el rio Alseseca.	38
8.8 Expresión de genes de virulencia de ETEC y de EPEC en las muestras de agua residual del rio Alseseca.	39
8.9 Detección molecular de cepas EPEC y ETEC mediante la amplificación de sus genes específicos	39
8.1.1 Amplificación de los genes de virulencia <i>st</i> , <i>lt</i> , <i>bfpA</i> y <i>eaeA</i>	41
8.1.2 Muestras de agua residual con la detección molecular de los genes de virulencia: <i>st</i> , <i>lt</i> , <i>bfpA</i> y <i>eaeA</i>	41
8.1.3 Monitoreo anual de los genes de virulencia de ETEC y EPEC	43
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	46
9.1 Recuperación y detección de cepas patógenas de <i>E. coli</i> en agua residual.....	46
9.2 Monitoreo de los patotipos EPEC y ETEC en aguas residuales	48
9.3 Determinación de genes que expresan factores de virulencia de ETEC y EPEC	50
X. CONCLUSIÓN.....	54
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. "Secuencias de los cebadores que serán utilizados en la amplificación." _____ 31

Tabla 2. "Temperaturas utilizadas para replicar los amplicones característicos de ETEC Y EPEC." _____ 31

Tabla 3. "Las claves de muestreo se utilizó para poder identificar y tener un control de las 24 muestras de aguas residuales del río Alseseca, anotando el día, lugar, hora y clave de cada muestra." _____ 35

Tabla 4. "Genes de virulencia, específicos para E. coli enteropatogena EPEC: eaeA y BfpA y E. coli enterotoxigénica ETEC: st y lt." _____ 40

Tabla 5. "Niveles permitidos de E. coli en diferentes tipos de agua." ____ 48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. "Zona de muestreo, Rio Alseseca Puebla Pue." _____	28
Figura 2. "Vista satelital de la zona de muestreo" _____	34
Figura 3. "Zona de muestreo" _____	34
Figura 4. Extracción de DNA total por: a) KIT, b) Choque térmico y c) Método químico _____	36
Figura 5. "Gel de agarosa con los amplicones de los genes de virulencia de ETEC y EPEC" _____	41
Figura 6. "Gel de agarosa con los amplicones de los genes de virulencia de ETEC" _____	42
Figura 7. "Gel de agarosa con los amplicones eaeA y bfpA. Carril M: marcador de peso molecular (1 Kb), 1: gen eaeA, 2: gen bfpA" _____	42

ÍNDICE GRAFICAS

Gráfica 1. "Comparación de la detección de cepas EPEC y ETEC en las muestras de agua residual del río Alseseca." _____ 37

Gráfica 2. "Comparación de los genes específicos de E.coli enteropatógena bfpA y eaeA en las muestras de agua residual del río Alseseca." _____ 38

Gráfica 3. "Comparación de la existencia de los genes específicos de E.coli enterotoxigenica st y lt en el agua residual del río Alseseca." _____ 38

Gráfica 4. "Muestras de agua con expresión de genes específicos de ETEC y EPEC: lt, st, eaeA y bfpA." _____ 39

Gráfica 5. "Detección molecular por genes de virulencia de E. coli Enterotoxigénica (ETEC); st, lt y de E. coli enteropatógena (EPEC); eaeA, bfpA." _____ 40

Gráfica 6. "Genes específicos de virulencia de E. coli ETEC (st y lt) Y EPEC (eaeA y bfpA)." _____ 43

Gráfica 7. "Genes específicos de virulencia de ETEC Y EPEC en las diferentes estaciones del año." _____ 44

RESUMEN

I. RESUMEN

En la actualidad, existe una gran preocupación a nivel mundial, debido al considerable incremento en los índices de contaminación de los efluentes. La contaminación de los cuerpos de agua debido a los desechos que se producen en los diversos sectores industriales y en la población doméstica genera un problema ambiental y de salud pública. La contaminación biológica en el agua residual por bacterias patógenas, representa un foco de infección para adquirir enfermedades infecto-contagiosas como las enfermedades diarreicas, éstas son causa principal de mortalidad y morbilidad en la niñez del mundo y frecuente en países en desarrollo como México. El río Alseseca de la Ciudad de Puebla se ha convertido en receptor de descargas industriales y domésticas, siendo la carga microbiana uno de los contaminantes más persistentes.

Los patogrupos diarrogénicos de *E. coli* como la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC), son agentes causales de brotes diarreicos. Por lo que el objetivo de este trabajo fue monitorear los genes específicos de los patogrupos ETEC y EPEC en el agua residual del río Alseseca. Para ello se recolectaron muestras del agua residual en las coordenadas del río 18°59'43.2"N 98°11'12.3"W durante 1 año. De cada muestra de agua se extrajo DNA total, ayudado por un Kit Sample Power Viral Environmental. Después se utilizaron primers específicos para amplificar los genes específicos por PCR. De un total de 24 muestras de agua residual, se detectó que el 46% de las muestras presentaron los dos genes de virulencia de ETEC, el 25% presentó ambos genes de virulencia de EPEC, el 21% solo un gen de virulencia y el 8% no se hallaron los genes. El agua residual del río Alsesca presentó una contaminación biológica con el

92% por ETEC y EPEC, lo que sugiere atención para el saneamiento del agua residual y evitar brotes diarreicos.

INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

La contaminación provocada por ser humano en los cuerpos de agua, ha generado una problemática a nivel mundial (Larrea. 2013), debido a que los desechos antropogénicos se vierten a estos cuerpos hídricos con escaso o nulo tratamiento; la existencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos conllevan a una compleja contaminación (Bonilla. 2015). La contaminación biológica del agua causada por patógenos se ha visto implicada en el aumento del número de enfermedades infecciosas. Entre las bacterias existentes en el agua residual, existen diversos agentes etiológicos causantes de diarreas como son los patogrupos diarrogénicos de *E. coli*, que son los primeros agentes bacterianos responsables de grandes índices de morbilidad y mortalidad con el 30 al 40% de los casos de diarrea en niños menores de un año, su transmisión es por vía fecal-oral o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. (Estrada. 2009; Paniagua. 2007). En México la contaminación del agua se deriva de la deficiencia en los sistemas de tratamiento de aguas residuales y medios de saneamiento, ocasionando problemas en la salud pública como el aumento de las enfermedades gastrointestinales en niños menores de cinco años. Entre los patógenos bacterianos causantes de estas enfermedades encontramos los patotipos de *E. coli* diarrogénicas como ETEC y EPEC (Ruvalcaba 2017).

En la Ciudad de Puebla el río Alseseca se ha convertido en un cuerpo receptor de desechos sólidos y de descargas de aguas residuales municipales e industriales a lo largo de su recorrido, provocando degradación y contaminación (Corona, 2013). La propuesta de utilizar técnicas moleculares para detectar genes específicos de patógenos es una herramienta factible y certera que permite identificar patógenos como ETEC Y EPEC. Con base a lo anterior, surge la necesidad de realizar la presente

investigación para determinar la contaminación de genes de virulencia de ETEC y EPEC, ya que ninguna norma mexicana regula la presencia de dichos genes en aguas residuales.

JUSTIFICACIÓN

III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, las muertes de niños bajo cinco años de edad han disminuido; no obstante, las cifras aún son alarmantes. Entre las primeras causas de muerte por infecciones se encuentran la neumonía, seguida por diarrea y malaria¹⁻³. Datos obtenidos de análisis sistemáticos, demostraron que entre los años 2010 y 2011 se presentaron entre 7,6 y 6,9 millones de muertes de niños bajo cinco años de edad, respectivamente. El 9,9% de esas muertes fue a causa de la diarrea, Rotavirus, calicivirus, *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enterotoxigénica causaron más de la mitad de los casos. (Farfán y col. 2016)

La Norma Oficial Mexicana (NOM) establece la calidad microbiológica del agua residual mediante la identificación de coliformes totales y coliformes fecales y la presencia y/o ausencia de *E. coli*, sin en cambio la NOM no establece la presencia de bacterias patógenas como los patotipos diarrogénico de *E. coli* , por lo que el determinar los patógenos en el agua proporcionaría herramientas indispensables para establecer si el agua residual es reservorio de patógenos involucrados en enfermedades infectocontagiosas, así mismo permitiría la toma de decisiones para el tratamiento y/o control del agua residual de las industrias o de desechos domésticos.

Sin embargo, existe un consenso general sobre la dificultad de determinar la presencia de todos los microorganismos patógenos presentes en las aguas contaminadas, ya que dicha determinación implicaría varios días de análisis, costos elevados, y la existencia de personal y laboratorios especializados. Frente a estas dificultades y a la necesidad de evaluar de forma rápida y confiable la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con genes de virulencia específicos de bacterias *E. coli* diarrogénicas como indicadores. El empleo de las bacterias indicadoras de contaminación fecal es un método aceptado universalmente.

Entre los microorganismos más utilizados con estos fines se encuentran los coliformes totales, los coliformes termotolerantes, la especie *Escherichia coli* y los enterococos, debido al origen intestinal de todos ellos. (Romeu Alvarez, 2012)

Este estudio se enfoca a determinar la presencia de *E. coli* en aguas residuales del río Alseseca. Buscado principalmente los patotipos; *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* Enteropatógena (EPEC). Ya que los genes de virulencia específicos de estos patotipos ya mencionados, son la causa principal de mortalidad en niños menores de 5 años. Además, el estudio también pretende proponer un método de extracción de DNA con la finalidad de facilitar la detección ya que podemos considerar la bacteria *E. coli* como un indicador de contaminación en aguas residuales.

OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Determinar la presencia de genes de virulencia de *E. coli* en el río Alseseca

4.2 Objetivos particulares.

- Determinar las características geográficas de la zona de muestreo.
- Elección y validación de un método de extracción de DNA total del agua residual del río Alseseca
- Realizar un monitoreo anual del agua residual y determinar la presencia de ETEC y EPEC.
- Amplificar los genes de virulencia específicos a ETEC y EPEC mediante la técnica de PCR.

HIPÓTESIS

V. HIPÓTESIS

5.1 H1

La presencia de genes de virulencia de *E. coli* en el agua residual del río Alseseca, permanece constante durante el ciclo anual lo que puede representar un riesgo a la salud humana.

5.2 H0

La presencia de los genes de virulencia de *E. coli*, en el agua residual del río Alseseca fluctúa durante el ciclo anual y en algunas temporadas anuales puede representar un riesgo a la salud humana.

MARCO TEÓRICO

VI. MARCO TEÓRICO

6.1 Problemática mundial y nacional del agua residual.

El agua es uno de los recursos más apreciados e imprescindibles del planeta y por lo mismo es ampliamente utilizada en actividades tales como la agricultura (70% al 80%), la industria (20%), el uso doméstico (6%), entre otras. Siendo así de vital importancia mantener una buena calidad del agua, así como conservar las fuentes naturales, asegurando de esta manera que las futuras generaciones puedan tener acceso a este recurso. (Arcos Pulido, 2005)

En todo el mundo, se presentan muchos ejemplos de ríos y lagos con problemas de contaminación, sin embargo, los ríos: Amarillo en China, el Ganges en la India y el Amur Daria en Asia Central son considerados los casos típicos y graves de contaminación. Lamentablemente México no se queda atrás, pues tiene vario ríos y lagos con serios problemas de contaminación, por ejemplo: el Lerma, el Santiago, el Pánuco, el Balsas, el Tijuana (Valencia y col. 2011)

Esta contaminación del agua se origina principalmente por el vertido de aguas residuales de origen doméstico e industrial, siendo los residuos domésticos los que aportan altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal. (Arcos Pulido, 2005) Dentro de estos últimos encontramos patógenos capaces de causar enfermedades como son virus, protozoos y bacterias. La falta de saneamiento de estas aguas tiene impacto en un gran número de muertes por enfermedades como la diarrea y la gastroenteritis, ubicándose dentro de las tres principales causas de muerte a nivel mundial y en Latinoamérica (Peña y col. 2014)

En México el crecimiento de la población urbana que ha acompañado al proceso de urbanización y metropolización se ha traducido en nuevos asentamientos humanos, ciudades y por consiguiente, en un acelerado

crecimiento de la demanda de servicios, en particular de los servicios urbanos de agua potable, drenaje y saneamiento, lo que se ha convertido en fuertes presiones, escasez de agua, coberturas irregulares, calidad deficiente y generación de grandes volúmenes de aguas residuales que provocan altos niveles de contaminación ambiental y problemas de salud. En México, las enfermedades diarreicas ocupan uno de los primeros lugares en la morbilidad de niños menores de cinco años, y generan 7.4% en la demanda de consultas en los servicios de salud y 10% de las hospitalizaciones pediátricas. Así mismo, su transmisión y frecuencia se relaciona con la falta de higiene y la pobreza, al igual como la desnutrición y malas condiciones sanitarias. (Dávila y col. 2012)

La ciudad de Puebla, México, capital del estado con el mismo nombre a través la Secretaría de Sustentabilidad y Ordenamiento Territorial informó que sólo, sólo 35 de las 278 plantas de tratamiento de aguas residuales que se encuentran en el estado de Puebla funcionan y están dentro de la norma, debido a los altos costos que implica ponerlas en operación a los municipios que las tienen a su cargo. Por lo tanto, el incremento poblacional tanto a nivel nacional como a nivel mundial ha provocado que se generen grandes cantidades de aguas residuales que constituyen fuentes de contaminación que afectan a la salud humana y al medio ambiente. (Fernández y col. 2013)

6.2 Antecedentes del Río Alseseca.

La cuenca del río Alseseca está localizada entre las coordenadas 19°12'55.14" y 18°56'51.08" latitud norte y 98°02'00" y 98°11'.14" latitud oeste. La sub cuenca se localiza en la región número 18, denominada río balsas. La cuenca abarca diferentes municipios del estado de Puebla como lo son: San Miguel Canoa, Amozoc, San Francisco Teotimehuacan y Puebla, Puebla. (Romero, 2009)

El río Alseseca, aumenta su contaminación debido al incremento de desechos industriales y domésticos tales como: materia fecal y restos de alimentos que son vertidos a lo largo de su recorrido, convirtiéndose en cuerpo receptor de aguas residuales que fluyen de norte a sur. El Alseseca aporta un caudal medio anual de 0.8 metros cúbicos por segundo, que prácticamente son descargas del alcantarillado sanitario, y el 88 por ciento está integrado por ese tipo de desechos. (Chávez y col. 2011)

De acuerdo a información de la Comisión Nacional del Agua (Conagua), el Alseseca se ubica entre los ríos más contaminados del estado, incluso se le da la nominación de “tóxico”, las implicaciones que esto puede tener en la salud de las poblaciones aledañas a lo largo de toda su cuenca es evidente, debido a que los agentes involucrados en la transmisión hídrica son bacterias, virus y protozoos, que pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde gastroenteritis simple hasta casos fatales de diarrea, disentería, hepatitis y fiebre tifoidea. (Puntual, 2015)

El Alseseca actualmente recorre dos juntas auxiliares de la capital, atravesando más de 27 colonias, la mayor parte de ellas localizadas al suroriente de la ciudad de Puebla.

Desafortunadamente, como la mayoría de los ríos en el país, el crecimiento de la mancha urbana y la industrialización afectó el equilibrio ecológico del río.

Fue durante los años sesenta y ochentas, que empresas del sector textil comenzaron a preferir lugares cercanos al centro de la ciudad para instalarse, por lo que colonias como Santa Bárbara, El Chamizal y El Cristo; las cuales se ubican al margen del río Alseseca. Con el paso del tiempo, la mayor parte de dichas textileras cerraron, sin embargo el daño al Alseseca ya había comenzado. (Puntual, 2015)

Otro problema derivado de esta contaminación se presenta rumbo al sur, en el principal acceso a la Junta Auxiliar Ignacio Zaragoza, de esta ciudad, la cual es limitada por el mismo Alseseca, es el mal olor que emana proveniente desde el puente de la calle 15 oriente o 5 de febrero, la cual comunica la presidencia de dicha Junta Auxiliar, con la calle 30 sur, a la altura del Parque Ecológico, los olores que se perciben al medio día son fuertes y difíciles de explicar. (Corona 2013.)

6.3 Indicadores de contaminación.

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales). Una vez que se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración. (Castro y col. 2009). Los indicadores de contaminación son diferentes en cada país, en México, se establece con base en las concentraciones de bacterias CF en muestras de agua. (Barrera y col. 2013). La presencia de CF en el agua indica contaminación bacteriana reciente y constituye un indicador de degradación de los cuerpos de agua. (Arcos, 2005)

También se utilizan a los CT como indicadores de contaminación, aunque no siempre indican contaminación fecal reciente, ni son patógenos y *Escherichia coli*, debido a que son nativos del tracto digestivo de humanos y animales. Un dato relevante es que la presencia de CT indica presencia de suelo, sedimento u otra fuente de coliformes. Sin embargo no hay un número estándar de CT en cuerpos de agua superficiales, como los ríos. (Evangalina y col. 2011) Los indicadores de contaminación fecal han demostrado ser una buena alternativa frente a la dificultad que representa identificar y cuantificar los patógenos causantes de enfermedades de origen hídrico. (Campos y col. 2008)

6.4 Patogrupos diarrogénicos de *E. coli*.

E. coli es un habitante normal de la microbiota humana y/o animal, sin embargo, algunas cepas tienen el potencial de causar enfermedades graves en sus huéspedes. Los genes responsables de estos resultados son adquiridos a través de fagos, plásmidos o eventos laterales de transferencia génica, o generados por mutaciones. (Chandra y col. 2013) La diferencia entre cepas comensales y patógenas, depende de la presencia de material genético adquirido que codifique uno o más factores de virulencia; la generación de cepas virulentas de bacterias entéricas es la probable causa de la supervivencia de estos microorganismos, ya que la producción de heces diarreicas favorece la transmisión a otros seres humanos y/o animales (Dubreuil, 2012).

A las *E. coli* diarrogénicas según su patogénesis y características epidemiológicas, se les divide en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxina shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* difusamente adherente (DAEC). En conjunto son responsables del 30 a 40% de los episodios de diarrea aguda en niños en países en vías de desarrollo. (Ochoa y col. 2011)

6.5 ETEC.

Las cepas de ETEC se distinguen de los otros patotipos de *E. coli* diarrogénicas por su producción de enterotoxinas: termolábiles (*LT*) y/o termoestables (*ST*) (Chandraa et al 2013). ETEC puede producir una o ambas toxinas. Y también produce una serie de fimbrias que le confieren la capacidad de adherirse a los epitelios intestinales. Las fimbrias que con mayor frecuencia se encuentran en cepas aisladas de seres humanos son CFA-I y CFA-II, estas se adhieren a receptores específicos que se encuentran en la membrana de los enterocitos del intestino delgado proximal. (Vila y col. 2012)

Después de ser ingerida la ETEC coloniza la mucosa intestinal, se multiplica y causa múltiples daños a los enterocitos o interfiere con la homeostasis del tracto gastrointestinal. Para colonizar el intestino delgado se ancla en los enterocitos mediante factores de colonización (CFs) y una adhesina (EtpA) que se encuentra en el extremo del flagelo. Una adherencia fuerte es mediada a través de Tia y TibA. Dos enterotoxinas (*ST* y *LT*) son secretadas, ambas son reguladas a nivel transcripcional por una proteína dependiente de AMP cíclico (AMPC), el cual reprime la expresión de *LT* mientras activa la expresión de *ST*. Cuando *ST* es secretado se une a Guanilato ciclase C. Esta proteína es un receptor transmembrana expresado principalmente en las células del epitelio intestinal. Este receptor bajo condiciones fisiológicas normales es activado por sus péptidos ligandos endógenos que inician el movimiento de agua y sal en el intestino dependiente de GMP cíclico (GMPc). Pero cuando *ST* se une a este receptor desregula esta vía y causa una diarrea secretoria (Peña y col. 2014)

6.6 EPEC

E. coli es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae que se encuentra en la flora normal microbiana del colon humano, ya que coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos y permanece ahí durante toda la vida en simbiosis con el huésped humano. Se ha visto que dentro de la misma especie existen serotipos que pueden causar enfermedades en los humanos como la septicemia, neumonía, diarrea, entre otras. (Vidal, 2003)

Las *E. coli* diarrogénicas son la principal causa de gastroenteritis en niños en países en vías de desarrollo, siendo responsables del 30% al 40% de todos los casos de diarrea en niños. (Lluque, y col. 2010)

Las cifras de muertes en países en vías de desarrollos son grandes del 20% al 50%, lo que convierte a EPEC en una anomalía clínica de inmediata

respuesta. En México una de las causas más comunes de diarrea infantil es la infección por EPEC, dentro de los síntomas provocados por EPEC encontramos diarreas acuosas que tienen diferentes grados de severidad, vómitos y fiebre. La incubación de la infección se da entre las primeras 3 a 24 horas después de la ingesta de un inóculo de bacterias. (Vidal, 2003)

METODOLOGÍA

VII. METODOLOGÍA

7.1 Área de estudio

Esta investigación se llevó a cabo en el Río Alseseca que se encuentra ubicado en el municipio de Puebla en la zona oriente, haciendo un recorrido de norte a sur dentro de la mancha urbana. Iniciando en las faldas de la montaña Malintzi ($19^{\circ} 05' 59''$ N y $98^{\circ} 05' 24''$ O) y desembocando en la localidad de San Francisco Totimehuacan, en la presa Manuel Ávila Camacho ($18^{\circ} 57' 21''$ N y $98^{\circ} 11' 13''$ longitud O).

7.2 Zona de Muestreo

Para la realización de este estudio se recolectaron muestras de aguas superficiales simples, en un periodo anual proveniente del Río Alseseca ubicado en el municipio de Puebla Pue. Con coordenadas $18^{\circ}59'43.2''$ N $98^{\circ}11'12.8''$ W del sitio del muestreo. Durante este muestreo se tomarán 22 muestras simples.



Figura 1. "Zona de muestreo, Río Alseseca Puebla Pue."

7.3 Material utilizado para la toma de muestra.

Las muestras para la investigación se recogieron en frascos de vidrio previamente lavado, estéril y rotulado con capacidad de 250 ml cada uno.

7.4 Preparación de la muestra para su estudio microbiológico.

Las botellas que se utilizaron para el muestreo se mantuvieron cerradas y se retiraron las tapas en el momento de la toma muestra, con el objeto de no contaminar la superficie interna de la botella o de la tapa. La botella se llenó y se cerró inmediatamente con la tapa.

Para tomar la muestra se tomó el frasco con una mano y con la otra se retiró la tapa, teniendo en cuenta de no poner la tapa en el suelo. Luego el frasco se sumergió en el agua hasta que se llenó, posteriormente se tapó. Siempre usando el equipo de protección necesaria. (Siguiendo las recomendaciones de la norma mexicana NMX-AA-003/3-SCFI-2008).

Las muestras se almaceno y se trasporto en hieleras mantenidas a 4^aC hasta las instalaciones del Instituto de ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP) en el laboratorio de patógenos.

En este tipo de muestras se debe de tener en cuenta que no debe transcurrir más de 24 h entre la toma de muestra y el análisis de laboratorio.

7.5 Concentrado de la muestra.

A partir de la muestra de agua del Río Alseseca, se realizó el concentrado de la muestra. En el cual se utilizó 2 tubos cónicos con una capacidad de 50ml, se llenó con 35ml de muestra y se colocó en la centrifugadora a 15000 RPM por 20 minutos. Después de centrifugar se removió el agua de los tubos teniendo cuidado de no deshacerse del botón de la muestra.

Posteriormente en una campana de flujo laminar se llenó a la mitad un tubo eppendorf de 3.0 ml con muestra para poder pasar el botón de los

tubos de 50ml con ayuda de la micropipeta de 1000 μ L, terminando de pasar el botón se le puso un 1 ml más de muestra al eppendorf de 3ml.

7.6 Extracción de DNA de la muestra de agua.

Para la extracción de DNA se ocupó el kit; Power Viral Environmental RNA/DNA Isolation Kit Sample. Se tomó 600 μ L de la solución PV1 a un tubo eppendorf, previamente se calentó la solución PV1 a 55°C por 10 minutos.

Se le Agrego 200 μ L del concentrado al tubo de perlas con 600 μ L de PV1. Después se pasó al vortex al máximo por 10 minutos, posteriormente se centrifugo a 12000 RPM durante 2 minutos, para poder pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf 1.5 ml y se le agregó 150 μ L de PV2 al tubo que tiene el sobrenadante y se resguardo el tubo eppendorf a una temperatura de 4 °C durante 5 minutos. Después se centrifugo a 12000 RPM por 2 minutos, para pasar el sobrenadante al tubo de 2.2 ml y se le agregó 600 μ L de PV3 y 600 μ L de PV4 al tubo de 2.2 ml, se dio golpes de talón para que la muestra quedara homogénea posteriormente transferimos 3 veces 625 μ L del tubo 2.2 ml con la canastilla es importante centrifugar después de agregar los 625 μ L a 12000 RPM por 2 minutos y se retiró el sobrenadante para agregar 600 μ L de PV5 a la canastilla y se centrifugo a 12000 RPM por 2 minutos. Se agregó nuevamente 600 μ L de PV4 a la canastilla y se centrifugo a 12000 RPM por 2 minutos. Se retiró el sobrenadante para centrifugar a 12000 RPM por 4 minutos. Por último se agregó 50 μ L de PV6, se dejó reposar por 1 minuto en la canastilla por último se centrifugo a 12000 RPM durante 2 minutos. Se retiró la canastilla del tubo y el sobrenadante es el DNA. Se resguardo el DNA a -20 °C.

7.7 Caracterización molecular de cepas *E. coli*

A todas las muestras de DNA se les realizo la búsqueda de 8 genes específicos para las cepas patógenas *E. coli* mediante la amplificación por la

reacción en cadena de la polimerasa. Los genes específicos de *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC) fueron: St1, St2, Lt1, Lt2) y de *E. coli* enteropatógena (EPEC) fueron: eae1, eae2, bfp1, bfp2.

Categorías E.Coli	Genes	Cebadores	Tamaño amplificado (pb)
ETEC	lt	F:5 GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC3	450
		R:5 CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT3	
ETEC	st	F:5 ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T3	190
		R:5 CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT3	
EPEC	bfpA	F:5 AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC3	324
		F:5 GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA3	
EPEC	eaeA	F:5 GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC3	384
		R:5'CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG3'	

Tabla 1. "Secuencias de los cebadores que serán utilizados en la amplificación."

Todos los ensayos de PCR se realizaron con volumen final de 27 μ L que contienen: 15 μ L de agua inyecta, 10 μ L de gotaq, 1 microlitro de DNA y .5 μ L de cada primer. Las diferentes fases y el número de ciclos que fueron utilizados para la realización de la primera PCR son los siguientes.

Heated lid 105°C Preheat lid on Pause off
In denat 94.0°C 5m00 Hot start off stage 1
Number cycles 30 Step 94.0°C 0m 30 max Step 55.0°C 0m 30 max Step 72.0°C 0m 30 max
Fin extn 72.0°C 5m00 Fin hold 10.0°C

Tabla 2. "Temperaturas utilizadas para replicar los amplicones característicos de ETEC Y EPEC."

Todos los ensayos de PCR se realizaron en un Termociclador (TECHNE TC-412). Para la visualización de los productos amplificados se prepararon geles de agarosa al 1.0 %, y se colocaron en cada pozo 10 μ L del producto de la PCR y 2 μ L de marcador de PM y 8 μ L de marcador azul y se corrieron a 90 V por 65 min. Posteriormente los geles se tiñieron en una solución de bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador UV.

7.8 Corrimiento de Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (Tris 10.8 g, ácido bórico 5.5 g y EDTA 0.832 g). En cada gel se usaron 9 carriles en los cuales 1 con peso molecular que incluyeron 2 μ L de marcador de PM y 8 μ L de marcador azul, en los siguientes 4 carriles se agregó 10 μ L del producto de la PCR de los controles y en los 4 últimos carriles se agregó 10 μ L del producto de la PCR de la muestra problema.

Para la electroforesis se emplearon buffer TBE 1X. Se fijaron las condiciones de electroforesis: tiempo de corrimiento: 65 min, voltaje: 90. Los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio durante 15 minutos y 5 min de enjuague en agua destilada y por último se observó el gel en un transiluminador UV para resguardar la foto.

RESULTADOS

VIII. RESULTADOS

8.1 Recolección de muestras de agua residual.

En total se recolectaron 24 muestras del agua residual del río Alseseca durante el periodo de enero a diciembre de 2018 (procurando recolectar 2 muestras por mes durante el periodo anual) en la zona de muestreo que corresponde a las coordenadas $18^{\circ}59'43.3''N$ $98^{\circ}11'12.3''W$ en la colonia cerritos marcado en el mapa con un punto color rojo (Fig.2). Todas las muestras de agua fueron trasladadas al laboratorio conforme a lo descrito en la metodología. Imagen de la zona de muestreo. Fig 3.

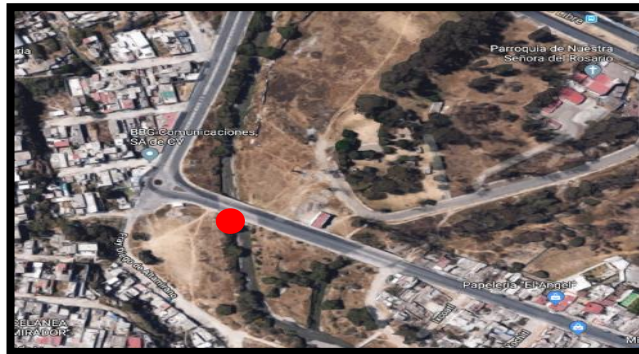


Figura 2. "Vista satelital de la zona de muestreo"



Figura 3. "Zona de muestreo"

8.2 Registro del monitoreo del agua residual del río Alseseca.

Las muestras de agua residual fueron recolectadas, registradas y se les colocó una clave considerando: fecha, hora y número de muestra (Tabla 3). Una vez trasladada la muestra de agua al laboratorio, se realizó el concentrado para extraer el DNA total.

MUESTRAS	FECHA DE MUESTREO	HORA	CLAVE
1	05/09/2018	14:00	M1Ra
2	19/09/2018	14:00	M2Ra
3	10/10/2018	14:00	M3Ra
4	24/10/2018	14:00	M4Ra
5	07/11/2018	14:00	M5Ra
6	21/11/2018	14:00	M6Ra
7	05/12/2018	14:00	M7Ra
8	12/12/2018	14:00	M8Ra
9	09/01/2019	14:00	M9Ra
10	23/01/2019	14:00	M10Ra
11	06/02/2019	14:00	M11Ra
12	13/02/2019	14:00	M12Ra
13	01/03/2019	14:00	M13Ra
14	15/03/2019	14:00	M14Ra
15	05/04/2019	14:00	M15Ra
16	19/04/2019	14:00	M16Ra
17	03/05/2019	14:00	M17Ra
18	31/05/2019	14:00	M18Ra
19	14/06/2019	14:00	M19Ra
20	28/06/2019	14:00	M20Ra
21	05/07/2019	14:00	M21Ra
22	19/08/2019	14:00	M22Ra
23	07/08/2019	14:00	M23Ra
24	15/08/2019	14:00	M24Ra

Tabla 3. "Las claves de muestreo de las 24 muestras de aguas residuales del río Alseseca.

8.3 Validación de los tres métodos de extracción de DNA

En esta investigación, se emplearon tres métodos de extracción de DNA total; a) químico, b) choque térmico y c) kit de extracción de DNA, para determinar la factibilidad de cada método. Cada uno de los métodos fue

validad por la técnica electroforesis en gel de agarosa para observar la pureza del DNA total extraído.

Para determinar la fiabilidad de la pureza del DNA se utilizó la electroforesis en geles de agarosa al 1% para visualizar la presencia e integridad del DNA extraído. La visualización de los resultados se realizó en una cámara de luz UV conforme a lo descrito en la metodología.

Para ello se preparó una suspensión acuosa (5 mL) de la cepa, que se consideró la suspensión “madre”, cada método se evaluó por duplicado.

8.4 Elección del método de extracción de DNA

Se seleccionó el método que brindó los mejores resultados en cuanto a la concentración, la pureza, el rendimiento, la cantidad e integridad del DNA, prosiguiéndose a la extracción del DNA de las 24 muestras de aguas residuales del río Alseseca. De los tres métodos se obtuvieron mejores resultados con el kit de extracción de DNA (Fig. 4) ya que permite cotejar de manera rápida y eficiente los resultados en un menor tiempo a comparación con el método de choque térmico (Fig.5) y el método químico. (Fig. 6)

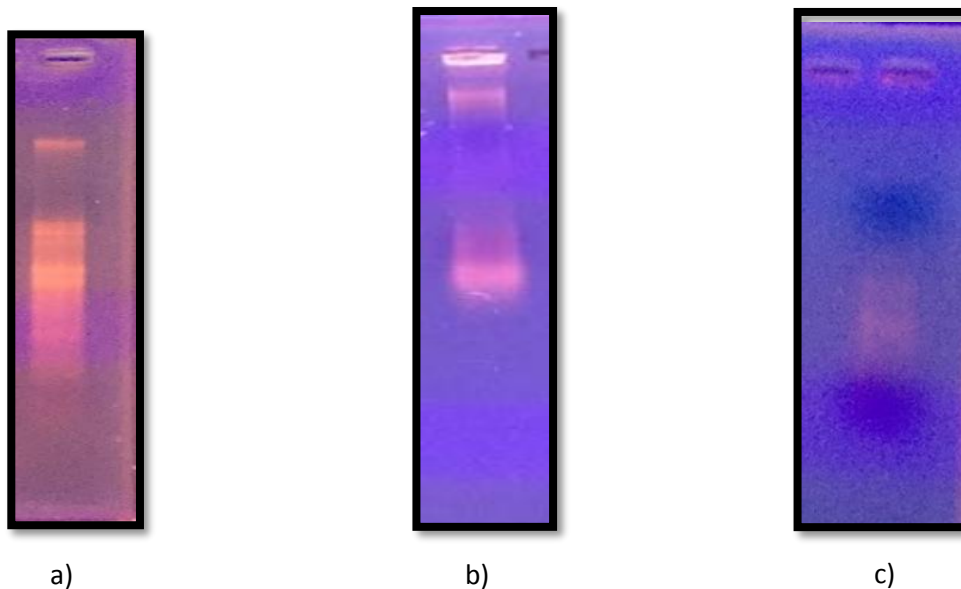
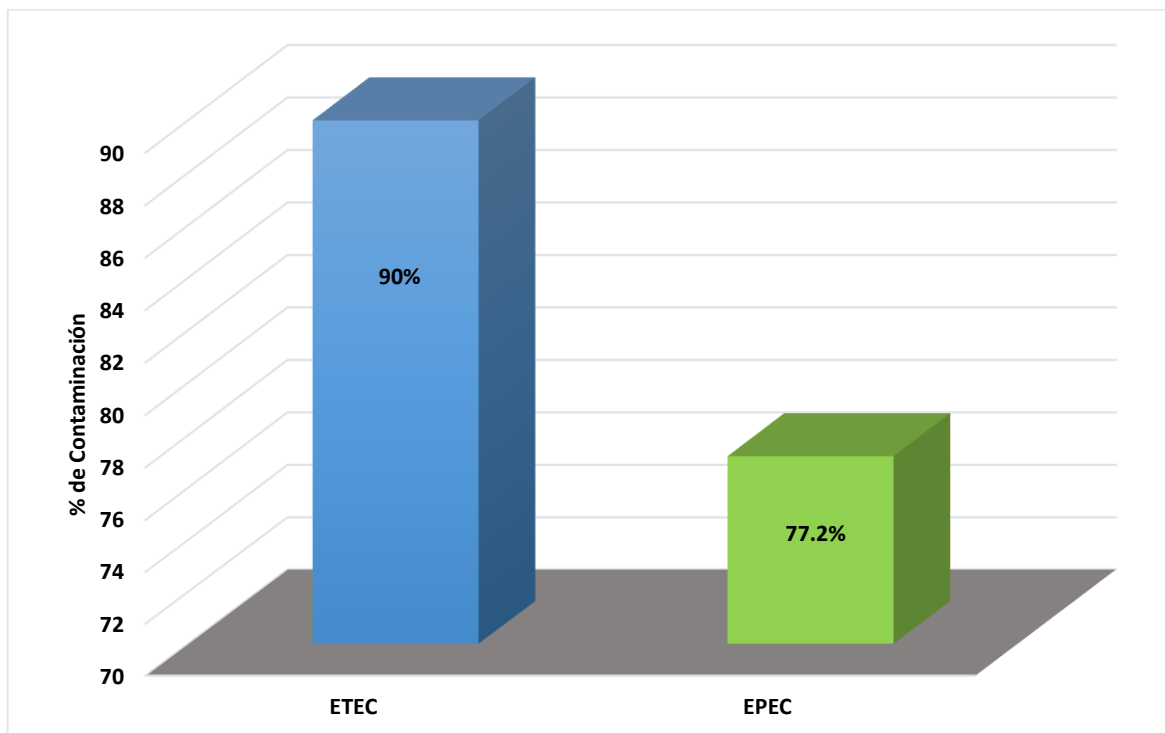


Figura 4. “Extracción de DNA total por: a) KIT, b) Choque térmico y c) Método químico”

8.5 Detección de cepas patógenas de *E. coli* (ETEC y EPEC) en las muestras de agua del río Alseseca.

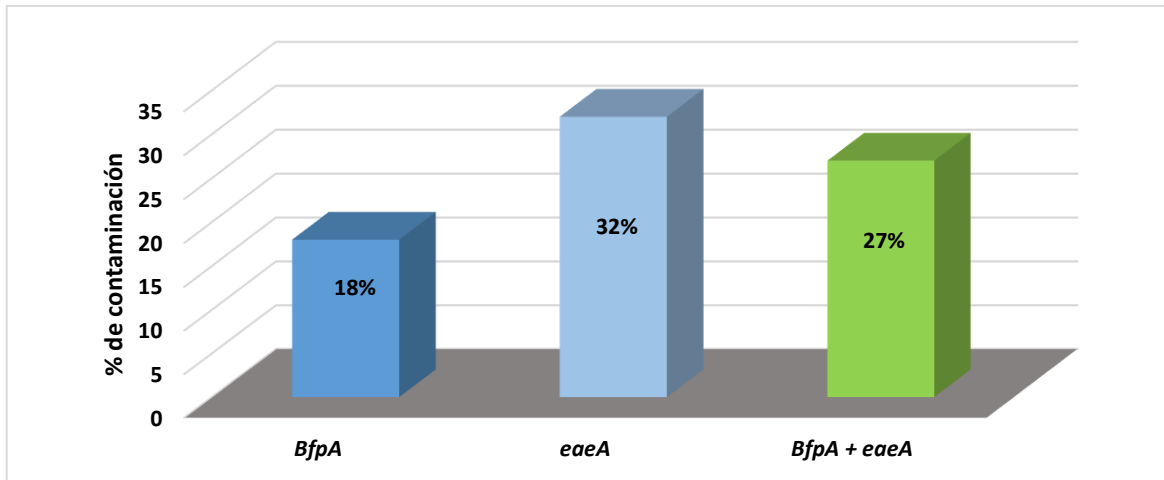
A partir de las muestras obtenidas del río Alseseca se obtuvo el 92% (22/24) que expresaron algún gen de virulencia específico de las cepas patógenas de *E. coli* (ETEC y/o EPEC) y solo el 8% (2/24) no expresó ningún gen correspondiente. Del 92% de las muestras de agua solo el 90% presentó ETEC y el 77.2% solo EPEC Grafica 1.



Gráfica 1. "Comparación de la detección de cepas EPEC y ETEC en las muestras de agua residual del río Alseseca."

8.6 Genes específicos de virulencia de *E.coli* enteropatógena (EPEC) en el río Alseseca

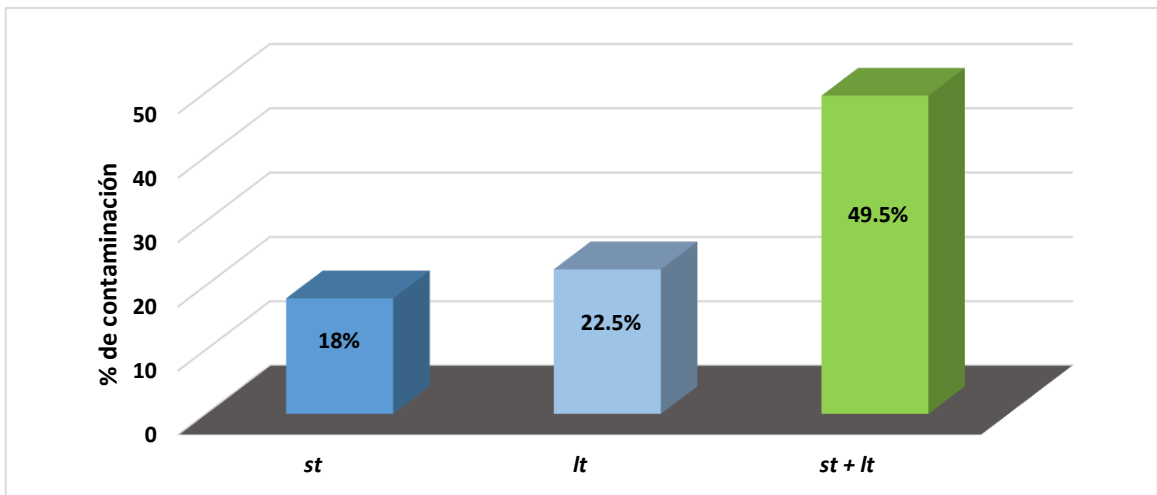
En el agua residual del río Alseseca se detectó la presencia de los genes específicos de EPEC como *bfpA* y *eaeA* y se halló con un 31.7% de las muestras de agua al gen *eaeA*, un 18.1% al gen *bfpA* y para ambos genes se identificó con un 27.2%. Grafica 2.



Gráfica 2. "Comparación de los genes específicos de *E.coli* enteropatógena *bfpA* y *eaeA* en las muestras de agua residual del río Alseseca."

8.7 Genes específicos de virulencia de *E.coli* enterotoxigenica (ETEC) en el río Alseseca.

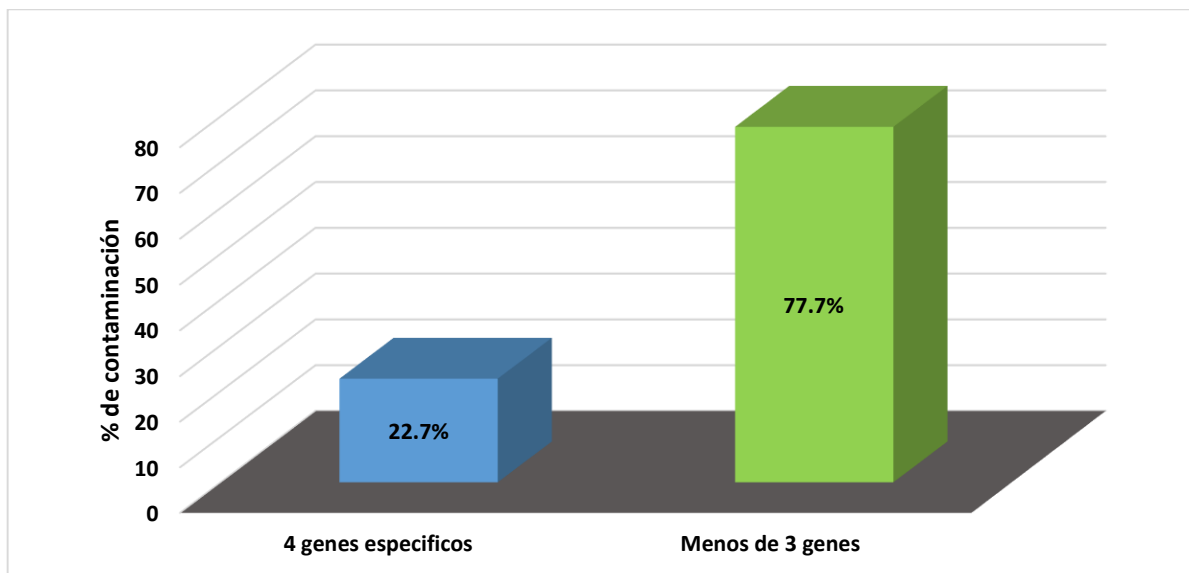
La contaminación biológica en el río Alseseca se determinó por la presencia de los genes de virulencia *st* y *lt* del patogruppo ETEC, en donde se detectó en forma conjunta a ambos genes con un 49.5% en las muestras de agua residual, el 22.5% de las muestras solo se halló al gen *lt* y en un 18% se detectó al gen *st*. Grafica 3.



Gráfica 3. "Comparación de la existencia de los genes específicos de *E.coli* enterotoxigenica *st* y *lt* en el agua residual del río Alseseca."

8.8 Expresión de genes de virulencia de ETEC y de EPEC en las muestras de agua residual del río Alseseca.

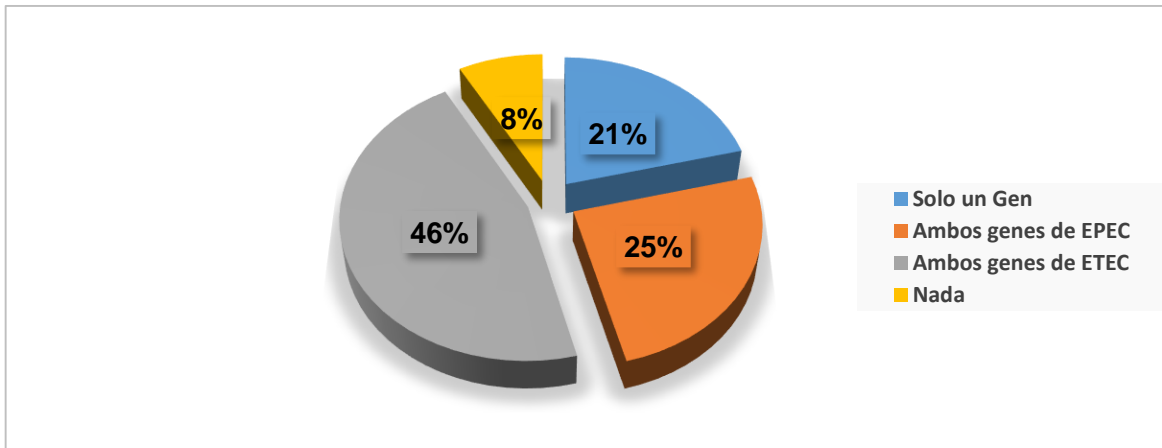
Los estudios de detección molecular demostraron que el 77.72% de las muestras de agua residual presentaron menos de tres genes de virulencia de *E. coli*: *lt*, *st*, *eaeA* y *bfpA*. Y solo el 22.72% de las muestras de agua presentaron los 4 genes virulencia específicos de éste estudio, 2 pertenecientes a cada patogruppo (ETEC y EPEC). Grafica 4



Gráfica 4. "Muestras de agua con expresión de genes específicos de ETEC y EPEC: *lt*, *st*, *eaeA* y *bfpA*."

8.9 Detección molecular de cepas EPEC y ETEC mediante la amplificación de sus genes específicos

De las 24 muestras de agua residual del río Alseseca (Tabla 4) 11 expresaron los genes de virulencia de ETEC (*st* y *lt*) que equivalen al 46% y solo 25% (6/24) expresaron los genes de virulencia de EPEC (*eaeA* y *bfpA*). Así mismo se encontró que el 21% (5/24) expreso solamente un gen de los 4 genes de virulencia de ETEC y EPEC. Sin embargo hubo 2 muestras que no expresaron ningún gen de virulencia de *E. coli* de ETEC ni de EPEC que equivale al 8%. Grafica 5



Gráfica 5. "Detección molecular por genes de virulencia de *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC); *st*, *lt* y de *E. coli* enteropatógena (EPEC); *eaeA*, *bfpA*."

MUESTRAS	FECHA	ETEC		EPEC	
		<i>st</i>	<i>lt</i>	<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>
1	05/09/2018	x	x		
2	19/09/2018		x	x	
3	10/10/2018	x	x	x	
4	24/10/2018	x	x	x	x
5	07/11/2018	x	x	x	x
6	21/11/2018	x	x	x	x
7	05/12/2018				x
8	12/12/2018	x			
9	09/01/2019			x	
10	23/01/2019	x		x	
11	06/02/2019	x			
12	13/02/2019				
13	01/03/2019	x	x	x	x
14	15/03/2019	x	x		x
15	05/04/2019		x	x	
16	19/04/2019	x	x		x
17	03/05/2019		x	x	x
18	31/05/2019				
19	14/06/2019		x	x	
20	28/06/2019	x	x		
21	05/07/2019	x	x	x	x
22	19/08/2019		x		
23	07/08/2019	x	x		x
24	15/08/2019	x		x	

Tabla 4. "Genes de virulencia, específicos para *E. coli* EPEC y ETEC:"

8.1.1 Amplificación de los genes de virulencia *st*, *lt*, *bfpA* y *eaeA*.

Las cepas fueron positivas para los patogrupos ETEC y EPEC mediante los genes de virulencia específicos: *lt* (450 pb), *st* (190 pb), *eaeA* (384 pb) y *bfpA* (324 pb). En este estudio se utilizó la cepa control E2348/69 y E9034A para su comparación con las cepas problema. Se utilizó gel de agarosa al 1 % en donde el carril 1 es el peso molecular carril 2: gen *st*, 3: gen *lt*, 4: *bfpA* y 5: *eaeA* que corresponden a los controles positivos, en los carriles 6, 7, 8 y 9 corresponden a los amplicones de la muestra problema y en el carril 10 es el DNA de la muestra del río Alseseca Fig 7.

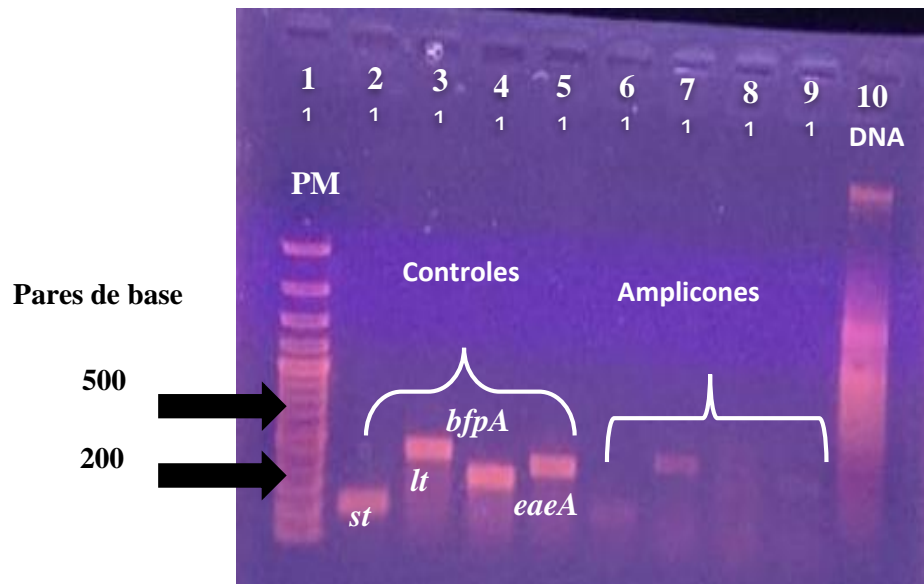


Figura 5. "Gel de agarosa con los amplicones de los genes de virulencia de ETEC y EPEC

8.1.2 Muestras de agua residual con la detección molecular de los genes de virulencia: *st*, *lt*, *bfpA* y *eaeA*.

Para el patogrupa ETEC mediante la expresión de los genes de virulencia: *lt* (450 pb) y *st* (190 pb), se utilizó la cepa control E9034A para su comparación con las cepas problema. En donde el carril 1 es el peso molecular, carril 2 y 3 son los genes de virulencia de ETEC respectivamente y los carriles 6 y 7 son las amplificaciones de los genes de virulencia *st* y *lt*. Fig.8

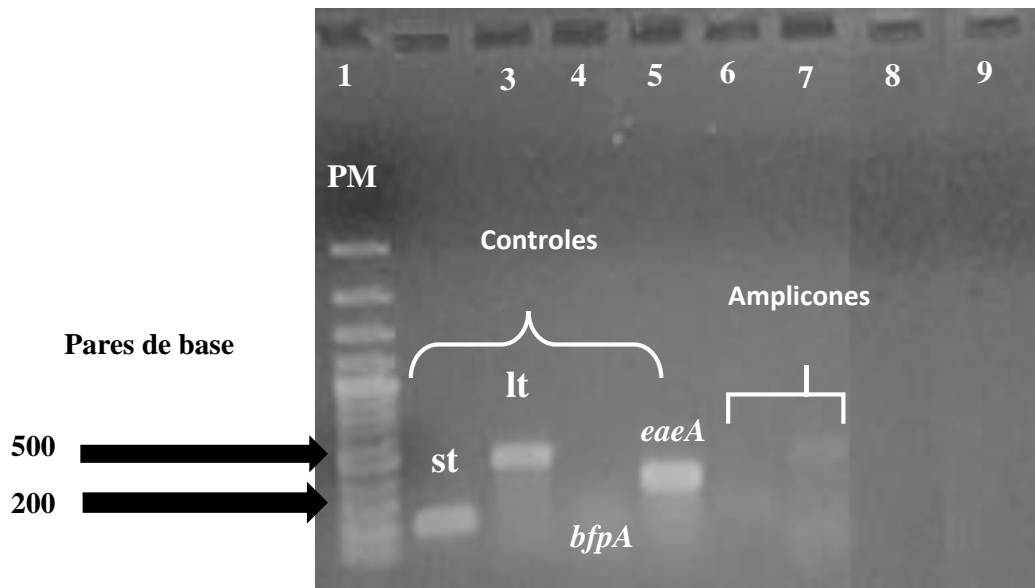


Figura 6. "Gel de agarosa con los amplicones de los genes de virulencia de ETEC

Para el patogrupo EPEC mediante la expresión de los genes de virulencia: *eaeA* (384 pb) y *bfpA* (324 pb), se utilizó la cepa control E2348 para su comparación con las cepas problema. Fig. 9.

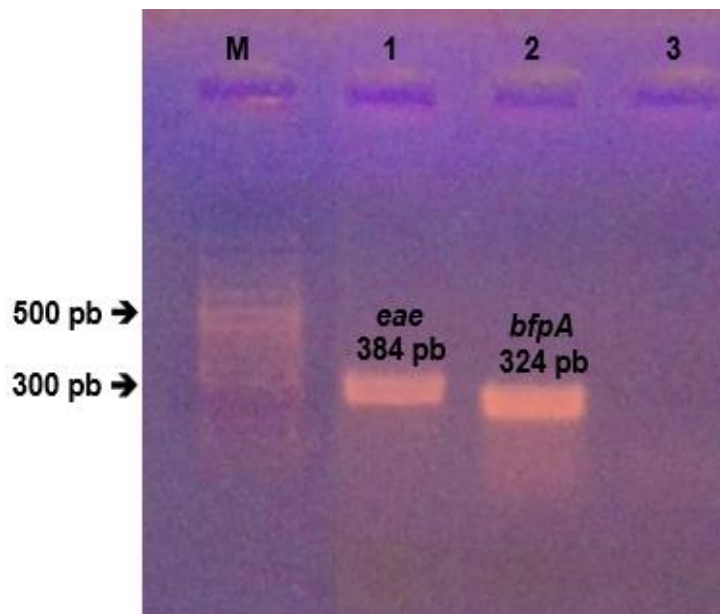
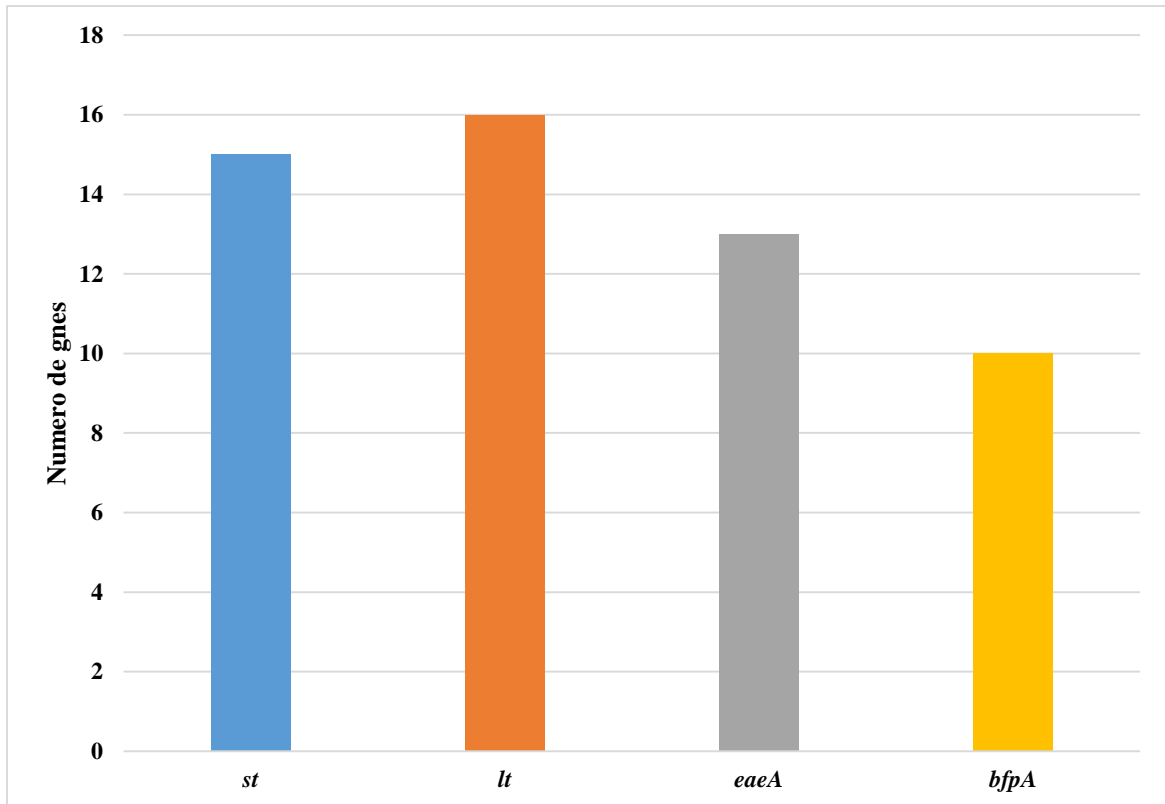


Figura 7. "Gel de agarosa con los amplicones *eaeA* y *bfpA*. Carril M: marcador de peso molecular (1 Kb), 1: gen *eaeA*, 2: gen *bfpA*

8.1.3 Monitoreo anual de los genes de virulencia de ETEC y EPEC

Por medio de la técnica de detección molecular se obtuvieron un total de 54 genes específicos de virulencia de ETEC y EPEC durante el monitoreo anual; 15 de (*st*), 16 de (*lt*), 13 de (*eaeA*) y 10 de (*bfpA*) (Grafica 6).

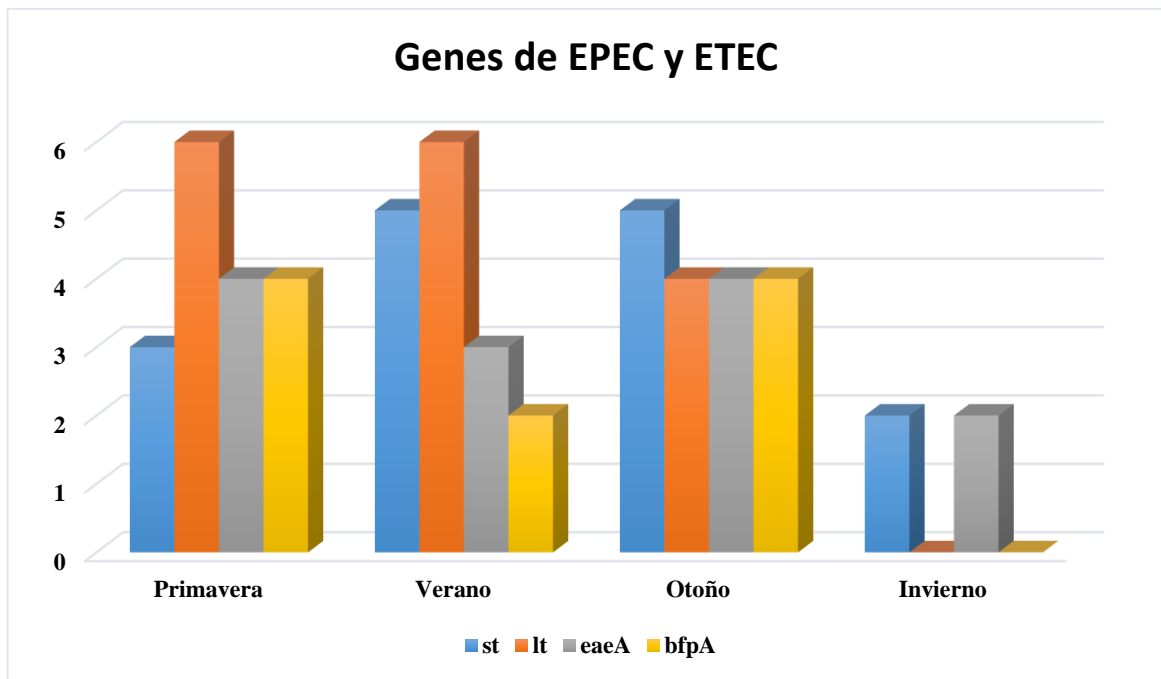


Gráfica 6." Genes específicos de virulencia de *E. coli* ETEC (*st* y *lt*) Y EPEC (*eaeA* y *bfpA*).

Al contrastar los resultados obtenidos se observa que los periodos con mayor expresión de genes específicos de virulencia de *E. coli* ETEC y EPEC son; primavera con 17 genes, verano con 16 genes y otoño con 17 genes.

Es interesante el hecho de que la bacteria *E. coli* está con mayor presente en tres de las cuatro estaciones del año lo que nos puede indicar su existencia al medio ambiente. Además podemos distinguir que en el periodo de otoño hay una conducta similar en la expresión de los 4 genes de virulencia de ETEC (*st* y *lt*) y EPEC (*eaeA* y *bfpA*) al mismo tiempo. Grafica

7



Gráfica 7. “Genes específicos de virulencia de ETEC Y EPEC en las diferentes estaciones del año.”

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1 Recuperación y detección de cepas patógenas de *E. coli* en agua residual

La contaminación fecal producida por el ser humano y los animales es una de las principales fuentes de deterioro de la calidad del agua (Breindenbach 2012). La calidad del agua es importante para que se mantengan los ecosistemas en equilibrio ya que genera un impacto contraproducente en una o más especies de acuerdo con el contenido de contaminantes. La presencia de *E. coli* en el agua es un indicador de contaminación reciente de heces fecales en el agua residual urbana o en agua potable (Rivera 2010).

En el río Alseseca se vierte agua residual de origen doméstico e industrial que puede o no estar tratada, además durante el periodo lluvioso se arrastran las heces fecales de los animales que viven en las orillas del río, todo lo anterior ha influido de manera negativa en la calidad del agua y explica la presencia de *E. coli*.

De acuerdo con una investigación del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP (ICUAP), el 80% de los patógenos presentes en el río Alseseca corresponden a *Escherichia coli* enterotoxigenic (ETEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), tres de los siete grupos patógenos de *E. coli*. (Chávez Bravo, 2015). Dentro de las normas oficiales mexicanas (NOM) ninguna establece la búsqueda de dichos patógenos y mucho menos de genes de virulencia específicos de *E.coli* enterotoxigenica (ETEC) y *E.coli* enteropatógena (EPEC) como un indicador de contaminación de aguas residuales solo se menciona que puede existir la presencia de *E. coli* en agua residual de acuerdo con las normas NOM-127-SSA1-1994, que establece los límites de contaminantes permisibles para el agua de uso y consumo humano y la norma NOM-003-ECOL-1997, que establece los límites

máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.

En la tabla 5 se hace una comparación de los estándares de calidad del agua según las normas oficiales entre México y E.U, tomando a *Escherichia coli* (*E. coli*), como el indicador de contaminación fecal de las aguas superficiales establecidos por la EPA en los E.U. (Rivera y Rock, 2011).

E. coli se puede identificar y aislar del agua, a partir de métodos que no requieren de grandes inversiones que incluyan la compra de equipos sofisticados. Métodos convencionales como el número más probable (NMP), filtración por membrana y métodos cromogénicos y fluorogénicos, han resultado útiles para determinar la presencia o ausencia de este microorganismo (Martínez y col. 2015). De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (2000) refiere que no hay certeza de que exista una relación significativa entre la cuantificación de *E. coli* y su propia existencia, ya que estos métodos de enumeración o estimación de densidad poblacional, no revelan específicamente la cantidad de cepas patógenas. Para tener una cantidad de patógenos más cercana a la realidad es necesario la detección genética de los factores de virulencia de cada patógeno. Para ello, se utilizan métodos convencionales de extracción de DNA como el método de choque térmico y el método químico pueden interferir en las variaciones en la eficiencia de la lisis, el rendimiento y la pureza del DNA por lo que pueden afectar los resultados de técnicas moleculares como la PCR. Es por eso que este trabajo de investigación ha propuesto trabajar con un método de extracción de DNA más simple e eficiente como es la extracción de DNA total por KIT, ya que este método nos permite tomar la muestra de agua residual y pasarnos directamente a la extracción de DNA minimizando el tiempo de trabajo de dos semanas a tres días.

Uso	Límite permisible de <i>E. coli</i>	
	México	E. U
Tipos de agua		
Agua potable	Coliformes totales = Cero	Cero
	Coliformes fecales = Cero	
Aguas superficiales con contacto corporal completo o directo	240 NMP/100 mL	235 UFC/100 mL
Aguas superficiales con contacto corporal parcial, indirecto u ocasional	1,000 NMP/100 mL	575 UFC/100 mL
Aguas residuales de descarga		< 2.2 UFC/100 mL
Aguas residuales para riego		< 1.0 UFC/100 mL

Tabla 5. "Niveles permisibles de *E. coli* en diferentes tipos de agua."

9.2 Monitoreo de los patotipos EPEC y ETEC en aguas residuales

Los resultados de este estudio muestran la presencia del género *E. coli* con un 92% en el río Alseseca, porcentaje similar a lo reportado por Obi. (2004) quienes analizaron la presencia de *E. coli* en un 87.7% en los ríos de la región de Venda perteneciente a la provincia de Limpopo al sur de África. En cambio (CHIROLES y col. 2007) reportaron un porcentaje menor 69.7% en un estudio realizado en el río Almendares de la Habana, Cuba. En estudios anteriores (2006) en el mismo río Alseseca el autor Rivera y colaboradores obtuvieron resultados diferentes ya que los datos mostraron que el río Alseseca tenían un porcentaje menor de contaminación de *E. coli*. Se aislaron un total de 100 bacterias, de las cuales el 91% fueron enterobacterias y el 9% otros microorganismos no fermentadores, *E. coli* fue el más representativo con un 44%. Es evidente que el agua del río Alseseca presenta una contaminación por *E. coli* que va en aumento, en estos últimos 14 años la contaminación por *E. coli* ha aumentado más del doble, de tal forma que pone en riesgo la salud de las poblaciones aledañas al río.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las principales fuentes de contaminación que presentan este ecosistema son de origen humano y animal. Diversos autores como Rodríguez (2003), plantean que cuando las concentraciones de *E. coli* son elevadas en un ecosistema acuático, esto indica que ha tenido lugar un fuerte evento de contaminación por desechos animales y/o humanos y que el mismo tiene un carácter reciente. Si por el contrario, las concentraciones de *E. coli* son pequeñas, indica que la contaminación, aunque del mismo tipo, es menos reciente. Además, estos hallazgos resaltan que en lugares donde se descarga una gran cantidad de aguas residuales sanitarias sin el tratamiento adecuado, existe un gran riesgo para la salud. (Harada, y col. 2018)

El agua residual del río Alsesca presentó una contaminación del 90% de *E. coli* enterotoxigénica y 77.2% de *E. coli* enteropatógena el cual representa un alto índice con respecto a lo reportado por otros autores. En el lago Cheng Ching Taiwán se determinó el número de cepas patógenas de *E. coli* que fueron aisladas en un 29.1% de los cuales, la categoría diarrogénica caracterizada con menor frecuencia fue EPEC con un 9.1 % (Shih y col. 2012). En aguas subterráneas en zonas rurales del sur de Brasil se determinó de un total de 96 muestras positivas para *E. coli*, de las cuales el 3.7% fue ETEC. (Rodrigues y col. 2019)

Hasta el momento se están reportando los niveles de contaminación de los patotipos EPEC y ETEC en aguas residuales del río Alseseca por medio de una técnica de extracción de DNA directa de la muestra de agua residual. Sabemos que en México no se cuenta con tanta información acerca de estos genes de virulencia en aguas residuales ya que la normativa presente solo se enfoca en determinar la presencia de *E. coli*. Es por eso que es necesario tener una normatividad que regule la presencia de los patotipos de virulencia de ETEC y EPEC.

9.3 Determinación de genes que expresan factores de virulencia de ETEC y EPEC

Existen diversos agentes etiológicos causantes de cuadros diarreicos pero los patogrupos de *E. coli* son los primeros agentes bacterianos responsables de los índices de morbilidad y mortalidad infantil más altos, principalmente en niños menores de 5 años en países en desarrollo (OMS, 2017).

Este estudio se enfocó a buscar la presencia de los genes de virulencia de ETEC y EPEC en el agua residual del río Alseseca. En donde se detectó un 31.7% de las muestras de agua al gen *eaeA* lo cual representó un alto índice a comparación con respecto a lo reportado con Martins y col. (2016), en donde tomaron 48 muestras de aguas residuales de dos plantas de tratamiento del municipio del distrito de Amathole, Provincia Oriental del Cabo, Sudáfrica, se obtuvo un 7.6 %. Por lo contrario se detectó con menor frecuencia el gen *bfpA* con un 18% en el agua residual del río Alseseca, estos resultados difieren con Obi y col (2004) quienes encontraron un 34.1% de EPEC de las cuales el gen *bfpA* fue detectado con mayor frecuencia con 26% (35/135).

Ramírez y col. reportaron en el 2013 datos similares en donde analizaron muestras tomadas del río San Pedro en Aguascalientes en donde encontraron el 28.3% de presencia de ambos genes de virulencia (*eaeA* y *bfpA*), en donde nuestro estudio arroja un 27 % de presencia de ambos genes de virulencia de EPEC. La presencia de EPEC en ríos, se debe principalmente a las descargas de aguas residuales que estos reciben, como son las aguas residuales de origen doméstico que aportan altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal (Ahmed, 2005). La contaminación fecal en aguas superficiales y la presencia de patógenos derivados de las heces en el agua está relacionado con enfermedades infecciosas (Mendes, 2015). Es así que la detección de cepas EPEC en ríos derivada de la contaminación de aguas superficiales nos indican un gran riesgo para la salud pública, debido a su capacidad para causar

enfermedades humanas, como lo es la diarrea infantil (Megchún et al., 2015).

Así mismo este trabajo de investigación detecto la presencia de ambos genes de virulencia de ETEC con el 49.5% en el agua residual del río Alseseca, los cuales concuerdan con datos reportados por Cortes y col (2002) en el municipio de Chalco, identificaron el agente causal del brote de diarrea asociado con el desbordamiento del canal de aguas negras. Este estudio retrospectivo y transversal, efectuado en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), de la Secretaría de Salud, con 1 550 hisopos rectales detecto un 44.1 % de presencia de ambos genes de virulencia de ETEC.

A si, mismo el gen *lt* se detectó con mayor frecuencia con un 22.5% en comparación con el gen *st* que obtuvo un 18 % de presencia en el agua residual del río Alseseca. Rivera y col. (2010) realizaron un estudio a 1129 niños con diarreas y 744 niños sin diarreas fueron similarmente analizados para identificar solamente cepas ETEC, logrando detectarse 5.3% y 4.3% respectivamente, mayormente en niños mayores de un año de edad. Cuando se concentran en caracterizar estas cepas ETEC buscando diferenciar en presencia de una sola toxina (*Lt*, *St* o ambas), lograron identificar un mayor porcentaje cepas ETEC positivos solamente a la toxina termolábil (*Lt*) (52% de niños con diarrea y 72% en niños sin diarrea) y cepas ETEC positiva a la toxina *St* en 25% y 9% y cepas con las dos toxinas, 23% y 9% respectivamente.

La *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es una de las principales causas de diarrea en niños de países en desarrollo y en viajeros adultos de países industrializados al mundo en desarrollo Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), ETEC es la segunda causa más común de diarrea después del rotavirus en niños menores de 5 años y, por lo tanto, es un objetivo

importante para el desarrollo de vacunas. La diarrea por ETEC se desarrolla entre 8 y 72 h después de la infección inicial, generalmente debido a la ingestión de alimentos y agua contaminados (Rivera 2010).

Al analizar los datos obtenidos de *E. coli* en el río Alseseca se puede apreciar que mostraron valores altos durante los periodo de primavera, verano e invierno no podemos decir que están por encima o por debajo de algún parámetro establecido ya que no contamos con alguna normativa que regule o establezca parámetros de genes de virulencia de ETEC o EPEC. Estos datos se asemejan con lo reportado por (Chien y col. 2016) en donde la detección de DEC fue alta en primavera (83.3%) y verano (50%), y baja en otoño (0%) e invierno (8.3%). De manera similar, en el río Puzih, las tasas de detección de DEC fueron altas en primavera (81.9%) y verano (87.5%), y menores en otoño (20.5%) e invierno (6.8%).

La exposición continua del medio ambiente a la contaminación va originando mayores riesgos para la salud, generalmente estos riesgos son considerables en países en vías de desarrollo, en los cuales, la pobreza, la nula inversión en tecnología y la escasa legislación sobre protección al medio ambiente, han dado como resultado altos niveles de contaminación. La calidad del agua es importante para que se mantengan los ecosistemas en equilibrio ya que genera un impacto contraproducente en una o más especies de acuerdo con el contenido de contaminantes. La presencia de *E. coli* en el agua es un indicativo de una reciente contaminación de aguas residuales urbanas o contaminación de residuos de animales (Rock y Rivera ,2014), pero desafortunadamente las normas no establecen la identificación de cepas patógenas como medida en la calidad de agua. Considerando lo anterior debemos tomar en cuenta que no sólo se descargan a los cuerpos de agua desechos urbanos, sino también los desechos industriales.

CONCLUSIÓN

X. CONCLUSIÓN

- Se logró estandarizar la extracción de DNA total de cada una de las muestras del agua residual del río Alseseca.
- Con el monitoreo se determinó la presencia de ETEC y EPEC en las diferentes estaciones del año con cantidades similares.
- Se detectó en el agua residual los genes de virulencia (st y lt) de ETEC en mayor cantidad que los genes de EPEC (bfpA y eaeA).
- El río Alseseca presenta una contaminación biológica del 92% por la presencia de genes de virulencia de ETEC y EPEC.
- Por la presencia de genes de virulencia de *E.coli*, el río Alseseca se convierte en un reservorio de patógenos capaces de causar brotes diarreicos representando un riesgo a la población aledaña.

BIBLIOGRAFÍA

XI. BIBLIOGRAFÍA

- A.Puerta Garcia, F. M. (2010). Enterobacterias . Medicine /UNAM, 10-31.
- Ahmed, W., Neller, R. y Katouli, M. (2005). Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and Escherichia coli and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. APPL.ENVIRON.MICROBIOL. Vol. 71 (8), pp. 4461-4468.
- Arcos Pulido, M. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. NOVA PUBLICACIÓN CIENTÍFICA. , Vol. 3 (4), pp. 69-79.
- Barrera-Escorcía, G., Fernández-Rendón, C. L., Wong-Chang, I., & Ramírez Romero, P. (2013). La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. Hidrobiológica , 23 (1): 87-96.
- Barrera-Escorcía, G., Fernández-Rendón, C. L., Wong-Chang, I., & Ramírez Romero, P. (2013). La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. Hidrobiológica , 23 (1): 87-96.
- Campos-Pinilla, C., Cárdenas-Guzmán, M., & Guerrero-Cañizares, A. (2008). COMPORTAMIENTO DE LOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL EN DIFERENTE TIPO DE AGUAS DE LA SABANA DE BOGOTÁ (COLOMBIA). UNIVERSITAS SCIENTIARUM, Vol. 13 N° 2, 103-108.
- CARLOS, R. L. (2014). Bacteriological Indicators on the Environment and in Human Health. Current World Environment, Vol. 9(1), 96-104 (2014).

- Castro-Espinoza, L., Gortáres-Moroyoqui, P., Mondaca-Fernández, I., Meza Montenegro, M., Balderas-Cortez, J., López-Cervantes, J., & Lares-Villa, F. (2008). Patógenos emergentes como restricción para el reuso de las aguas. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 9-21.
- Chávez Bravo, E. (2015). BUAP investiga bacterias patógenas que causan enfermedades infecciosas. *Boletín BUAP*.
- Chávez, B. E. (2011). BIOCONTAMINACIÓN AEREA GENERADA POR EL RIO ALSESECA Y PATOGENOS. Puebla: Centro de Investigaciones en Ciencias microbianas BUAP.
- Chávez, E., Acevedo, J., Munguía, R., Avelino, F., & Castañeda, E. (2011). BIOCONTAMINACIÓN AEREA GENERADA POR EL RIO ALSESECA Y PATOGENOS PRESENTES EN SU EFLUENTE. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Chien Huang, W., Mu Hsu, B., Min Kao, P., Wei Tao, C., Ning Ho, Y., Wei Kuo, C., & Li Huang, Y. (2016). Seasonal distribution and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in different aquatic environments in Taiwan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37-41.
- CHIROLES RUBALCABA, S., GONZÁLEZ GONZÁLEZ, M. I., TORRES ROJAS, T., VALDÉS ÁGUILA, M., & DOMÍNGUEZ MARTÍNEZ, I. (2007). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental*, 222-227.
- CONAGUA (2015). Inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales en operación. Disponible: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/197610/Inventario_2015.pdf
- Corona, F. P. (23 de Mayo de 2013). Río Alseseca se desborda en la ciudad de Puebla. *Excelsior*.

- DÁVILA FLORES, C. R., & PEÑA HIDALGO, M. (2012). Prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños menores de cinco años con diarrea, mediante la reacción en cadena de la polimerasa. IQUITOS – PERÚ: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, ESCUELA DE POST GRADO.
- Evangelina Olivas, E., Flores-Margez, J. P., Mónica Serrano, A., Soto-Mejía, E., Iglesias-Olivas, J., Salazar-Sosa, E., & Fortis-Hernández, M. (2011). INDICADORES FECALES Y PATÓGENOS EN AGUA DESCARGADA AL RÍO BRAVO. *TERRA LATINOAMERICANA* , 449-457.
- F.P., C. (s.f.). El rio Alseseca se desborda en la ciudad de Puebla . *Excelsior* .
- Farfán García, A. E., Ariza Rojas, S. C., Vargas Cárdenas, F. A., & Vargas Remolina, V. L. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chilena Infectol* , 33 (4): 438-450.
- Federación, D. o. (2016). NORMA Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997. Ciudad de México.
- Fernández, M. N., Silva Gómez, S. E., Cabrera Maldonado, C., & Sánchez Torres, R. C. (2013). Calidad del agua residual no entubada vertida por dos parques industriales en la ciudad de Puebla, México. *Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo* I, Vol. 4, Núm. 7 .
- Harada, H., Fujimori, Y., Gomi, R., N. Ahsan, M., Fujii, S., Sakai, A., & Matsuda, T. (2018). Pathotyping of *Escherichia coli* isolated from community toilet wastewater and stored drinking water in a slum in Bangladesh. *Letters in Applied Microbiology*, 542-548.

- Larrea-Murrell, J. A. (2012). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 44, No. 3, pp. 24-34, 2013.
- Lluque, A., Eric , M., Riveros, M., Alvarado, L., E. C., Colichón, A., . . . Ochoa, T. (2010). Comparación entre el Diagnóstico Serológico y el Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC). *Rev. Gastroenterol. Perú*, 30-2: 121-125.
- Martínez-Nazaret, R. E., Villalobos de Bastardo, L. B., & Karina Castillo, L. (2015). *Escherichia coli* DIARREOGÉNICAS PROCEDENTES DE AGUAS MARINAS RECREACIONALES CARACTERIZADAS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. *Revista Científica, FCV-LUZ*, Vol. XXV, N° 3, 248 - 254.
- Mendes, D. y Domingues, L. (2015). On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 113, pp. 400-411.
- Mudit Chandra, Pui Cheng, Gaelle Rondeau, Steffen Porwollik, & McClelland, M. (2013). A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, 210-216.
- Obi, C. L., Green, E., Bessong, P. O., De Villiers, B., Hoosen, A. A., Igumbor, E. O. y Potgieter, N. (2004). Gene encoding virulence markers among *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic stool samples and river sources in rural Venda communities of South Africa. *Water S.A.* Vol. 30 (1), pp. 37-42.
- Ochoa, T., Erik Mercado, E. H., Durand, D., Rivera, F. P., Mosquito, S., Contreras, C., . . . Ruiz, J. (2011). Frecuencia y patotipos de

Escherichia coli diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. Rev. perú. med. exp. salud publica, 13-20.

- OMS, 2017. Portal: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
- Ramírez, F. Y., Avelar, F. J., Garneau, P., Márquez, F., Guerrero, A. L. y Harel, J. (2013). Presence of multi-drug resistant pathogenic Escherichia coli in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, México. *Front. Microbiol.* Vol. 4 (147), pp. 1-16.
- Rivera Tapia , J. A., Cedillo Ramírez, L., Guzmán Cortés , M., & Giono Cerezo, S. (2006). Diagnóstico de enterobacterias en el río Alseseca. *Facultad de Medicina UNAM*, Vol. 49(1), pp. 20-22
- Rivera Tapia, J. A., Cedillo Ramírez, L., Guzmán Cortés, M., & Giono Cerezo, S. (2006). Diagnóstico de enterobacterias en el río Alseseca. *Revista Fac Med UNAM* , Vol.49 No.1.
- Rivera, B., & Rock, C. (2011). Microbial source tracking: Watershed characterization and source identification.
- Rock, C., & Rivera, B. (2014). Water Quality, E. coli and Your Health. Cooperative Ext.
- Rodrigues da Silva, C., Silva Sanches, M., Hiromori Macedo, K., Lopes Dambrozio, A. M., Dejato da Rocha, S. P., Navarro, A., & Sanchez Pelayo, J. (2019). Molecular and phenotypic characterization of diarrheagenic Escherichia coli isolated from groundwater in rural areas in southern Brazil. *Journal of Water and Health*, 597-608
- Secretaria de salud. (1994). Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. México DF: Diario oficial de la federación.
- Shih-Wei Huang , Bing-Mu Hsu , Yen-Jui Su , Dar-Der Ji , Wei-Chen Lin , Jyh-Larng Chen , . . . Yi-Chou Chiu. (2012). Occurrence of

diarrheogenic *Escherichia coli* genes in raw water of water treatment plants. *Environ Sci Pollut Res* , 19:2776–2783 .

- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Improved enumeration methods for the recreational water quality indicators: Enterococci and *Escherichia coli*. Method: EPA/821/R-97/004. Office of Science and Technology. Washington, D.C. 48 pp. 2000.
- Valencia-Quintana, R., Waliszewski Kubiak, S. M., Gómez-Olivares, J. L., Suárez Sánchez, J., & Sánchez Alarcón, J. (2011). Evaluación de riesgos por exposición a contaminantes ambientales presentes en las aguas del Sistema Hidrológico Atoyac-Zahuapan. ResearchGate.