



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

**PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y
METALES PESADOS EN BACTERIAS MESOFÍLICAS
COMO INDICADOR BIOLÓGICO DE CONTAMINACIÓN
EN RÍOS DEL MUNICIPIO DE PUEBLA**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

LIZETH CASTILLO DÍAZ

Asesor de tesis:
M. en C. Constantino Gil Juárez

Septiembre 2014



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"

**PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y
METALES PESADOS EN BACTERIAS MESOFÍLICAS
COMO INDICADOR BIOLÓGICO DE CONTAMINACIÓN
EN RÍOS DEL MUNICIPIO DE PUEBLA**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

LIZETH CASTILLO DÍAZ

Comité tutorial:

| | |
|----------------------------|----------------------------------|
| Asesor y Tutor | M.C. Constantino Gil Juárez |
| Integrante Comité Tutorial | M.C. Andrés Adolfo Muñoz García |
| Integrante Comité Tutorial | M.C. José Antonio Ticante Roldán |

Septiembre 2014



BUAP

ING. AMB. LIZETH CASTILLO DÍAZ

Presente:

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

| | |
|---|-------------------|
| <i>Dr. Jorge Alberto Girón Ortiz</i> | <i>Presidente</i> |
| <i>Dra. Edith Chávez Bravo</i> | <i>Secretario</i> |
| <i>Dr. Elías Pezzat Said</i> | <i>1er. Vocal</i> |
| <i>Dra. María Teresa Zayas Pérez</i> | <i>2do. Vocal</i> |
| <i>Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán</i> | <i>Suplente</i> |

designado para la defensa de su tesis "*Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en bacterias mesofílicas como indicador biológico de contaminación en ríos del Municipio de Puebla*", han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

Atentamente

"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"

H. Puebla de Z., Septiembre 18 de 2014

Dr. J Santos Hernández Zepeda
Coordinador



JSHZ/anma
c.c.p. Archivo
c.c.p. Minutario

Instituto
de Ciencias

Edif. 103 E, Ciudad Unversitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7050 y 7051

Esta tesis se llevó a cabo en Centro de Investigaciones en
Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la
BUAP.

Con el apoyo de VIEP, DDIE e ICUAP

AGRADECIMIENTOS

Gracias te doy Padre Eterno
por cada risa y cada lágrima,
por cada triunfo y caída
porque me has dado vida y esperanza,
porque solo puedo decir: “hasta aquí me has ayudado”.

Al Laboratorio de Microbiología de Suelos
del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
por permitirme llevar a cabo la realización de este trabajo.

Al SOAPAP por permitirme la entrada a las plantas de tratamiento de aguas y poder realizar
este trabajo.

Al Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del CICM por proporcionarme las cepas control
para este trabajo

Al posgrado en Ciencias Ambientales por la formación académica en Maestría en Ciencias
Ambientales.

Al M.C. Andrés Adolfo Muñoz García por disponer de su tiempo, apoyo y asesoría, así como
proporcionarme los medios necesarios para la realización de este trabajo, pero sobre todo por
brindarme sus conocimientos y su amistad.

Al M.C. Constantino Gil Juárez por acogerme como tesista y disponer de su tiempo, asesoría y apoyo para la revisión de este trabajo.

A dos grandes compañeras y amigas: Alma Cuellar Sánchez y María Sebastiana Pedraza Chan por su colaboración y compartir interminables jornadas de trabajo conmigo.

A la Dra. Edith Chavéz Bravo por su apoyo, asesoría y participación en la revisión de este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Jorge Torres Jácome por el apoyo brindado para gestionar los recursos para este trabajo.

Al Dr. Ygnacio Martínez Laguna por su asesoría y apoyo en la parte molecular de esta tesis.

A la Comisión Revisora de esta Tesis por compartir conmigo sus conocimientos en la revisión y discusión de la misma.

A todos mis compañeros y amigos por su apoyo, comprensión y amistad, y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

MUCHAS GRACIAS.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Silver y Elo

Quienes siempre han estado conmigo y me han enseñado a luchar en la vida, que si te caes hay que levantarse y seguir adelante. Muchas gracias por su apoyo, amor y comprensión, por su ejemplo y ayuda, pero sobre todo por su amor incondicional.

Los Amo.

A mi esposo:

Ricardo

Gracias por darme tu apoyo, comprensión, compañía, amor y cariño. Por permanecer siempre a mi lado y compartir tu vida conmigo, por estar en las buenas y en las malas y darme aliento en los momentos difíciles. Gracias por formar parte de mi vida.

Te Amo

A mi hijo:

Ricardo Uziel

Porque aun cuando eres tan pequeño me has enseñado que cuando uno se aferra a la vida, permanece. Eres la fuerza que Dios me mando para luchar pese a las adversidades y con esa espontaneidad que te caracteriza me has enseñado a sonreírle siempre a la vida.

Te Amo.

A mis hermanos:

Marcia y Daniel

Gracias por su cariño y compañía incondicional y sobre todo porque siempre contare con ustedes.

A mis abuelas y mi tía.

Abuelita Elenita (†), Mother y Tía Blanquita:

Gracias porque siempre han creído en mí. Por todo el amor y los conocimientos compartidos conmigo. Infinitas gracias.

A toda mi familia consanguínea y política:

Muchas gracias por formar parte de mi vida, por compartir hermosos momentos conmigo y estar cuando más lo he necesitado. Gracias a mis tíos, tías, primos, primas, sobrinos, sobrinas, suegros, cuñadas, cuñados y concuña por todo su apoyo.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---------------------------------|-----|
| Índice general. | I |
| Lista de Abreviaturas. | IV |
| Índice de tablas. | VI |
| Índice de figuras. | VII |
| Resumen. | X |
| Summary. | XII |
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Justificación | 4 |
| 3. Objetivos | 6 |
| 4. Antecedentes. | 7 |
| 4.1. Contaminación de los ríos. | 7 |
| 4.2. Contaminantes Orgánicos | 8 |

| | |
|---|----|
| 4.3. Disponibilidad de agua. | 8 |
| 4.4. Situación del Estado de Puebla. | 11 |
| 4.5. Problemática Ambiental. | 14 |
| 4.6. Bioindicadores de Contaminación del agua | 20 |
| 5. Materiales y Métodos. | 22 |
| 5.1. Plantas de Tratamiento y Sitios de Muestreo. | 23 |
| 5.2. Aislamiento. | 26 |
| 5.3. Selección. | 27 |
| 5.4. Identificación | 28 |
| 5.5. Resistencia a Metales. | 29 |
| 5.6. Pruebas Presuntivas de la Resistencia a Antibióticos. | 30 |
| 5.7. Identificación del Patotipo de <i>Escherichia coli</i> . | 31 |
| 6. Resultados | 32 |
| 6.1. Conteo de Población. | 32 |
| 6.2. Identificación. | 35 |
| 6.3. Resultados de la Tolerancia a Metales. | 36 |
| 6.4. Pruebas Presuntivas de la Resistencia a Antibióticos. | |
| 6.5. Comparativo entre la Resistencia a Metales y Antibióticos presentada por las bacterias seleccionadas | 40 |
| 6.6. Determinación de Patotipos de <i>Escherichia coli</i> . | 42 |
| 6.6.1. ETEC | 42 |
| 6.6.2. EPEC | 43 |
| 6.6.2.1. tEPEC | 43 |
| 6.6.2.2. aEPEC | 44 |
| 7. Discusión | 46 |
| 7.1. Aislamiento e Identificación. | 46 |
| 7.2. Resistencia a Antibióticos y Metales | 47 |
| 7.3. <i>E. coli</i> como bioindicador de contaminación | 51 |

| | |
|--|----|
| 8. Conclusiones | 53 |
| 9. Sugerencias | 54 |
| 10. Bibliografía | 55 |
| 11. Anexos | 62 |
| 11.1. Anexo I. Esquema del Tratamiento de Agua Residual en la Planta Alseseca Sur de la Ciudad de Puebla | 62 |
| 11.2. Anexo II. Esquema del Tratamiento de Agua Residual en la Planta Parque Ecológico Revolución Mexicana de la Ciudad de Puebla. | 63 |
| 11.3. Anexo III. NMX-AA-003-1980. Muestreo | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS.

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|---|
| A/E | Aderencia / destrucción |
| AK | Amikacina |
| AM | Ampicilina |
| BFP | Pili formador de Bucles |
| <i>BfpA</i> | Gen del pili formadores de Bucles |
| Bp | Pares de bases |
| CB | Carbenicilina |
| CF | Cefalotina |
| CL | Cloranfenicol |
| Co | Cobalto |
| CONAPO | Consejo Nacional de Población |
| CRO | Ceftriaxona |
| CTX | Cefotaxima |
| Cu | Cobre |
| DBO | Demanda Biológica de Oxígeno |
| dNTP's | Nucleotidos fosfatados |
| EAF | Factor de adherencia de EPEC |
| EPA | Agencia de Protección Ambiental |
| EPEC | <i>E. coli</i> enteropatógena |
| aEPEC | <i>E. coli</i> enteropatógena atípica |
| tEPEC | <i>E. coli</i> enteropatógena típica |
| escD | <i>E. coli</i> proteína secretada del gen D |
| ETEC | <i>E. coli</i> enterotoxigénica |
| Fe | Hierro |
| GE | Gentamicina |
| KM | Kanamicina |
| LEE | Locus de Destrucción del Enterocito regulador positivo de la expresión de genes del LEE |
| <i>Ler</i> | Gen del pili <i>Longus</i> |
| <i>IngA</i> | Pili de tipo IV producido por ETEC |
| Longus | Manganeso |
| Mn | No detectable |
| ND | Netilmicina |
| NET | Nitrofurantoina |
| NF | Niquel |
| Ni | Organización Mundial de la Salud |
| OMS | Organización de las Naciones Unidas |
| ONU | Reacción en Cadenas de la Polimerasa |
| PCR | Pefloxaxina |
| PEF | Partes por millón |
| Ppm | |

SXT
TE
UFC
V
Zn

Trimetoprim-Sulfametoxazol
Tetraciclina
Unidades Formadoras de Colonias
Vanadio
Zinc

ÍNDICE DE TABLAS.

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Géneros seleccionados en los diferentes muestreos | 35 |
| Tabla 2. Patrones de resistencia a antibióticos presentados por las bacterias aisladas en las pruebas de multi-discos BIORAD. | 39 |
| Tabla.3 Patrones de Resistencia a Metales Pesados y Antibióticos en <i>E. coli</i> aisladas de las Plantas de Tratamiento Alseseca Sur, Parque Ecológico y río Alseseca | 40 |
| Tabla.4 Patrones de Resistencia a Metales Pesados y Antibióticos en bacterias aisladas de las Plantas de Tratamiento Alseseca Sur, Parque Ecológico y río Alseseca. | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Enfermedades con la mayor contribución causal del medio ambiente. | 10 |
| Figura 2. Gastos de salud por enfermedades gastrointestinales atribuibles al consumo de agua. | 11 |
| Figura 3. División de las siete regiones del Estado de Puebla. | 12 |
| Figura 4. Ubicación de la Cuenca del Alto Atoyac. | 13 |
| Figura 5. Ríos involucrados en la Cuenca del Alto Atoyac. | 13 |
| Figura 6. Zonas de riego con el agua de la presa de Valsequillo. | 14 |
| Figura 7. Modelo de patogénesis de EPEC. | 21 |
| Figura 8. Sitios de muestreo en la Planta de Tratamiento del Parque Ecológico Revolución Mexicana. | 23 |
| Figura 9. Sitios de muestreo en la Planta de tratamiento Alseseca Sur. | 24 |
| Figura 10. Recolección de muestras del río Alseseca antes de pasar por la planta de tratamiento Alseseca Sur. | 25 |
| Figura 11. Recolección de muestras del río Alseseca después de pasar por la planta de tratamiento Alseseca Sur. | 25 |
| Figura 12. Siembra de las diluciones seriadas decimales en los diferentes medios. | 26 |
| Figura 13 A) agar CPSID3. | 27 |
| Figura 13 B) Agar Sulfito de Bismuto. | 27 |
| Figura 13 C) Agar MH con 50ppm Am. | 27 |
| Figura 14 A) y B) Siembra en Agar CPSID3. | 28 |
| Figura 14 C) Siembra en Agar Chromagar orientation. | 28 |
| Figura 15 Galerías API 20E | 28 |
| Figura 16. Agar TSA con mezcla de metales M1. | 29 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Prueba presuntiva de resistencia a antibióticos. | 30 |
| Figura 18. Conteo de población en Planta Alseseca Sur. | 33 |
| Figura 19. Conteo de población en Planta Parque Ecológico. | 33 |
| Figura 20. Conteo de población de coliformes fecales en el muestreo del Río Alseseca. | 34 |
| Figura 21. Porcentaje de multirresistencia de bacterias aisladas en la Planta de Alseseca Sur. | 34 |
| Figura 22. Porcentaje de multiresistencia de bacterias aisladas en la planta de tratamiento de aguas del Parque Ecológico Revolución Mexicana. | 35 |
| Figura 23. Porcentaje de géneros de bacterias encontrados en influentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas de la ciudad de Puebla y del río Alseseca. | 36 |
| Figura 24. Porcentaje de crecimiento de las cepas aisladas en agar TSA con Zn (100ppm), Cu (100ppm), Mn (100 ppm), Ni (100ppm) y V (100ppm). | 37 |
| Figura 25. Porcentaje de crecimiento de las cepas aisladas en agar TSA con Zn (200ppm), Cu (200ppm), Mn (200 ppm), Ni (200ppm) y V (200ppm). | 38 |
| Figura 26. Porcentaje de crecimiento de las cepas aisladas en agar TSA con Cuatro mezclas de metales diferentes. | 38 |
| Figura 27. Prueba de resistencia a antibióticos con multidisco BIORAD | 38 |
| Figura 28. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio del gen amplificado <i>IngA</i> de la cepa E-9034 y de las muestras problema. | 42 |
| Figura 29. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio del gen amplificado <i>IngA</i> . de la cepa E-9034 y de las muestras problema | 42 |
| Figura 30. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio del gen | 43 |

| | |
|--|----|
| amplificado <i>bfpA</i> de la cepa E2348-69 y las muestras problema. | |
| Figura 31. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. del gen amplificado <i>bfpA</i> de la cepa E2348-69 y las muestras problema. | 44 |
| Figura 32. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio del gen amplificado <i>escD</i> de la cepa E2348-69 y las muestras problema | 45 |
| Figura 35. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio del gen amplificado <i>escD</i> de la cepa E2348-69 y las muestras problema | 45 |

RESUMEN.

México ocupa el lugar 106 entre 122 países en cuanto a calidad de agua, esta situación está asociada a las descargas de aguas residuales que reciben los cuerpos de agua. En el municipio de Puebla el agua residual tratada es vertida al río Alseseca. Durante las últimas décadas se han incrementado las publicaciones de los efectos a largo plazo que los antibióticos y pesticidas tienen en la salud humana y el ambiente, así como los graves problemas que trae la contaminación de las aguas por metales pesados que pueden ser acumulados en los suelos agrícolas resultando peligrosos por su carácter no biodegradable, la toxicidad que ejercen sobre los diferentes cultivos y su biodisponibilidad (Mancilla *et al* 2012). La cercanía existente entre el río y la zona conurbada representa un foco de infección para la población. Frente a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con indicadores biológicos de contaminación. La enterobacteria *Escherichia coli* ha sido seleccionada como el mejor indicador biológico de contaminación en agua (Endberg *et al* 2000, Soller *et al* 2010), en este trabajo se propone que sea utilizada la resistencia a los antibióticos y metales pesados para determinar la contaminación del río Alseseca. Aunque *E. coli* es un residente inocuo del tracto gastrointestinal, también está involucrada en problemas gastrointestinales (Nataro & Kaper 1998). La mortalidad global en niños menores de 5 años en 2010 debida a enfermedades diarreicas están asociadas a EPEC y ETEC acentuando la importancia de *E. coli* patógenas en la carga de morbilidad mundial de las enfermedades diarreicas (Croxen *et al* 2013). La OMS reportó en 2012 que en México las muertes de niños menores de 5 años causadas por enfermedades diarreicas van de 1000 a 10000 muertes al año (World Health Organization. 2012).

En este trabajo se realizaron en total 11 muestreos de agua provenientes de las plantas de tratamiento y del río Alseseca, en los cuales *E. coli* representó el 61% de los aislamientos. Se realizaron pruebas de crecimiento en la presencia de metales a 66 bacterias, obteniéndose un 84% de crecimiento en mezcla de cinco metales (Cu, Zn, Co, Ni, Fe) y de las pruebas presuntivas las resistencias de las cepas fueron: AM (72%), CB (56%), SXT (40%) y CF (40%). Al caracterizar las cepas de *E. coli* en cuanto

a su patotipo se encontró que el 10% de las muestras aisladas pertenece a ETEC y el 15% a EPEC. Concluimos que la resistencia de *E. coli* a antibióticos y metales pesados puede ser utilizado como un bioindicador de contaminación en las aguas del río Alseseca ya que el tratamiento que se da al agua en las plantas de tratamiento en la Ciudad de Puebla es ineficiente. Otro hallazgo importante es que de los aislamientos de *E. coli* el 10% dio positivo al patotipo ETEC y el 15% resultó perteneciente al patotipo EPEC, lo que nos indica que en las plantas de tratamiento de aguas en el municipio de Puebla se libera bacterias resistentes a este tipo de contaminantes y éstas representan un foco de infección para la población que tiene contacto con esta agua.

SUMMARY.

Mexico ranks 106 among 122 countries in terms of water quality, this situation is associated with the discharge of wastewater receiving water bodies. In the municipality of Puebla treated wastewater is discharged into the river Alseseca. During the last decades a growing body of publications reported the long-term effects that antibiotics and pesticides have on human health and the environment as well as the serious problems associated with water contaminated with heavy metals that can be accumulated hazardous for their non-biodegradable nature resulting agricultural soils, toxicity exerted on different crops and its bioavailability (Mancilla *et al* 2012). The existing proximity between the river and the suburbs represents a source of infection for the population. Along with the need to make a quick and reliable assessment of the presence of pathogens in water, there is a need to work with biological indicators of pollution. *Escherichia coli* was selected as the best biological indicator suggesting it is antibiotic and heavy metals resistance be used as an indication of pollution of the Alseseca river. Although *E. coli* can be an innocuous resident of the gastrointestinal tract, it also has the pathogenic capacity to cause diarrheal disease (Nataro and Kaper 1998). Global mortality from diarrhea in children under the age of 5 in 2010 associated with EPEC and ETEC, thus underlining the significant role of pathogenic *E. coli* in the global health burden of diarrheal disease (Croxen *et al* 2013). The World Health Organization reported in the statistics for 2012 published in Mexico child deaths under 5 are caused by diarrheal diseases ranging from 1,000 to 10,000 deaths annually (World Health Organization 2012).

In this work were collected a total of 11 samples among which 61% of isolates were identified as *E. coli*. Growth tests were performed on metals, and 84% of the isolates grew in a mixture of five metals (Cu, Zn, Co, Ni, Fe). The percentage of antibiotic-resistant strains were: AM (72%), CB (56%), SXT (40%) and CF (40%). Among the *E. coli* isolates 10% belonged to ETEC and 15% to the EPEC. We conclude that *E. coli* resistance to antibiotics and heavy metals can be used as a biomarker of pollution in the waters of the river Alseseca. Another important finding is that among the *E. coli* 10%

tested positive for the ETEC pathotype and 15% belong to the EPEC pathotype. These data indicates that the treatment given to water in the city of Puebla is inefficient in the City of Puebla such that bacteria resistant to these pollutants are released and they represent a source of infection for people who have contact with this water.

1 INTRODUCCIÓN

La cantidad de agua dulce en la Tierra es limitada, pero los ciclos naturales de congelación y descongelación, las fluctuaciones en las precipitaciones, los patrones de escorrentías y los niveles de evapotranspiración han provocado cambios en su distribución. A estas causas naturales se han añadido nuevas y continuadas actividades humanas que han acabado convirtiéndose en los principales “motores” de presión sobre los sistemas hídricos de nuestro planeta. Estas presiones suelen ir ligadas al desarrollo humano y al crecimiento económico (UNESCO 2010).

Las antiguas civilizaciones se establecieron alrededor de fuentes de agua, la historia señala que los problemas estéticos como apariencia, olor o sabor desagradable en el agua hicieron que los tratamientos originalmente se enfocaran en mejorar la calidad estética de la misma (U.S.EPA 1999). Los métodos para mejorar el sabor y olor del agua están asentados desde el 4000 A.C. (U.S.EPA 1999) donde se utilizaban métodos tales como filtración por carbón y exposición a la luz solar. Aspectos visibles como la turbidez fue la motivación para iniciar el desarrollo en el tratamiento de ésta. La historia describe que los egipcios cerca del año 1500 A.C. clarificaban el agua utilizando alúmina como coagulante (U.S.EPA, 2000). Durante los años 1700, la filtración fue establecida como un medio efectivo para la remoción de partículas (Sincero & Sincero, 1999). En 1800, la filtración con arena comenzó a ser utilizada en Europa (Sincero & Sincero, 1999) y a principios de 1900 comenzó a utilizarse en Estados Unidos (U.S.EPA; 2000).

A final del siglo diecinueve y principio del siglo veinte los científicos descubrieron que la turbidez no era un problema estético solamente sino que partículas tales como materia fecal, eran las causantes de muchas enfermedades. Como resultado, los diseños de la mayoría de sistemas de tratamiento de agua para beber fabricados en Estados Unidos, fueron impulsados por la necesidad de eliminar la turbidez, y por ende, eliminar los microbios contaminantes responsables de causar brotes de tifoidea, disentería y cólera (U.S.EPA; 2000). Mientras que la filtración probó ser un método efectivo para reducir la turbidez, los desinfectantes, como el cloro jugaron un papel importante reduciendo el número de brotes de enfermedades a principio de 1900. En el 1908 el cloro fue usado por primera vez como desinfectante primordial del agua purificada en Nueva Jersey (Clancey & Rochelle, 2006). Los

Reglamentos Federales del agua purificada de calidad comenzaron en 1914, cuando el Servicio de Salud Pública Estadounidense fijo estándares para la calidad bacteriológica del agua. A finales de 1960 se hizo aparente que los problemas estéticos, de patógenos y las sustancias químicas identificadas por el Sistema de Salud Pública no eran los únicos contaminantes del agua. Los avances en la agricultura, la industria y la creación de sustancias químicas también han tenido impacto negativo en el medio ambiente y en la salud pública.

Durante las últimas décadas se han incrementado las publicaciones sobre los efectos a largo plazo que los antibióticos y pesticidas tienen en la salud humana y el ambiente, así como los graves problemas que trae la contaminación de las aguas por metales pesados, siendo los ríos los mayores receptores de estos contaminantes. Los reportes del 2004 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que el 88% de las enfermedades gastrointestinales son provocadas por consumo de agua insalubre y del saneamiento e higiene deficiente. Este problema comienza a ser alarmante porque los antibióticos, no metabolizados, pasan directamente al ambiente poniéndose en contacto con las poblaciones microbianas, seleccionando la resistencia a dichos antibióticos. Pero lo realmente preocupante es cuando esta resistencia es adquirida o desarrollada en las bacterias patógenas, teniéndose antecedentes de que cuando se desarrolla la resistencia o tolerancia a los metales pesados, se contribuye al mantenimiento de los genes de resistencia a los antibióticos, incrementando la presión selectiva en el ambiente (Kapil *et al.* 2005, Kümmerer 2004). México ocupa el lugar 106 entre 122 países en cuanto a calidad de agua, esta situación está asociada con las descargas de aguas residuales que reciben los cuerpos de agua. En el municipio de Puebla el agua residual tratada es vertida al río Alseseca, que atraviesa el oriente y sur de la ciudad, y la cercanía existente entre el río y la zona conurbada representa un foco de infección para la población.

El Estado de Puebla está dividido en 7 regiones: la región metropolitana de la Ciudad de Puebla, es la más poblada, con más de 2 600, 000 habitantes, que representan el 45% de toda la población del Estado. En esta zona se encuentra la Cuenca Hidrológica del Alto Atoyac, que comprende los ríos Zahuapan, Atoyac y Alseseca. La contaminación a lo largo de estos ríos, tiene su origen en las descargas de aguas residuales urbanas e industriales, que se vierten al lago de Valsequillo, además de que las barrancas y los cauces de arroyos y ríos están siendo utilizados como tiraderos de basura y escombros. El volumen actual de descarga de aguas residuales es del orden de los 5,700 litros por segundo.

Por otra parte, tan sólo en la región de Angelópolis se han establecido más de 100 industrias, de las cuales la mayoría no cumplen con las normas establecidas y descargan a los cauces federales y otras directamente a los drenajes municipales. Se estima que del total de descargas; el 70% corresponde a aguas residuales municipales y 30% a aguas residuales Industriales. En el caso de los residuos de origen doméstico, la carga contaminante está representada por altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal. Estas aguas residuales contaminadas son utilizadas en el Distrito de riego 030 para uso agrícola.

Para monitorear la calidad bacteriológica del agua se requiere una serie de análisis que determinen la presencia de microorganismos patógenos y como alternativa se ha propuesto el uso de indicadores microbianos que se puedan identificar mediante el uso de métodos sencillos, rápidos y económicos. Las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en el agua son las bacterias entéricas que son eliminadas a través de la materia fecal. El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana ya que los coliformes son parte de la microbiota del tracto gastrointestinal del hombre y animales de sangre caliente (Arcos *et al* 2005). Los coliformes están presentes en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades, permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas y se comportan de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección, por la tanto la presencia de coliformes fecales en un suministro de agua es un indicador de que las aguas negras han contaminado el agua.

Dentro del grupo de los coliformes fecales se encuentra *Escherichia coli*; una bacteria que bien puede sobrevivir y aun multiplicarse en determinados substratos. La presencia de *E. coli* en algún alimento indica contaminación con materia fecal. *E. coli* es un agente etiológico de enfermedades gastrointestinales. Las categorías de *E. coli* patogénicas más comúnmente encontradas en países en desarrollo son Enterotoxigénica (ETEC) y Enteropatógena (EPEC) y están asociadas a la mortalidad global en niños menores de 5 años por enfermedades diarreicas. La OMS reporta cifras entre 1000 y 10000 muertes infantiles al año en México por esta causa (Croxen *et al*, 2013)

Es de interés entonces investigar la posible relación entre la resistencia de *E. coli* a los antibióticos y los metales pesados y la contaminación de los ríos importantes de la Ciudad de Puebla. Ya que la contaminación de alimentos y agua potable involucra un problema de salud, problemas económicos, y un desequilibrio ambiental enorme.

2 JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe a nivel mundial la creciente preocupación por el medio ambiente, con la consecuente demanda de información sobre los fenómenos y actividades que le afectan y las actuaciones que permiten su conservación. El Desarrollo Sostenible ha pasado a constituir un objetivo explícito, importante y urgente de nuestra “aldea global” con la consiguiente necesidad de cambio significativo en las pautas de desarrollo, producción, consumo y comportamiento.

Los reportes del 2004 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que el 88% de las enfermedades gastrointestinales son provocadas por consumo de agua insalubre y del saneamiento e higiene deficiente. Este problema comienza a ser alarmante porque los antibióticos, no metabolizados, pasan directamente al ambiente poniéndose en contacto con las poblaciones microbianas, seleccionando la resistencia a dichos antibióticos. Se tienen antecedentes de que cuando se desarrolla la resistencia o tolerancia a los metales pesados, se contribuye al mantenimiento de los genes de resistencia a los antibióticos, incrementando la presión selectiva en el ambiente (Kapil *et al.* 2005, Kümmerer 2004).

Este problema se ha dado precisamente por un consumo insustentable e indiscriminado de los antibióticos, y por una inconciencia ambiental por parte de las industrias que por ahorrarse unos pesos, están destruyendo nuestro entorno, agotando un recurso de vital importancia para todas las formas de vida que habitamos este planeta, y comienza a ser alarmante por que los antibióticos, no metabolizados, pasan directo al ambiente poniéndose en contacto con las poblaciones microbianas, produciendo la resistencia a dichos antibióticos y a agentes antibacterianos, pero lo realmente preocupante es cuando ésta resistencia es adquirida o desarrollada en las bacterias patógenas, volviéndose un problema no tan solo de contaminación de agua, sino de salud ambiental, porque afecta directamente a los seres humanos, representando un fuerte impacto en la salud y en la economía de las poblaciones aunado a esto se tiene conocimiento de que los mecanismos de resistencia a metales pesados aumentan la posibilidad de que las bacterias desarrollen la resistencia a los antibióticos.

Es por estas razones que nace la inquietud en este trabajo de buscar una herramienta, por ejemplo el uso de un bioindicador de contaminación fecal que nos ayude en la detección de contaminación de agua por estos dos agentes contaminantes tan peligrosos que llegan a trastornar tan gravemente el ecosistema acuático, provocando problemas más serios, como los arriba mencionados.

3 OBJETIVOS.

Objetivo general

Establecer indicadores biológicos como la resistencia de *E. coli* a antimicrobianos y metales pesados para determinar la contaminación del Río Alseseca del municipio de Puebla.

Objetivos particulares.

- Investigar la existencia de bacterias resistentes a los antibióticos, antimicrobianos y metales pesados en las aguas del río Alseseca del Municipio de Puebla

- Determinar si la resistencia a antibióticos y a metales pesados encontradas en *E. coli* están relacionadas.

- Evaluar indirectamente con el uso del bioindicador si el proceso actual en las plantas de tratamiento de aguas en el municipio de Puebla libera bacterias resistentes a este tipo de contaminantes y si estas representan un foco de infección para la población que entra en contacto con esta agua.

4 ANTECEDENTES.

4.1 CONTAMINACIÓN DE LOS RÍOS.

Aproximadamente el 75% de la superficie de la Tierra está cubierta de agua, el 97.5% de esta agua es salina, pero del 2.5% restante el 1.975% está congelada en los glaciares, lo cual la hace inaccesible e inutilizable, solo cerca del 0.025% es encontrada en los ríos y es la que podemos utilizar (CONAGUA, 2008). La importancia del agua de los ríos para el desarrollo de las civilizaciones ha sido fundamental, se usa para riego, industria, uso doméstico, pesca y la producción de otros alimentos, así como con fines recreativos (CONAGUA, 2008).

La contaminación de las aguas es uno de los factores importantes que rompe la armonía entre el hombre y su medio (Frers, 2008). Al inicio cuando se producían desechos por la actividad humana los ríos eran utilizados como un depósito natural de basura y eran llevados por la corriente; al introducir estas sustancias la degradación del agua era mínima y sus efectos adversos eran casi imperceptibles por la dilución y la capacidad de autodepuración de los mismos. A inicios del siglo XIX (Dunnette, 1992) con la aparición de la industria y el incremento poblacional casi en un 400%, los efectos de los contaminantes químicos en la salud humana y el ambiente no se notaron inmediatamente, fue hasta principios de los años 60's cuando comenzaron a materializarse. Ejemplo de esto fue el del río Cuyahoga cerca de Cleveland, Ohio (1969) donde productos a base de petróleo flotaban en la superficie provocaron un incendio con llamas que alcanzaban los 20 m de altura lo absurdo de un Río en llamas fue algo que impactó en sobremanera a la sociedad en E.U. sobre la calidad del agua, Cuyahoga fue uno de los tantos sitios alrededor del mundo que comenzaron a captar la atención de la sociedad en general, reflexionando en lo grave del problema. (Miller & Orboc, 2007)

La necesidad de incrementar la calidad de los recursos acuáticos dio origen al desarrollo de agencias estatales y federales de regulación, y leyes estrictas en materia ambiental en los países más desarrollados. La legislación tenía como objetivo la

reducción de los contaminantes químicos en agua superficial y subterránea. Esta regulación tuvo un impacto favorable en la calidad del agua (U.S.EPA, 1997; Lomborg, 2001), sin embargo los problemas de la contaminación de ríos existe en cada región del mundo, alterando los ecosistemas naturales. Un largo listado de contaminantes puede ser encontrado en el agua, sedimento y biota del río, por esta razón se han clasificado en diversos tipos para poder entender su comportamiento en los ambientes acuáticos, aunque es un poco complicado clasificarlos porque un solo contaminante puede ser clasificado en diferentes maneras, pero la más general es dividirlos en contaminantes orgánicos e inorgánicos.

4.2 CONTAMINANTES ORGÁNICOS.

A gran escala los contaminantes orgánicos pueden ser subdivididos en patógenos y otras sustancias orgánicas tóxicas. En los patógenos los de mayor importancia son las bacterias, virus y protozoarios, que están asociados a una gran variedad de enfermedades.

4.3 DISPONIBILIDAD DE AGUA.

De acuerdo con la ONU, más de dos millones de personas en el planeta mueren anualmente debido a enfermedades que se originan en las condiciones sanitarias deficientes y el agua contaminada. América Latina y el Caribe constituyen una región que es considerada como rica en agua, con un 30% de las reservas del planeta, no obstante en la región existen 117 millones de habitantes sin acceso adecuado a los servicios de abasto de agua segura y de tratamiento de aguas.

La disponibilidad de agua en México es de 475 kilómetros cúbicos (Km³), de los cuales 63 Km³ son mantos de agua subterránea y los 412 Km³ restantes son de agua superficial. Sin embargo el crecimiento poblacional observado en el país se pronostica (CONAPO) que en el año 2030 la población del país superará los 127 millones de personas lo que conlleva a una demanda de agua potable en las ciudades. Estas previsiones demandan instaurar políticas, herramientas, dispositivos y técnicas que posibiliten el uso eficiente y racional de este recurso, así como la evaluación de los ya

existentes para la optimización de su aprovechamiento y la utilización de la infraestructura correspondiente.

México enfrenta problemas relativos al abastecimiento de agua en calidad y cantidad adecuadas, ocupa el lugar 106 de entre 122 países en cuanto a calidad de agua; situación asociada con las descargas de aguas residuales que reciben los cuerpos de agua y tiene antecedentes de enfermedades gastrointestinales por contaminación de agua y alimentos. Las ciudades del Sistema Urbano Nacional son abastecidas por agua sustraída del subsuelo a razón de 260 m³/s, cubriendo el 70% de sus necesidades, en contraste para el tratamiento de las aguas residuales solo existen 1, 091 sistemas municipales con capacidad instalada de 82.1 m³/s y con un caudal tratado de 57.8% m³/s. El consumo de agua no apta y la disposición inadecuada de aguas residuales y excretas propician la transmisión de enfermedades entéricas y la posibilidad de brotes de tifoidea, cólera y enfermedades diarreicas agudas (EDAS).

En la región serrana del estado de Chihuahua habitan los tarahumaras, un estudio reciente estimó una prevalencia de 57% de desnutrición crónica entre los niños menores de cinco años. La tasa de mortalidad infantil por enfermedad diarreica en 1998 fue de 23.45 x 100 000 habitantes en el estado de Chihuahua. En Morelos se analizaron muestras de agua de tomas domiciliarias y pozos, productos vegetales de consumo crudo, pozol alimento fermentado, el estudio de niños con diarrea mostró en las heces presencia de estas cepas (Eslava, 2001). En Tabasco se realizó un estudio para determinar las causas principales de diarrea aguda en el estado y se encontraron tres de las bacterias que causan este tipo de enfermedad: *E. coli*, *Vibrio cholerae*, y *Salmonella* (Borbolla et al, 2004).

Según la OMS el 80 % de las enfermedades infecciosas y parasitarias son gastrointestinales y una tercera parte de las defunciones causadas por éstas se deben al uso y consumo de agua insalubre (Castillo, 2001). En el informe presentado en el 4° Seminario Salud y Medio Ambiente en Aragón (Octubre 2006) se menciona que: “Cada año mueren más de 3.000.000 de menores de 5 años por causas y afecciones relacionadas con el medioambiente de los cuales 1.600.000 por afecciones diarreicas”.

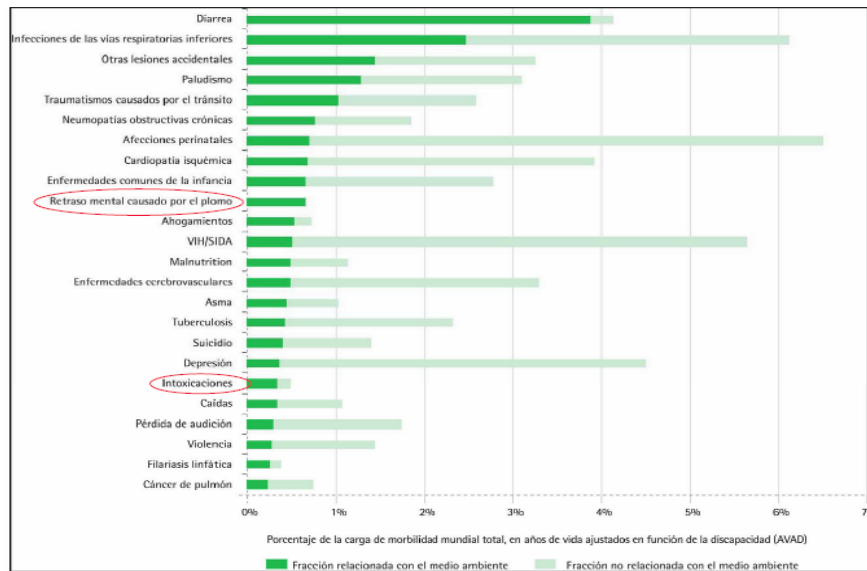


Figura 1. Enfermedades con la mayor contribución causal del medio ambiente (Ambientes Saludables y Prevención de enfermedades 2006, OMS).

En países en desarrollo los niños pierden como promedio, 8 veces más años de vida sana por habitante que los niños de otros países, debido a enfermedades de origen ambiental (Prüss-Üstün *et al*, 2006). En México en el año 2000, se notificaron 5'184,776 casos de infecciones intestinales, de los cuales el 32 %, 1'623,251 casos corresponden a niños menores de cinco años, ocupando el segundo lugar entre las primeras veinte causas de morbilidad en el país, con una tasa de 5,206 por 100,000 habitantes. Los gastos en salud por enfermedades atribuibles al consumo de agua insalubre se aproximan a los \$1 500 000 000 para el total de casos en el 2004.

| DESCRIPCIÓN | GASTO UNITARIO | GASTO TOTAL |
|--|----------------|--|
| Promedio consultas y medicinas (IMSS) | 127 | 548'570,150 |
| Gasto en educación (considerando una semana de ausencia y 45% de los casos en niños en edad escolar) | 212 | 412'075,530 |
| Incapacidades pagadas (considerando una semana de ausencia y 36% de los casos son adultos en edad productiva) | 316 | 495'475,471 |
| TOTAL Para el total de casos 2004 | | 1'456,121,151 (132'374,650 dls) |

Figura 2. Gastos de salud por enfermedades gastrointestinales atribuibles al consumo de agua. Fuente: Calidad de Agua para consumo humano en México. Encuentro sobre uso y resultado de la aplicación de tecnologías económicas para la purificación de aguas en América Latina. 2004

4.4 SITUACIÓN DEL ESTADO DE PUEBLA.

Cerca de 300 kilómetros de ríos, arroyos y barrancas cruzan la zona metropolitana de Puebla. El Estado está dividido en 7 regiones: la Sierra Norte, La Sierra Nororiental, Serdán, Tehuacán y Sierra Negra; Mixteca, Valle de Atlixco e Izúcar de Matamoros, y la región de Angelópolis, esta última es la más poblada, con más de 2 600, 000 habitantes, que representa el 45% de toda la población del Estado (Fig.3). En esta región se encuentran 22 Municipios del Estado de Puebla y 48 municipios del Estado de Tlaxcala. Esta zona hace 60 años contaba con aproximadamente 400 mil habitantes, hoy son del orden de los 3'300,000 (tres millones trescientos mil), colocándola como la cuarta zona conurbada más grande del País.

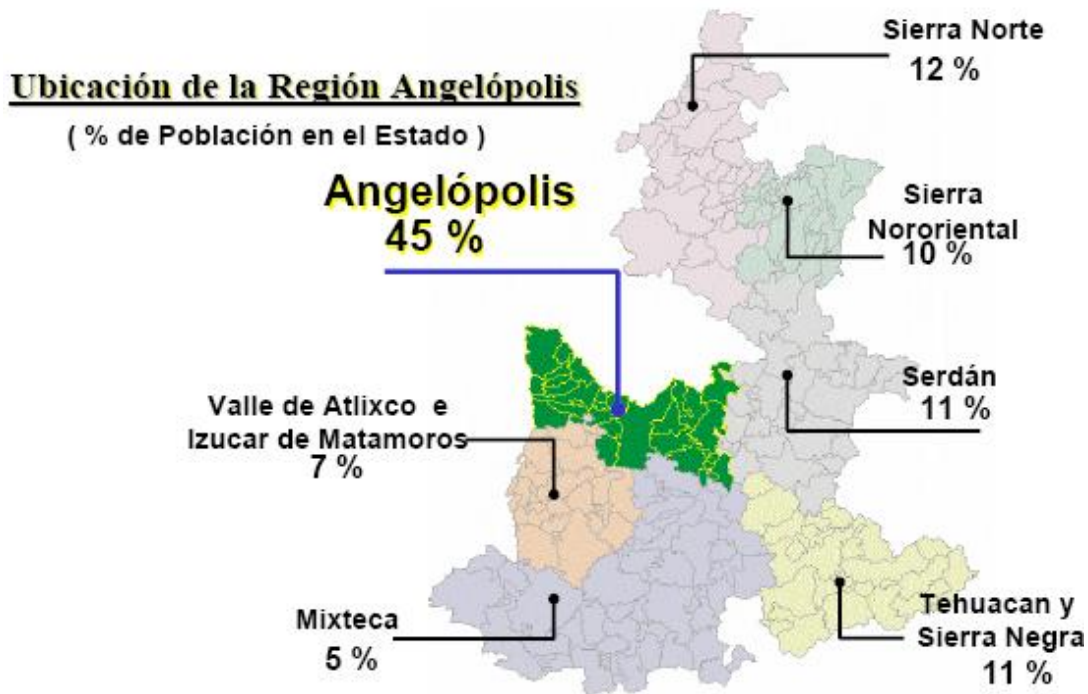


Figura 3. División de las siete regiones del Estado de Puebla Fuente: Proyecto Rescate Ecológico de los Ríos Zahuapan, Atoyac, Alseseca y Presa Valsequillo. IV Foro Mundial del Agua

En esta zona se encuentra la Cuenca Hidrológica del Alto Atoyac (Fig.4), por el Norte sus escurrimientos dan origen al Río Zahuapan, que se encuentra en el Estado de Tlaxcala, en el Oriente los escurrimientos dan origen al Río Alseseca y al Poniente con los escurrimientos del Popocatepetl y el Iztaccíhuatl se forma el Río Atoyac, que se encuentran en el Estado de Puebla. Esta investigación se centrará en el estudio del Río Alseseca, que es una parte importante en esta cuenca y en la ciudad.

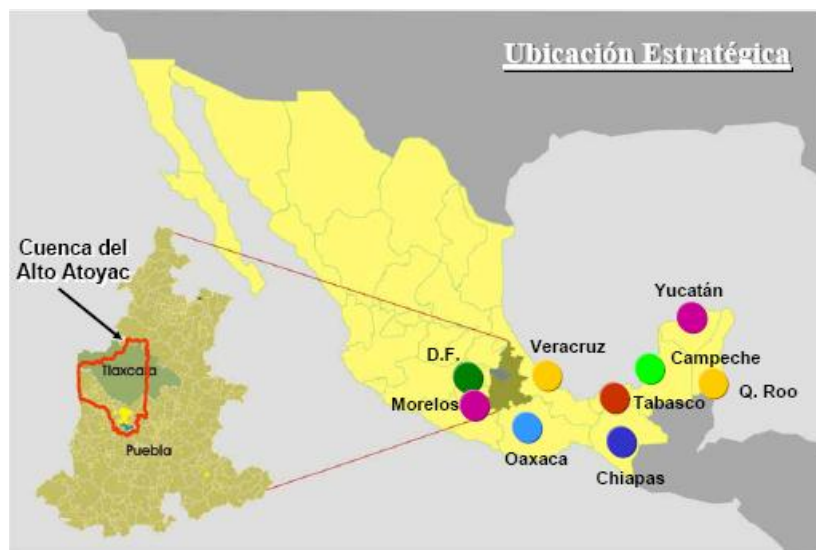


Figura 4. Ubicación de la Cuenca del Alto Atoyac. Fuente: Proyecto Rescate Ecológico de los Ríos Zahuapan, Atoyac, Alseseca y Presa Valsequillo. IV Foro Mundial del Agua

Con la confluencia de estos tres Ríos en 1946 la extinta Secretaría de Recursos Hidráulicos construyó la Presa Manuel Ávila Camacho, y que hoy conocemos como presa de Valsequillo (Fig.5). Gran parte de las aguas residuales sin tratamiento previo eran descargadas a esta presa, que fue construida para el riego agrícola de 33,000 hectáreas con lo que se afecta a más de 240 mil habitantes cuya actividad principal era la agricultura. Los valles para los que se construyó esta presa fueron los valles del Distrito 030 y la zona de Riego de Atlixco- Izúcar de Matamoros (Fig.6), el cual tiene riego restringido por la contaminación del agua, a la fecha.



Figura 5. Ríos involucrados en la Cuenca del Alto Atoyac. Fuente: Proyecto Rescate Ecológico de los Ríos Zahuapan, Atoyac, Alseseca y Presa Valsequillo. IV Foro Mundial del Agua

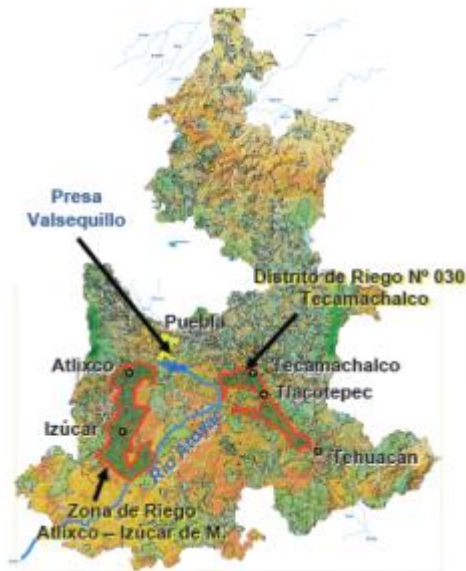


Figura 6. Zonas de riego con el agua de la presa de Valsequillo. Fuente: Proyecto Rescate Ecológico de los Ríos Zahuapan, Atoyac, Alseseca y Presa Valsequillo. IV Foro Mundial del Agua

4.5 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL.

La contaminación a lo largo de los ríos Zahuapan, Atoyac y Alseseca, tiene su origen en las descargas de aguas residuales urbanas e industriales, que sin tratamiento previo, se vierten al lago de Valsequillo, además de que las barrancas y los cauces de arroyos y ríos están siendo utilizados como tiraderos de basura y escombros. El volumen actual de descarga de aguas residuales es del orden de los 5,700 litros por segundo. En la región de Angelópolis se han establecido más de 100 Industrias donde la mayoría no cumple con las normas establecidas y descargan a los cauces federales y a los drenajes municipales. Se estima que del total de descargas; el 70% corresponde a aguas residuales Municipales y 30% a aguas residuales Industriales.

Estas aguas residuales contaminadas, son utilizadas en el Distrito de riego 030 para uso agrícola y debido a la contaminación sólo puede ser empleada para riego de cultivos de tallo alto, como son: forrajes, maíz, cebada, trigo, etc., por lo que los campesinos de la región no pueden sembrar cultivos de alto valor afectando su economía.

Es por estas razones que nace la inquietud en este trabajo de buscar una herramienta, por ejemplo el uso de un bioindicador de contaminación fecal que nos ayude en la detección de contaminación de agua por estos dos agentes contaminantes tan peligrosos que llegan a trastornar tan gravemente el ecosistema acuático, provocando problemas más serios, como los arriba mencionados

En Octubre de 1998 se definieron las acciones de saneamiento de la ciudad de Puebla que iniciaron en Octubre de 1999 y concluyeron en Febrero de 2002, entre ellas se incluyeron 5 sistemas con planta de tratamiento: Atoyac, Alseseca, San Francisco, Parque Ecológico y Barranca del Conde. En este estudio nos enfocamos a dos de ellas, la planta de tratamiento Alseseca Sur, ubicada en el municipio de San Francisco Totimehuacan y la planta de tratamiento del Parque Ecológico ubicada en la ciudad de Puebla.

El tratamiento que se da al agua en la planta Alseseca Sur es un **Tratamiento Primario Avanzado** (Anexo I) con un tiempo de retención de 1 hora y consta de las siguientes etapas:

Pre-tratamiento:

La entrada de agua cruda cuenta con la fase de cribado grueso donde se retira el material con un diámetro mayor de 5 cm. seguido de la etapa de cribado fino, donde son retirados los objetos con un diámetro mayor a 1cm.

De esta etapa sigue al tanque desarenador y desengrasador, donde se inyecta aire violentamente, para desprendimiento de grasa y arena, enseguida se aplica un burbujeo fino para retirar la grasa, en esta etapa las partículas sedimentan y es separada el agua de la arena por decantación, teniendo el agua en esta etapa un tiempo de retención de 22 min., la grasa se mezcla con los lodos del tratamiento Primario y son enviados a otra Planta para su tratamiento.

Tratamiento Primario:

Es un tratamiento químico donde se agregan un coagulante (sulfato de aluminio) y un floculante, logrando así que la materia orgánica forme flóculos, retirándola por decantación y manualmente.

Otros:

Se realiza una desinfección con cloro, esta es la última etapa de esta planta y una vez que termina el proceso, el agua se vierte al río.

El tratamiento que se da al agua en la Planta de tratamiento del Parque Ecológico es un **Tratamiento secundario**, (Anexo II) con un tiempo de retención de una hora.

Pre-tratamiento:

La entrada de agua cruda cuenta con la fase de cribado grueso donde se retira el material con un diámetro mayor de 5 cm. seguido de la etapa de cribado fino, donde son retirados los objetos con un diámetro mayor a 1cm.

De esta etapa sigue al tanque desarenador y desengrasador, donde se inyecta aire violentamente, para desprendimiento de grasa y arena, enseguida se aplica un burbujeo fino para retirar la grasa, en esta etapa las partículas sedimentan y es separada el agua de la arena por decantación, teniendo el agua en esta etapa un tiempo de retención de 22 min., la grasa se mezcla con los lodos del tratamiento primario y son enviados a otra planta para su tratamiento.

Tratamiento Primario:

Es un tratamiento químico donde se agregan un coagulante (sulfato de aluminio) y un floculante, logrando así que la materia orgánica forme flóculos, retirándola por decantación y manualmente.

Tratamiento Secundario:

Los tratamiento biológicos tienen por objeto la eliminación de la materia orgánica, lo que nos ayuda en esta planta a tener una mayor disminución de la DBO, también tiene la capacidad de la retención de la materia sólida en suspensión y coloidal así que eliminará una cantidad de compuestos que puede

que no sean biodegradables pero que quedan retenidos en la biopelícula que forman las bacterias, tiene también una reducción de nutrientes los cuales contiene esta agua por el uso de detergentes domésticos, y también existe la reducción de patógenos entre los beneficios de este tratamiento.

En esta parte del tratamiento se cuenta con biodiscos, en donde se lleva a cabo el tratamiento secundario arriba descrito.

Otros:

Se realiza una desinfección con cloro, esta es la última etapa de esta planta y una vez que termina el proceso, parte del agua se utiliza para riego de áreas verdes en el mismo parque y el resto es enviado al río.

La contaminación de las aguas superficiales en el país es un problema que ha sido objeto de estudio en los últimos años (Soto-Galera *et al.* 1994, Downs *et al.* 1999, Hene *et al.* 2002). Las fuentes de contaminación son descargas de drenaje doméstico, industrial y actividad agropecuaria (Gold-Bouchot *et al.* 1997, Downs *et al.* 1999).

El tratamiento que se da al agua residual en las plantas de tratamiento del municipio es ineficiente siendo vertida al río Alseseca que atraviesa la ciudad, la cercanía que existe entre el río y la zona conurbada representa un foco de infección para la población. Según la OMS el 80 % de las enfermedades infecciosas y parasitarias son gastrointestinales y el 88% de estas, son producto de un abastecimiento de agua insalubre, de un saneamiento y una higiene deficientes.

4.6 BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN DE AGUA.

Frente a la necesidad de hacer una evaluación rápida y fiable de la presencia de patógenos en el agua, se ha planteado la necesidad de trabajar con bioindicadores de contaminación de agua (Campos, 1999). Los microorganismos indicadores son

aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos, concentración y reacción frente a factores ambientales, pero su identificación es más sencilla, rápida y económica. Una vez que se ha demostrado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador (Campos, 1999).

Un microorganismo indicador de contaminación fecal debe reunir las siguientes características (Fernández et al 2001):

1. Los indicadores deberán estar presentes siempre que lo estén los patógenos, y ausentes en aguas no contaminadas.
2. Deben encontrarse en número mucho mayor que los patógenos.
3. Deberían presentar un mayor grado de resistencia que los patógenos a las condiciones ambientales y procesos de tratamiento.
4. Su aislamiento, recuento e identificación debe ser fácil.

La identificación de microorganismos coliformes en agua es adecuada como indicador de contaminación bacteriana debido a que éstos son habitantes de la microbiota del tracto gastrointestinal del hombre y animales de sangre caliente, están presentes en grandes cantidades, permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas y se comportan de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección. Los microorganismos que conforman el grupo de los coliformes totales son: *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, los cuales viven como saprófitos independientes o como bacterias intestinales (Arcos et al, 2005). Estas bacterias son de interés clínico, ya que pueden ser capaces de generar infecciones oportunistas en el tracto respiratorio superior e inferior, además de bacteremia, infecciones de piel y tejidos blandos, enfermedad diarreica aguda y otras enfermedades severas en el ser humano (Moore et al, 2005).

La presencia de coliformes totales debe interpretarse de acuerdo con el tipo de aguas: deben estar ausentes en 85% de las muestras de aguas potables tratadas. En

caso de estar presentes, su número no puede ser superior a 2-3 coliformes. Esta contaminación a pesar de ser baja, no puede ocurrir en tres muestras recolectadas en días consecutivos. En aguas tratadas, los coliformes totales funcionan como un alerta de que ocurrió contaminación, sin identificar el origen. Indican que hubo fallas en el tratamiento, en la distribución o en las propias fuentes domiciliarias. Su presencia acciona los mecanismos de control de calidad y de procesamiento dentro de la planta de tratamiento de agua, e intensifica la vigilancia en la red de distribución (Harwood et al 2005).

Edberg *et al*, 2000 reportaron que *E. coli* es el mejor indicador biológico en agua potable para la protección de la salud pública y mencionan que *E. coli* sobrevive en agua potable entre 4 y 12 semanas dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura, micro flora, etc.), lo que hace que en los sistemas de distribución sea el microorganismo que perdure y por ende el que sirva de indicador de contaminación. También menciona que los géneros que engloban la prueba de coliformes totales (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* y *E. coli*) son encontrados en vida libre en el ambiente y no están asociados propiamente con contaminación fecal, por lo que no implican un riesgo para la salud, y que *E. coli* es la única que es habitante indudable del tracto gastrointestinal.

E. coli está involucrada en problemas gastrointestinales, es por esto que también es de interés clínico ya que dentro de las infecciones intestinales las *E. coli* se han clasificado en seis patotipos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998).

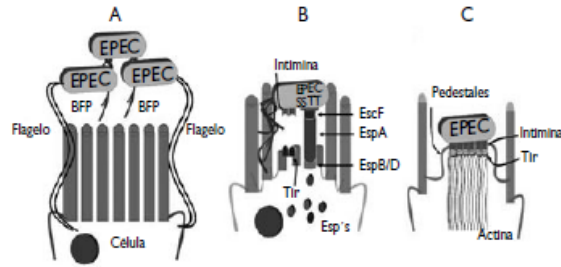
Las cepas de ETEC producen dos toxinas: LT (toxina termolábil) y ST (toxina termoestable), que actúan incrementando los niveles de Adenosina-5'- (AMPc) y Guanosina-5'- monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente. Esto provoca que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de agua y electrolitos, con la consecuente disminución en la absorción de las vellosidades, lo que clínicamente se manifiesta como diarrea acuosa (Qadri *et al* 2005). Existen más de 20 factores de

colonización (CF) en las cepas de ETEC, estos CFs le permiten a la bacteria adherirse al intestino. Uno de estos factores es Longus (CS21) que es un pilus tipo 4 hallado en el 30-40 % de los aislamientos en diferentes regiones del mundo (Girón, 1994, Gutiérrez *et al* 2000, Qadri *et al* 2000, Guth *et al* 2010, Nishimura *et al*, 2002)

En EPEC, se ha involucrado al pilus BFP (bundle-forming pilus) como un factor de virulencia característico que participa en el proceso de adherencia de la bacteria a células epiteliales (Girón *et al* 1991) al promover la adherencia a enterocitos. Posteriormente se produce adherencia íntima mediada por la proteína intimina y la polimerización de la actina del citoesqueleto promovida por la inyección de efectores a través del sistema de secreción tipo 3, seguida de la destrucción de las microvellosidades. Los cambios bioquímicos relacionados con este proceso son los que inducen probablemente la secreción de agua y electrolitos al espacio intraluminal, produciendo diarrea aguda (Nataro & Kaper, 1998, Kaper *et al* 2004, Trabulsi *et al*, 2002, Lacher *et al*, 2007, Ochoa *et al* 2008).

EPEC induce alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión AE (adherencia y eliminación). La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito.

Para fines prácticos, el modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres fases: a) adherencia inicial, b) inyección de factores y transducción de señales, y c) contacto íntimo.

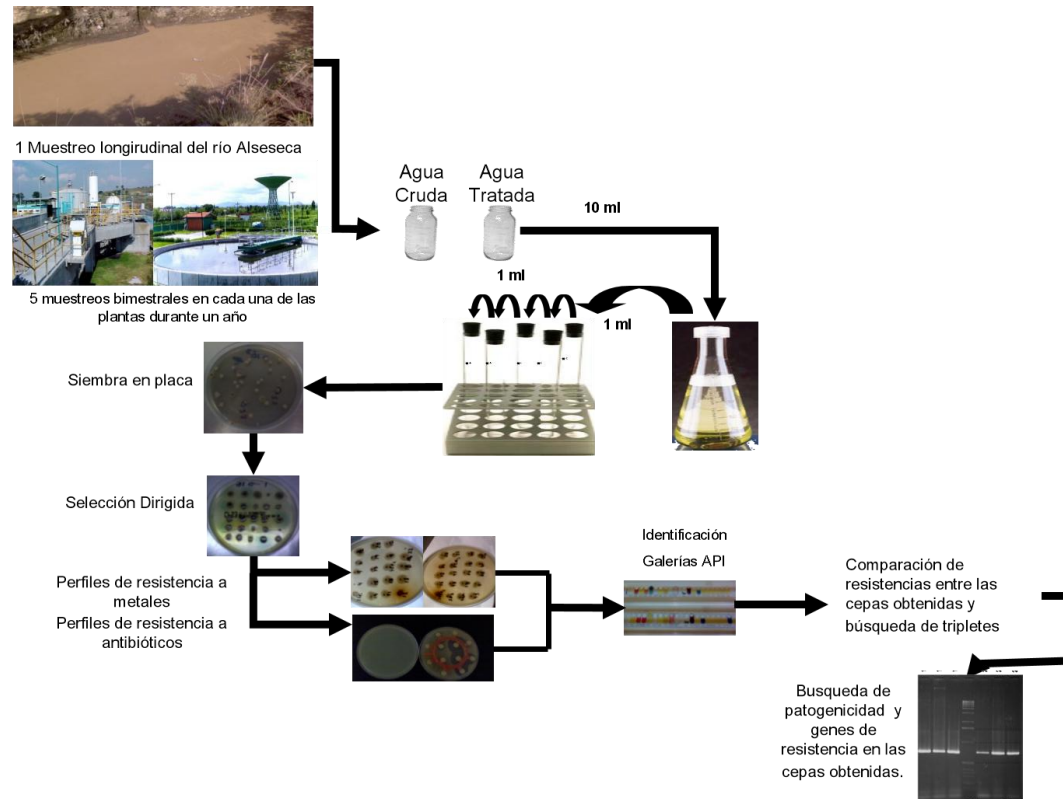


A) Los PFP permiten que las bacterias interactúen entre ellas para formar una microcolonia y el flagelo establece el contacto inicial de la microcolonia con la célula epitelial. B) Una vez adherida a la célula, EPEC inyecta factores de virulencia (Esp) mediante el SST-translocón, entre ellos Tir, que se inserta en la membrana de la célula y expone una región en el espacio extracelular. C) La intimina (una proteína de membrana externa) se une con firmeza a Tir y se induce el reacomodo del citoesqueleto, lo cual favorece la formación de los pedestales de actina y la desaparición de las microvellosidades absorptivas; ello da lugar a la lesión A/E

Figura 7. Modelo de patogénesis de EPEC. Fuente Rodriguez-Angeles 2002

Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes *eae* para la intimina, que participa en AE, y el plásmido EAF que codifica para el BFP y se dice que son atípicas cuando sólo presentan el gen *eae* pero no el plásmido EAF (Kaper *et al*, 2004) Los genes requeridos para la formación de la lesión AE, incluyendo el gen *eae* que codifica para la intimina están localizados dentro de la isla de patogenicidad LEE (McDaniel *et al* 1995). Se sabe que el gen *ler* regula los principales operones dentro de LEE, Elliot *et al* 2000 reportan que las transcripciones mRNA para *rorf2*, *orf10*, *rorf10*, *orf19* y *escD* (*rorf11*) estaban ausentes o muy reducidas en ausencia de *Ler*;, si alguna de estas proteínas está presente en *E. coli*, *ler* estará y LEE por lo consiguiente, entonces la lesión podrá llevarse a cabo.

5 MATERIALES Y MÉTODOS.



5.1 PLANTAS DE TRATAMIENTO Y SITIOS DE ESTUDIO.

Se efectuaron muestreos longitudinales bimestrales en dos plantas de tratamiento de aguas residuales del río Alsesecca y del Parque Ecológico.

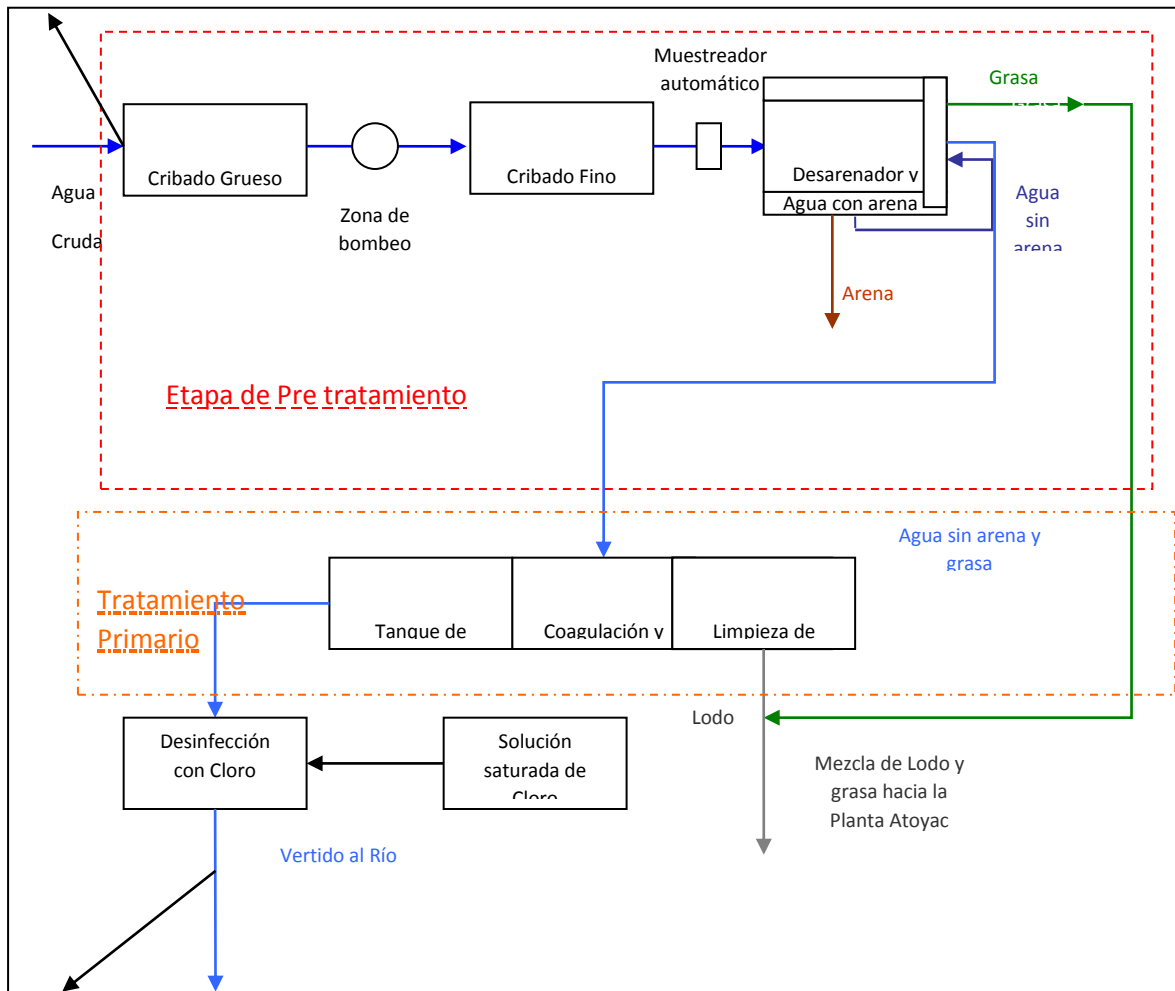
Se efectuaron 5 muestreos en la planta de tratamiento de aguas del Parque Ecológico Revolución Mexicana, recibe descarga de agua residual municipal, la recolección de las muestras fue del influente y del efluente de la planta (Fig.8) y fueron muestras simples (Anexo III) recolectadas entre las estaciones Invierno 2005- 2006 a Invierno 2006-2007



Figura 8. Sitios de muestreo en la planta de tratamiento del parque ecológico Revolución Mexicana

Se efectuaron 4 muestreos en la planta de tratamiento de aguas Alseseca Sur que recibe descargas de agua residual tanto municipal como industrial, la recolección de las muestras fue del influente y del efluente de la planta (Fig.9) y fueron muestras simples recolectadas entre las estaciones Otoño 2005 a Otoño 2006.

Toma de muestra del influente de la Planta Alseseca Sur



.Toma de muestra del efluente de la Planta Alseseca Sur

Figura 9. Sitios de muestreo en la Planta de tratamiento Alseseca Sur.

Se realizó también un muestreo longitudinal del río Alseseca. Los muestreos fueron bimestrales en las dos plantas de tratamiento.



Figura 10. Recolección de Muestras del río Alseseca antes de pasar por la Planta de Tratamiento Alseseca Sur



Figura 11. Recolección de Muestras del río Alseseca después de pasar por la Planta de Tratamiento Alseseca Sur

En las figuras 10 y 11 se aprecia el sitio en donde se muestreo en el rio Alseseca, fueron muestras simples.

5.2 AISLAMIENTO.

Materiales:

- Solución salina isotónica (0.85%)
- Agar MacConkey
- Agar *Pseudomonas* con ceftrixima (100 mg/l)
- Agar Mueller Hinton con 4 diferentes antibióticos:
 - Kanamicina (KM) (10 ppm)
 - Ampicilina (AM) (50 ppm)
 - Tetraciclina (TE) (10 ppm)
 - Cloranfenicol (CL) (10 ppm)

Métodos.

- Diluciones seriadas decimales
- Método de dilución en placa
- Muestreo de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas.

El método empleado fue el muestreo simple del influente y efluente del agua de las plantas de tratamiento, se realizó de acuerdo a la norma oficial mexicana NMX-AA-003-1980 (Anexo III), la siembra se efectuó dentro de las 2 horas posteriores, por el método de dilución en placa, las diluciones que se sembraron fueron 10^4 , 10^5 y 10^6 , sembrando 0.1 mL de cada una de las diluciones anteriormente mencionadas en los 6 medios arriba descritos, e incubándose a 30°C por tres días (Fig.12), realizándose el aislamiento al tercer día del conteo (Ashbot 2003).

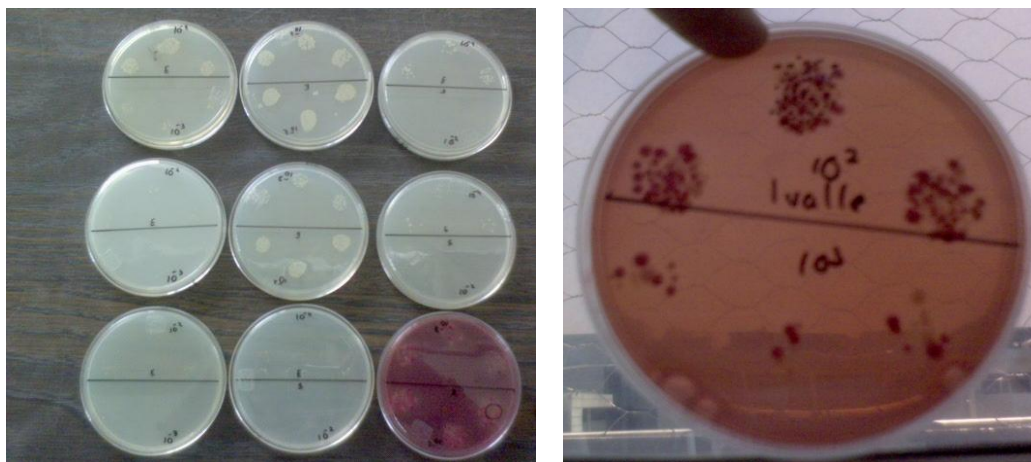


Figura 12. Siembra de las diluciones seriadas decimales en los diferentes medios.

5.3 SELECCIÓN.

Para cumplir con el objetivo de este trabajo se establecieron criterios de selección que consistieron en elegir bacterias de la familia *enterobacteriaceae* con las que pudiéramos trabajar como bioindicador de contaminación en las aguas, se realizaron siembras en medios de cultivo selectivos que descartaran aquellas colonias de esta familia que no eran de nuestro interés como los patógenos y descartar también a los bacilos gram-negativos no fermentadores.

Materiales.

- Agar Mac Conkey
- Agar Sulfito de Bismuto
- Agar Cromogénico CPS ID3
- Chromagar Salmonella
- Agar Soya Trypticasa
- Prueba de Oxidación y Fermentación de glucosa
- Prueba de oxidasa y catalasa.
- Agar Mueller Hinton con 4 diferentes antibióticos:
 - Kanamicina (Km) (10 ppm)
 - Ampicilina (AM) (50 ppm)
 - Tetraciclina (TE) (10 ppm)
 - Cloranfenicol (CL) (10 ppm)

Métodos.

- Siembra con replicador en agar Cromogénico CPS ID3 (Fig.13A)
- Agar MH adicionado con 4 diferentes antibióticos KM (10 ppm), AM (50 ppm), TE (10 ppm), CL (10 ppm) (Fig 13C)

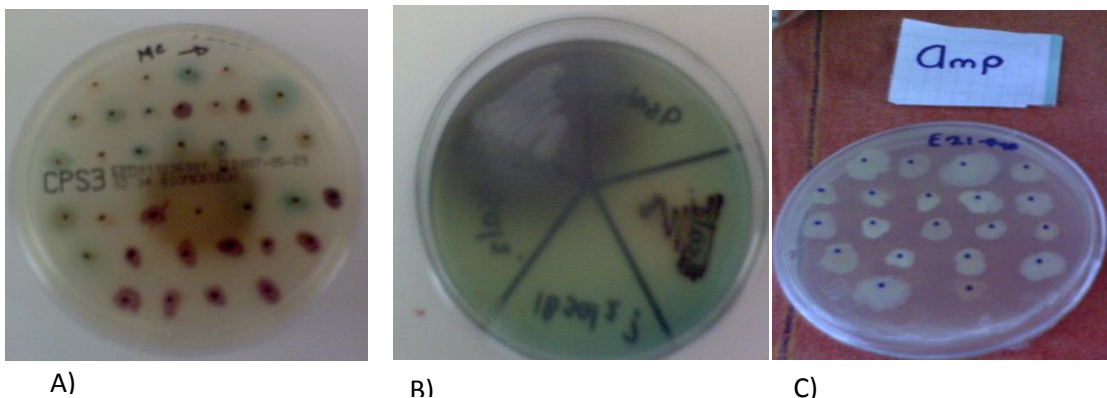


Figura 13 A) agar CPSID3 B) Agar Sulfito de Bismuto C) Agar MH con 50ppm AM

5.4 IDENTIFICACIÓN.

Las colonias que cumplieron con los criterios de selección establecidos fueron identificadas mediante cuatro sistemas de identificación diferentes. Dos de ellos agares cromogénicos en los que el crecimiento de la bacteria produce un pigmento característico de acuerdo a su género, los otros dos son baterías de pruebas bioquímicas mediante las cuales se identifica los géneros de las bacterias.

Materiales.

- Galerías API 20 E
- Agar Chromagar Orientation
- Agar CPS ID3
- Galerías API 20 NE

Métodos.

Las pruebas de identificación se realizaron utilizando Chromagar Orientation, y Agar CPS ID3 (Fig.14), así como baterías de prueba API 20 E (Fig.15) y API 20NE siguiendo las direcciones del fabricante (Biomerieux), dejándose en incubación por 1 día a 30° y después registrándose las lecturas.

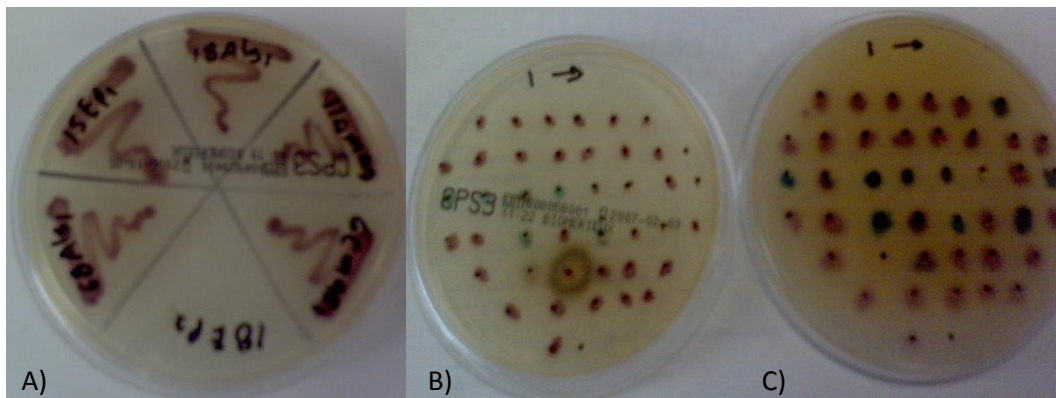


Figura 14. A) y B) Siembra en Agar CPSID3, C) Siembra en Agar Chromagar orientation



Figura 15. Galerías API20E

5.5 RESISTENCIA A METALES.

Se realizó la siembra con replicador en agar Soya- Trypticasa, con concentraciones crecientes del metal (Zn, Mn, Cu, Ni, V) y en cuatro mezclas diferentes de metales (Cu, Zn y Co) (Cu, Zn y Ni) (Cu, Ni, Co), (Fe, Ni y Co). Se hicieron lecturas a las 24,48 y 72 horas (Fig.16).

Materiales

- Agar Soya tripticasa (TSA)
- Metales utilizados por separado:
 - Zn (100 y 200 ppm)
 - Mn (100 y 200 ppm)
 - Cu (100 y 200 ppm)
 - Ni (100 y 200 ppm)
 - V (100 y 200 ppm)
- Mezclas de metales:
 - M1: Cu,Zn,Co (50 ppm)
 - M2:Cu,Zn,Ni (50 ppm)
 - M3:Cu,Ni,Co (50 ppm)
 - M4:Fe,Ni,Co (50 ppm)

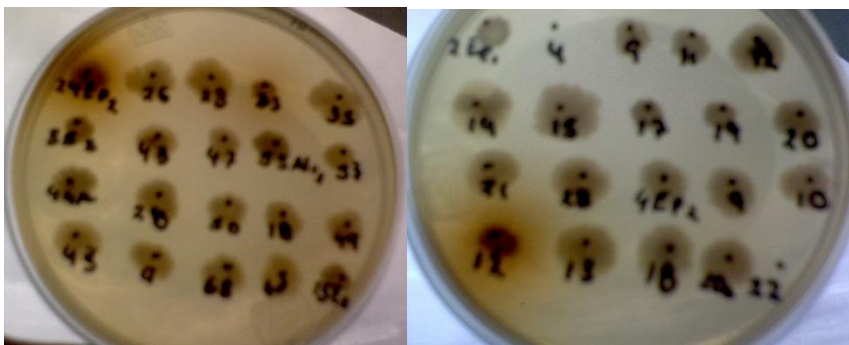


Figura 16. Agar TSA con mezcla de metales M1

5.6 PRUEBAS PRESUNTIVAS DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

Materiales.

- Agar Mueller Hinton
- Multidiscos Bio-Rad para bacterias Gram-negativas.
- Antibióticos probados:
 - amikacina (30mg)
 - ampicilina (10mg),
 - carbenicilina (100mg),
 - cefalotina (30mg),
 - cefotaxima (30mg),
 - ceftriaxona (30mg),
 - cloranfenicol (30mg),
 - gentamicina (10mg),
 - netilmicina (30mg),
 - nitrofurantoina (300mg),
 - trimetoprim-sulfametoxazol (25mg)
 - pefloxacina (5mg).

Métodos.

- Técnica de Bauer-Kirby modificada.

Se realizó la siembra de las cepas a probar en caldo luria, pH 7 y se incubaron por 24 horas a 37°C. Cuando las cepas estaban crecidas, se sembraron 50 μ L del tubo en agar Mueller Hinton, pH 7, siembra por estría masiva y se sembraron por duplicado, a una de las siembras se les colocó el disco de Bio Rad y el otro se utilizó como testigo, la lectura de los halos de inhibición se realizaron a las 24 h de la siembra con un vernier (Fig.17).



Figura 17. Prueba presuntiva de resistencia a antibióticos

5.7 IDENTIFICACIÓN DEL PATOTIPO DE *ESCHERICHIA COLI*

Materiales utilizados para la técnica de PCR.

- TAQ BIOLASE DNA POLIMERASE 500 U que incluye: buffer NH₄ 10x y solución MgCl₂
- dNTP'S SET 4 x 25 uM, Conc: 100 mM
- Oligonucleótidos para *bfpA*, *IngA* y *escD*

Extracción de DNA.

La reacción usa una plantilla de ADN, dos oligonucleótidos “cebadores” o iniciadores (primers), de 20 a 28 bases complementarias a su secuencia de ADN. La elongación de los cebadores es catalizada por la enzima Taq ADN polimerasa. La mezcla de cebadores, ADN, dNTP´S y Taq, es calentada para permitir la separación de las cadenas de ADN que contiene las secuencias de interés, y luego es enfriada para permitir que los cebadores encuentren su secuencia complementaria, se acoplen a ella y la Taq polimerasa inicie la extensión de los cebadores y genere una nueva cadena. Con series de calentamiento enfriamiento se multiplica el ADN de forma exponencial (Sharrocks, 1994).

Se utilizaron los oligonucleótidos para la amplificación de la región de 326-pb del gen *bfpA* y la región 630-pb del gen *IngA* reportados por Donnenberg (Donnenberg *et al* 1992) y por Gutiérrez (Gutiérrez-Cazares 2000), así como la región de 170-pb del gen *EscD* mediante los oligonucleótidos reportados por Elliot (Elliot *et al* 2000) para búsqueda de *Escherichia coli* Enteropatógena atípica.

Los oligos correspondientes para cada factor de virulencia se usaron en una reacción de amplificación (17µL H₂O, 3µL de Buffer NH₄ 10x, 1µL MgCl₂, dNTP´s 0.5µL, 0.5 µL oligos y 0.5 µL de Taq DNA polimerasa) en la que se re suspendió la muestra problema; dicha mezcla se sometió a 29, 35 y 35 ciclos de amplificación respectivamente, las muestras se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa al 1% durante 90 minutos a un voltaje de 70V y por último se tiñeron con bromuro de

etidio para ser observados en el sistema de documentación de imágenes equipado con transiluminador de luz UV registrándose en el software Quantity One 4.2.1.

6 RESULTADOS.

6.1 CONTEO DE POBLACIÓN.

Se realizaron en total 11 muestreos, 5 en la Planta del Parque Ecológico Revolución Mexicana, 4 muestreos en la Planta Alseseca Sur y 2 muestreos en el Río Alseseca uno antes de la Planta de tratamiento, cerca del Panteón Valle de los Ángeles y otro después de la Planta Alseseca Sur en el municipio de San Francisco Totimehuacan. Se detectaron resultados variables en cuanto a la diferencia de poblaciones de entrada y salida, así como un muestreo longitudinal antes y después de pasar por las plantas de tratamiento.

En la planta de tratamiento del río Alseseca se obtuvieron las siguientes poblaciones en cuanto a coliformes fecales 7.78×10^4 UFC de entrada y 2.22×10^4 UFC de salida (Otoño 2005), 2.67×10^5 UFC de entrada y 3.33×10^4 UFC de salida (Invierno 2006), 2.83×10^5 UFC de entrada y 1.11×10^5 UFC de salida (Verano 2006), 7.22×10^4 UFC de entrada y 3.33×10^4 UFC de salida (Otoño 2006) (Fig.18).

En la planta de tratamiento del Parque Ecológico se obtuvieron las siguientes poblaciones en cuanto a coliformes fecales, ND (no detectables) de Entrada y Salida (Invierno 2006), 2.67×10^5 UFC de entrada y 2.36×10^4 UFC de salida (Primavera 2006), 1.89×10^5 UFC de entrada y ND de salida, 5×10^4 UFC de entrada y ND de salida (Otoño 2006), 1.83×10^5 UFC de entrada y ND de salida (Invierno 2006-2007) (Fig.19).

Del muestreo longitudinal del río Alseseca se detectó un incremento del 520% de coliformes en el efluente con respecto al influente (primavera 2007) (Fig.20).

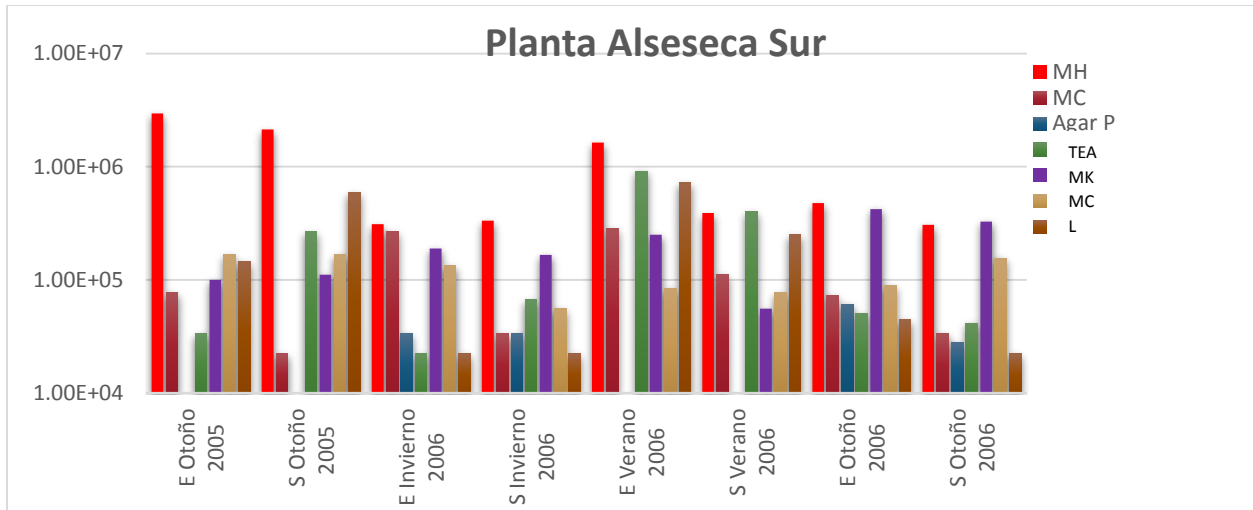


Fig. 18 Conteo de población en la Planta Alseseca Sur.

E= Población de bacterias en agua de entrada
 S=Población de bacterias en agua de salida
 MH= Mueller Hinton
 MC= MacConkey
 Agar P = Agar *Pseudomonas* con Cetrimida
 TE= Agar Mueller Hinton adicionado con Tetraciclina
 AM= Agar Mueller Hinton adicionado con Ampicilina
 KM= Agar Mueller Hinton adicionado con Kanamicina
 CL= Agar Mueller Hinton adicionado con Cloramfenicol

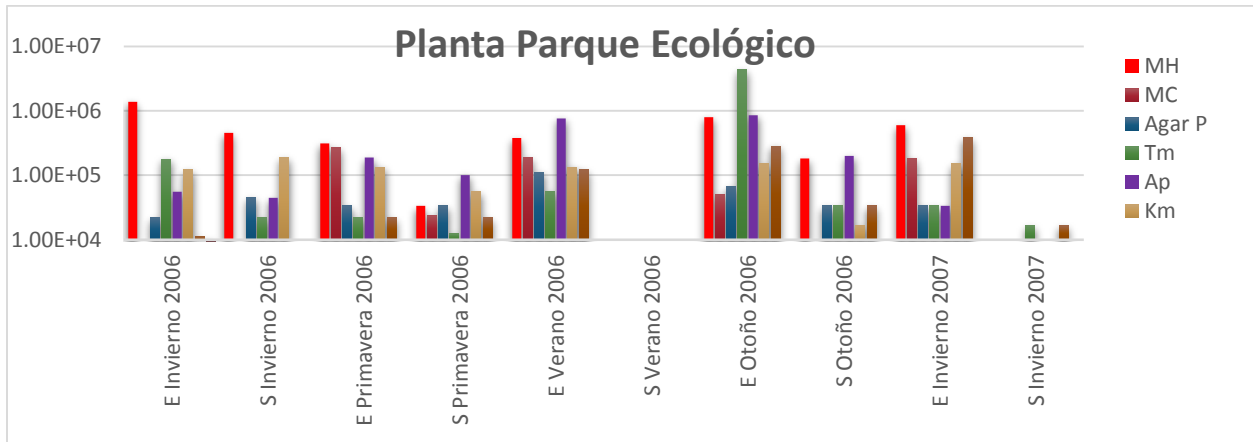


Fig. 19 Conteo de población en la Planta Parque Ecológico.

E= Población de bacterias en agua de entrada
 S=Población de bacterias en agua de salida
 MH= Mueller Hinton
 MC= MacConkey
 Agar P = Agar *Pseudomonas* con Cetrimida
 TE= Agar Mueller Hinton adicionado con Tetraciclina
 AM= Agar Mueller Hinton adicionado con Ampicilina
 KM= Agar Mueller Hinton adicionado con Kanamicina
 CL= Agar Mueller Hinton adicionado con Cloramfenicol

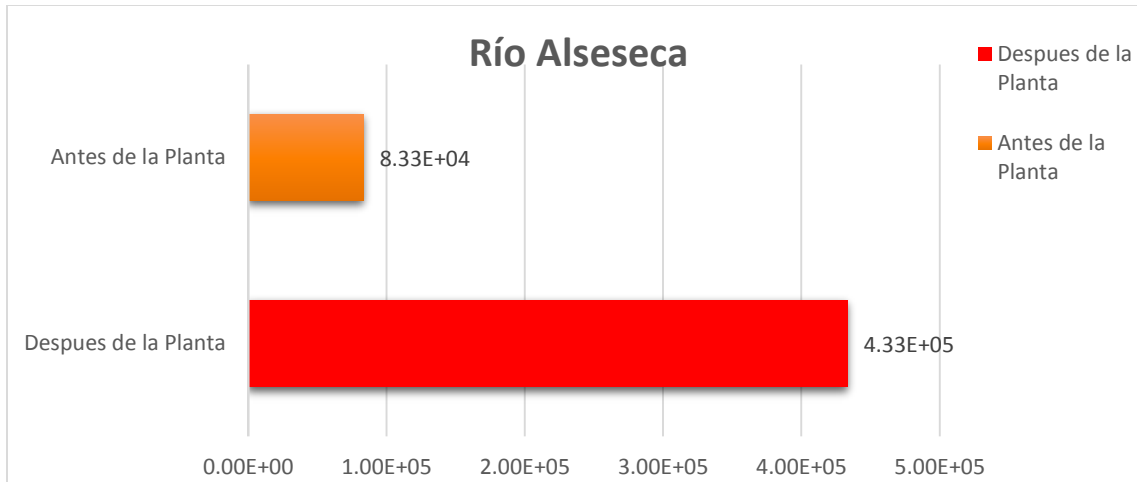


Fig. 20 Conteo de población de coliformes fecales en el muestreo del Río Alseseca.

Antes de efectuar la identificación se realizaron pruebas para comprobar la multiresistencia en las bacterias aisladas, esto mediante la siembra de las mismas en 4 medios con antibióticos diferentes KM, AM, CL y TE., mostrando que las bacterias provenientes de la Planta Alseseca Sur son más resistentes ya que el 70% de las aisladas creció en los medios con los cuatro antibióticos probados (Fig.21) mientras que solo el 31% de las aisladas de la Planta del Parque Ecológico creció en los mismos (Fig.22).

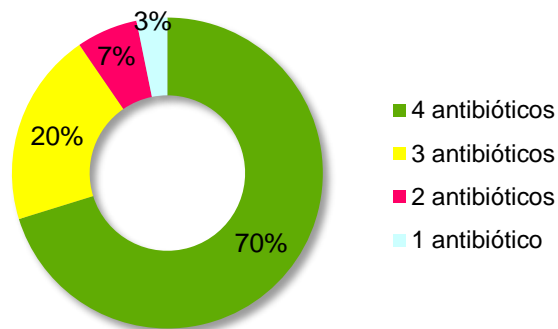


Figura 21. Porcentaje de multiresistencia de bacterias aisladas en la Planta de Alseseca Sur.

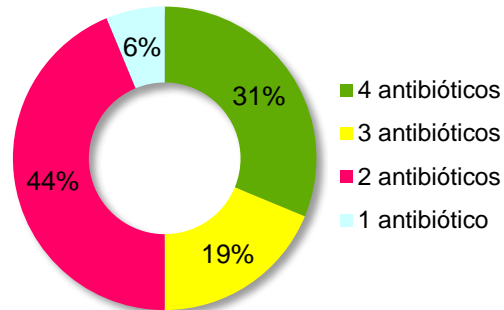


Figura 22. Porcentaje de multiresistencia de bacterias aisladas en la Planta de tratamiento de aguas del Parque Ecológico Revolución Mexicana

6.2 IDENTIFICACIÓN.

En los muestreos realizados en las dos plantas de tratamiento de aguas se aislaron un total de 300 enterobacterias provenientes de ambas plantas de tratamiento, la proporción de *E. coli* encontrada en la Planta Alseseca Sur fue del 52.6 %, en el parque Ecológico del 48% (fig.23) y en el río Alseseca la población fue del 80%, siendo este género bacteriano el de mayor incidencia en los muestreos.

De las cepas aisladas se seleccionaron 66 basándonos en la prueba presuntiva de resistencia a antibióticos, los géneros identificados y con los que se trabajó aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Géneros seleccionados en los diferentes muestreos

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| <i>E. coli</i> | 40 |
| <i>Aeromonas spp</i> | 9 |
| <i>Citrobacter braakii / freundii</i> | 9 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 3 |
| <i>Pantoea sp</i> | 2 |
| <i>Pseudomonas luteola</i> | 1 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 1 |

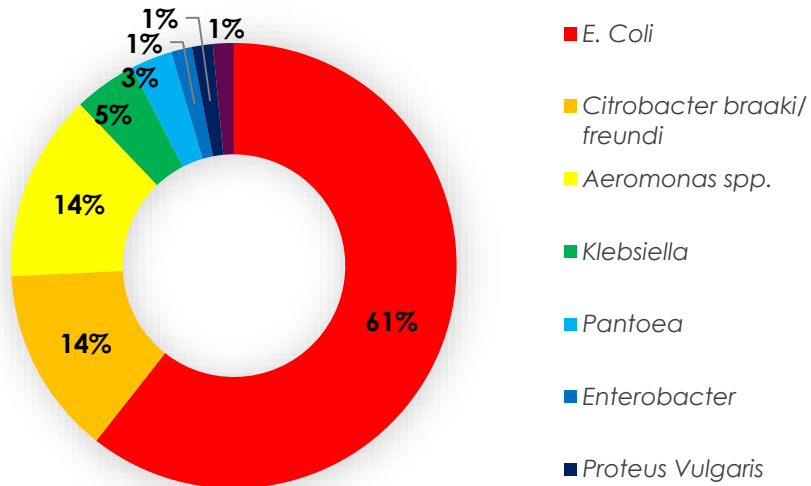


Figura 23. Porcentaje de géneros de bacterias encontrados en influentes y efluentes de Plantas de Tratamiento de aguas de la ciudad de Puebla y del río Alseseca.

De los aislamientos del muestreo longitudinal en el río Alseseca se seleccionaron 13 cepas del género *E. coli*, usando el criterio de selección a las que presentaran mayor resistencia a antibióticos en las pruebas presuntivas de los Multidiscos Bio-Rad para bacterias Gram-negativas

6.3 RESULTADOS DE LA TOLERANCIA A METALES.

Del total de bacterias aisladas el 86% creció en agar Mueller Hinton, a concentraciones de 100 ppm de Cu, Zn, Co, Mn, Ni, o V (Fig.24), el 66% de las cepas resistió y mostró crecimiento en agar Mueller Hinton, a concentraciones de 200 ppm de Cu, Zn, Co, Mn, Ni, o V (Fig.25) y el 84% creció en mezclas de Cu, Zn y Co; Cu, Zn y Ni; Co, Zn y Ni, y por último Mn, Zn y Co (en estos casos a concentraciones de 50 ppm c/u) (Fig.26).

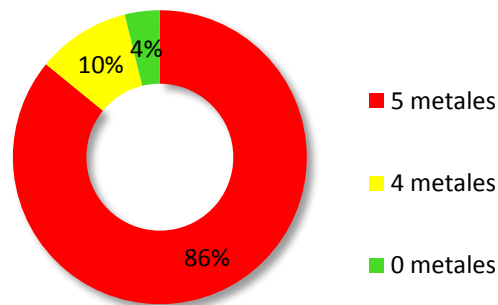


Figura 24. Porcentaje de crecimiento de las cepas aisladas en agar TSA con Zn (100ppm), Cu (100ppm), Mn (100 ppm), Ni (100ppm) y V (100ppm).

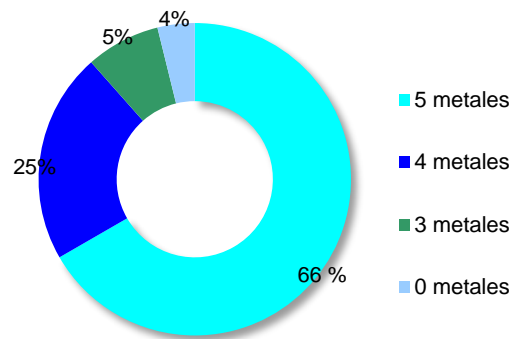


Figura 25. Porcentaje de crecimiento de las cepas aisladas en agar TSA con Zn (200ppm), Cu (200ppm), Mn (200 ppm), Ni (200ppm) y V (200ppm).

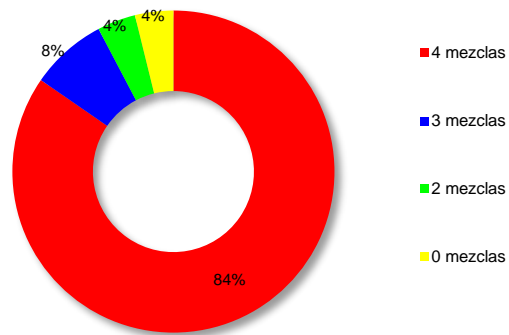


Figura 26. Porcentaje de crecimiento de las cepas aisladas en agar TSA con cuatro mezclas de metales diferentes

6.4 PRUEBAS PRESUNTIVAS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

En total se trabajó con 66 cepas a las que se realizó la prueba presuntiva de resistencia a antibióticos mediante los multidiscos BIO-RAD (Fig.27), en esta prueba se observó que existían similitudes en los antibióticos a los que los diversos géneros de bacterias aisladas resistían y fueron reportados en la Tabla 2.

| Tabla 2. Patrones de resistencia a antibióticos presentados por bacterias aisladas de las plantas de tratamiento de aguas y del río Alseseca | | |
|--|---------------------------|----------------|
| Antibióticos | Género | Porcentaje (%) |
| | <i>E. coli</i> | 45.9 |
| AM, CB, SXT | <i>Aeromonas spp</i> | 44.4 |
| | <i>Citrobacter</i> | 33.3 |
| | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 33.3 |
| | <i>Proteus vulgaris</i> | 100 |
| AM, CB, PEF | <i>E. coli</i> | 21.6 |
| | <i>Aeromonas spp</i> | 11.1 |
| | <i>Aeromonas spp</i> | 88.8 |
| AM, CB, CF | <i>Pantoea sp</i> | 50 |
| | <i>E. coli</i> | 21.6 |
| | <i>Citrobacter</i> | 11.1 |

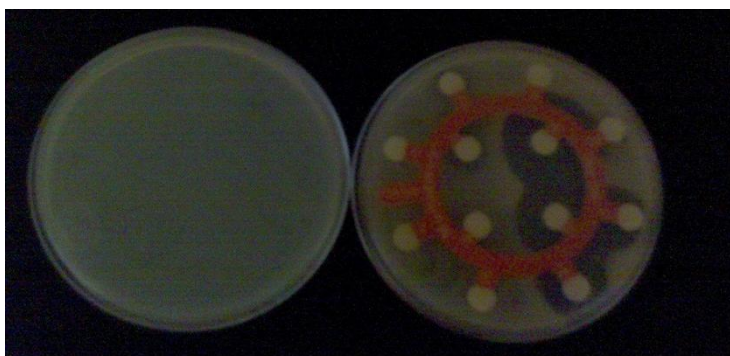


Fig.27 Prueba de resistencia a antibióticos con multidisco BIORAD.

De las pruebas presuntivas las resistencias de las cepas fueron: AM (72%), CB (56%), SXT (40%) y CF (40%).

6.5 COMPARATIVO ENTRE LA RESISTENCIA A METALES Y ANTIBIÓTICOS PRESENTADA POR LAS COLONIAS SELECCIONADAS.

| Tabla.3 Patrones de Resistencia a Metales Pesados y Antibióticos en <i>E. coli</i> aisladas de las Plantas de Tratamiento Alseseca Sur, Parque Ecológico y río Alseseca | | | | | |
|--|--------------------------|---|-----------------------------------|---|--|
| BACTERIA | Origen | Mueller Hinton adicionado con KM, AM, TE, CL | Resistencia a ANTIBIÓTICOS | Crecimiento en METALES Zn, Mn, Cu, Ni, V a 100 y 200 ppm | Crecimiento en las cuatro Mezcla de Metales |
| <i>E. coli</i> | Entrada Parque Ecológico | Creció | AM , CB, PEF, | Creció | Creció |
| <i>E. coli</i> | Entrada Parque Ecológico | Creció | AM, CB, SXT, | Creció | Creció |
| <i>E. coli</i> | Salida Alseseca Sur | Creció | AM, CB, PEF, | Creció | Creció |
| <i>E. coli</i> | Salida Alseseca Sur | Creció | AM, CB ,SXT, | Creció | Creció |
| <i>E. coli</i> | Salida Alseseca Sur | Creció | AM, SXT, PEF, CF | Creció | Creció |
| <i>E. coli</i> | Salida Alseseca Sur | Creció | AM, CB, SXT , CF | Creció | Creció |
| <i>E. coli</i> | río Alseseca Sur | Creció | AM, CB, SXT , CL | Creció | Creció |
| <i>E. coli</i> | río Alseseca Sur | Creció | AM, CB, SXT, PEF , GE, CF,CL, | Creció | Creció |

De las pruebas realizadas a las bacterias seleccionadas podemos observar en la Tabla 3 y en la Tabla 4 que existe una relación entre la resistencia a antibióticos y metales pesados en los aislamientos de las Plantas de tratamiento de aguas y del río Alseseca.

Tabla.4 Patrones de Resistencia a Metales Pesados y Antibióticos en bacterias aisladas de las Plantas de Tratamiento Alseseca Sur, Parque Ecológico y río Alseseca

| BACTERIA | Origen | Mueller Hinton adicionado con KM, AM, TE, CL | Resistencia a ANTIBIÓTICOS | Crecimiento en METALES Zn, Mn, Cu, Ni, V a 100 y 200 ppm | Crecimiento en las cuatro Mezcla de Metales |
|-----------------------------|--------------------------|---|-----------------------------------|---|--|
| <i>E. coli</i> | Entrada Parque Ecológico | Creció | Sensible a todos los antibióticos | No creció | No creció |
| <i>Pseudomonas luteola</i> | Entrada Alseseca Sur | Creció | CF, CRO, AK,SXT,CTX,NET, CB | No creció en Cu | No creció |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Salida Alseseca Sur | Creció | Resistencia Intermedia AM, CF | No creció | No creció |

6.6 DETERMINACIÓN DE PATOTIPOS DE *ESCHERICHIA COLI*.

6.6.1 ETEC

Los métodos utilizados para la tipificación de las cepas de *E. coli* fueron los siguientes, en el caso de *E. coli* enteropatógena ETEC se sabe que la amplificación del gen *IngA*, gen estructural del pilus tipo IV longus expresado en ETEC humana, amplifica en un fragmento de 630 pb (Gutiérrez-Cázares et al 2000) por lo que en este trabajo se tipificaron estas cepas tomando como base la identificación de dicho gen, para lo cual empleamos la técnica de PCR. Del total de *E. coli* aisladas el 10% dio positivo al patotipo ETEC.

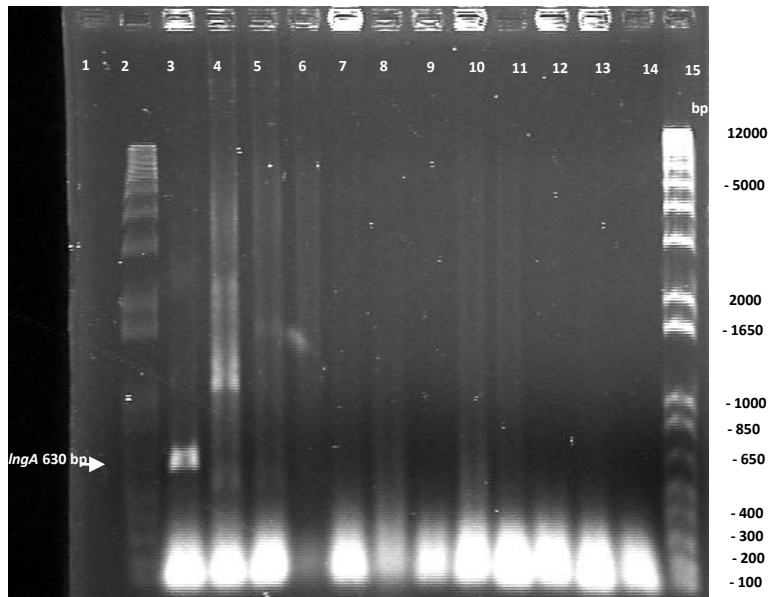


Figura 28. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se amplificó el gen *IngA* a 630 bp. Carril 2 Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA. Carril 3 *E. coli* enterotoxigénica E 9034 Carril 4 Cepa 7-BUAP Línea 5 Cepa 12-BUAP. Carril 6 Cepa 13-BUAP Carril 7 Cepa 14-BUAP Línea 8 Cepa 57-BUAP Carril 9 Cepa 34-BUAP Carril 10 Cepa 35-BUAP Carril 11 Cepa 36-BUAP Carril 12 Cepa 37-BUAP Carril 13 Cepa 39-BUAP Carril 14 Cepa 38-BUAP Carril 15 Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA

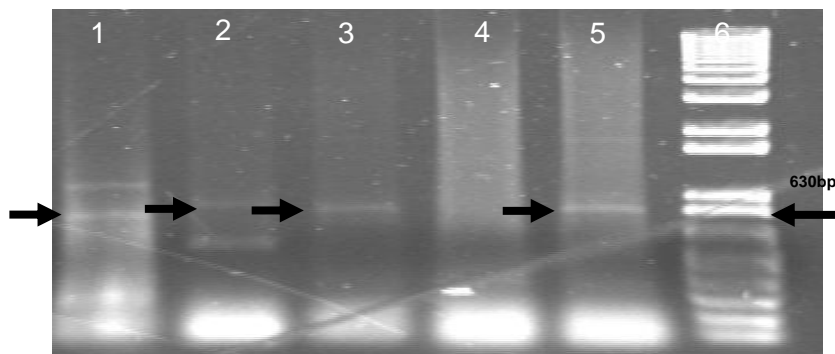


Figura 29. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se amplificó el gen *IngA* a 630 bp. Carril 6 Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Carril 1 *E. coli* enterotoxigénica E-9034 Carriles 2-5 *E. coli* aisladas de Río Alseseca y Plantas de tratamiento de aguas. Carril 5 *E. coli* aislada de agua tratada en la Planta Alseseca Sur.

6.6.2 EPEC

Para la tipificación de *E. coli* EPEC se utilizaron como base las secuencias que codifican para *bfpA* tratándose de EPEC típica (tEPEC) y *escD* para EPEC atípica (aEPEC)

6.6.2.1 tEPEC

Girón *et al*, 1991 descubrieron que EPEC expresa haces de filamentos que asemejan sogas, denominado bundle-forming pilus (BFP). Un método rápido y simple de detección de EPEC se basa en la amplificación de una región de 326 pb del gen *bfpA*. Donnenberg *et al*, 1992

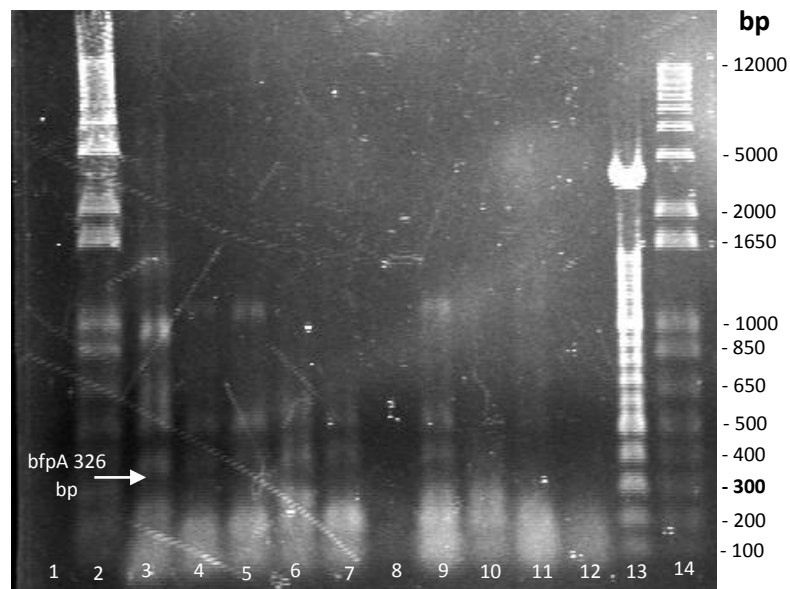


Figura 30. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se amplificó el gen *bfpA* a 326 pb. Carril 2 Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Carril 3 *E. coli* entero patógena E2348-69 Carril 4 Cepa 15a-BUAP Carril 5 Cepa 18-BUAP. Carril 6 Cepa 19-BUAP Carril 7 Cepa 47a-BUAP Carril 8 Cepa 47b-BUAP Carril 9 Cepa 49-BUAP Carril 10 Cepa 49a-BUAP Carril 11 Cepa 38-BUAP Carril 12 Cepa 38-BUAP Carril 13 Marcador de peso molecular Carril 14 Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA

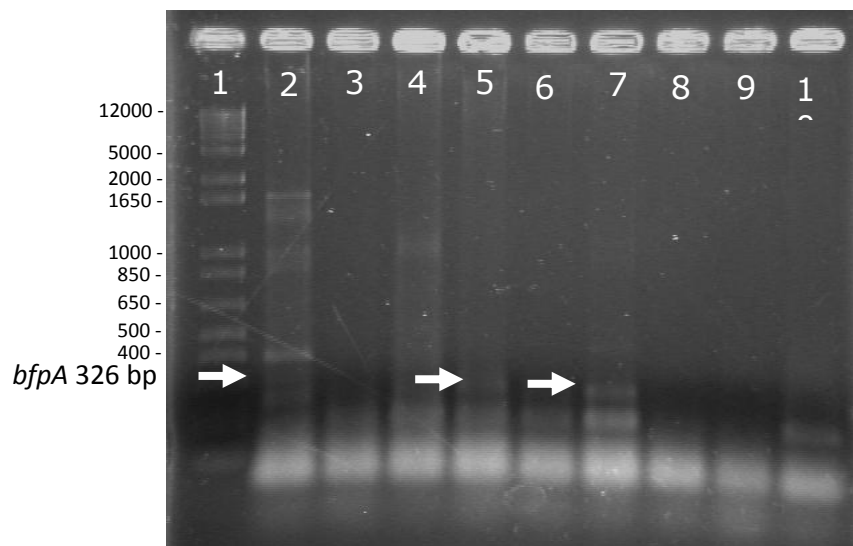


Figura 31. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se amplificó el gen *bfpA* a 326bp. Carril 1 Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Carril 2 *E. coli* entero patógena E2348-69 Carriles 3-10 *E. coli* aisladas de Río Alsesecca y Plantas de tratamiento de aguas. Carril 5 *E. Coli* aislada de agua tratada en la Planta Alsesecca Sur. Carril 7 *E. coli* aislada del río Alsesecca Sur.

6.6.2.2 aEPEC.

Las cepas aEPEC no albergan el pEAF y por lo tanto no producen el BFP.

aEPEC tiene el locus de destrucción del enterocito (LEE), una isla de patogenicidad responsable del desarrollo de la lesión (A E). Esta isla codifica el sistema de secreción de tipo III , un sistema con múltiples proteínas secretadas y una adhesina bacteriana llamada "intimina" que es codificada por el gen *eae*. Elliot *et al*, 2000 reportaron que si el gen *escD* está presente en *E. coli*, *ler* estará y LEE por lo consiguiente, entonces la lesión podrá llevarse a cabo.

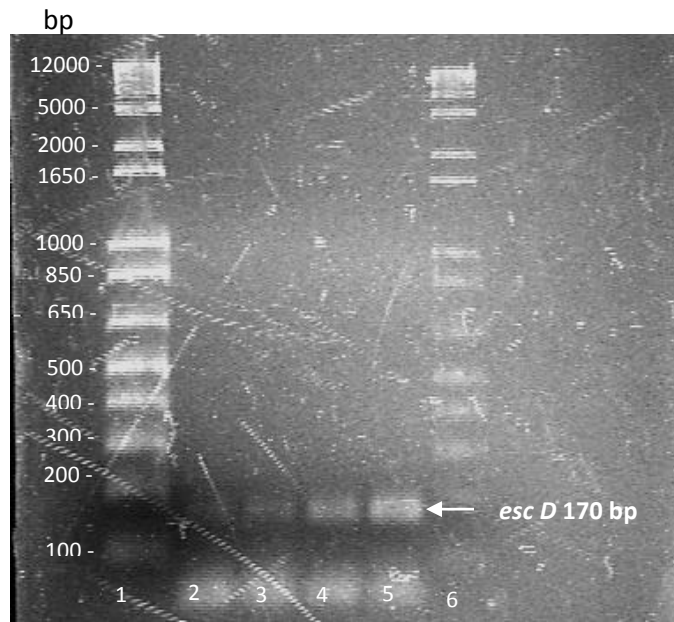


Figura 32. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se amplificó el gen *escD* a 170 bp. Carril 1 Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Carril 2 *E. coli* entero patológica E2348-69 Carril 3 Cepa 47b-BUAP Carriles 4-5 Cepa 38-BUAP. Carril 6 Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA

De los corrimientos el 15% resultó perteneciente al patotipo EPEC.

7 DISCUSIÓN.

7.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.

En trabajos similares a este se han hecho conteos de población de coliformes fecales y se ha encontrado que los niveles de población se encuentran entre 10^7 - 10^9 /100 mL (Keraita B. et al, 2003) llegando a comparar estos niveles de población del agua de río con agua cruda.

En esta investigación estamos en concordancia con otros autores (LeChevallier, 1996) en donde mencionan que la mayor presencia de enterobacterias se encuentra entre los meses de abril a noviembre y la menor población se encuentra entre diciembre y marzo, siendo la especie más abundante *E. coli*.

Otro estudio realizado por LeChevallier (1988) habla de que existen diferentes factores que favorecen el crecimiento de las enterobacterias, entre los cuales figura la temperatura, se menciona que mientras la temperatura del agua rebasa los 15°C el crecimiento bacteriano se lleva de una forma más rápida y eficaz, es por esto que encontramos que en los meses de abril a noviembre la población bacteriana es más alta.

Garcia-Armisen et al (2013) realizó un trabajo con muestras colectadas del río Sena, Francia, recolectaron tres muestras en diferentes puntos del río y las cultivaron en tres medios diferentes uno en caldo Luria (LB) un medio con muchos nutrientes, el otro R2A es un agar pobre en nutrientes y por último DNB que es el caldo nutritivo diluido unas 100 veces, a cada medio le adicionaron tres antibióticos diferentes a dos concentraciones diferentes, amoxicilina (AMX) (4 and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$), Tetraciclina (TET) (4 and 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y sulfametoxazol (SMX) (16 to 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$), al realizar el conteo de las bacterias crecidas obtuvieron resultados significativamente más altos en el medio DNB con respecto al LB o al R2A. En este trabajo ocupamos Agar Mueller Hinton con 4 diferentes antibióticos y tuvimos resultados de una población significativamente alta Oscilando los valores entre 10^4 y 10^5 . Quedaría como trabajo posterior el realizar los

muestreos y conteos en un medio más pobre en nutrientes para ver si existe diferencia notable entre el conteo de población resistente a los antibióticos.

Es importante hacer notar que se ha demostrado que los antibióticos y los antimicrobianos en general, resisten las condiciones presentes en los lodos activados de las plantas de tratamiento de aguas residuales, Gobel *et al* (2005) demostraron la eliminación incompleta ocurrida en estos ambientes, ya que detectan en el efluente entre 240-290 ng/L de macrólidos y sulfonamidas, respectivamente.

Lin *et al* (2004) en un estudio hecho en un río de la provincia de Natal en Sudáfrica encontraron que los géneros predominantes de las bacterias provenientes de ríos fueron *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*., y con menor frecuencia *Klebsiella* y *Proteus*.

En India se realizó un estudio a lo largo del río Godavari, en donde el análisis bacteriológico de las muestras recolectadas en diferentes puntos del río revelaron altas poblaciones de *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Aerogens*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Chitanand *et al* 2008), concordando con este estudio en el cual encontramos en orden de mayor incidencia se han identificado a: *E. coli* > *Citrobacter* > *Aeromonas* > *Klebsiella* = *Enterobacter*.

7.2 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y METALES PESADOS.

Manaia *et al* (2012) nos habla que la utilización de antibióticos para el control de las enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales ha sido uno de los avances más significativos en el cuidado de la salud, sin embargo el uso generalizado de antibióticos ha venido acompañado por un incremento de resistencia a los mismos en comunidades bacterianas. Esta evidencia ha motivado muchos estudios de la diversidad y distribución de bacterias resistentes a los antibióticos no solo en la clínica sino en diferentes sectores ambientales.

Este estudio nos muestra la elevada incidencia de enterobacterias resistentes a antibióticos y metales pesados en las aguas residuales de Puebla.

Las bacterias resistentes a antibióticos y sus genes específicos determinados se han encontrado con un incremento evidente en la prevalencia de la Resistencia a sustancias antimicrobianas. Esta dramática situación de multiresistencia bacteriana ha sido reportada en ambientes hospitalarios sin embargo en el ambiente también ha sido encontrada, en este trabajo dentro de las cepas aisladas, caracterizadas e identificadas se encontró una cepa asignada con el nombre de 38BUAP, se identificó como *E. coli enteropatogénica atípica*, por métodos moleculares se determinó que presentaba resistencia a cefotaxima por medio de una β -lactamasa TEM-C, una OXA-1 y presenta mutaciones en *gyrA* y en *parC* lo que explica su resistencia a las fluoroquinolonas y al ácido nalidixico y también posee una Transacetilasa *aac(6')1b-Cr* que le confiere resistencia a algunos antibióticos aminoglucósidos. En cuanto a las β -lactamasas encontradas en la cepa 38BUAP concuerda con autores como Tennstedt et al (2003) quien reporta asilamiento, en aguas residuales, del plásmido pTB11 en donde se encuentra el gen *bla_{OXA-1}* que confiere inactivación a β -lactámidos y penicilinas.

En la revisión hecha por Zhang X. et al (2009) se menciona que ciertos genes de resistencia a antibióticos han sido encontrados en microorganismos tales como *E. coli*, y *Aeromonas* entre otros, no tan solo distribuidos en las aguas de desecho de hospitales, sino que también se han encontrado este tipo de organismos provenientes de lodo residual y agua residual de plantas de tratamiento de agua, en aguas subterráneas y ríos, e incluso en agua potable.

Los resultados que obtuvimos en cuanto a la resistencia a antibióticos en los aislamientos concuerdan con reportes hechos por diversos autores, en los que se menciona el alto índice de resistencia de las bacterias aisladas provenientes de ríos cercanos a centros de población y a plantas de tratamiento de aguas (Lin et al. 2005, Roe et al. 2003, Sturtevant et al. 1971)

Gobernado (2005) en su revisión sobre β -lactamasas de espectro extendido en aumento, hace referencia a que éstas están siendo en los últimos tiempos una preocupación especial en España y que en la actualidad constituyen un problema terapéutico y epidemiológico, en el caso de las infecciones causadas por *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y, en algún caso, por *Klebsiella oxytoca* y *Proteus mirabilis*, ya

que las bacterias productoras de este tipo de β -lactamasas son resistentes a la penicilina, la ampicilina, las cefamicinas, las cefalosporinas de cualquier generación y el aztreonam, y un 30% a 60% de ellas también a los betalactámicos asociados a inhibidores de β -lactamasas; además, un porcentaje alto, por corresponsencia, son también resistentes a las quinolonas, los aminoglucósidos, las tetraciclinas y el cotrimoxazol. De manera que estamos ante bacterias multirresistentes, muchas sólo sensibles a los carbapenémicos, que no son hidrolizados por las BLEE, fácilmente transmisibles por plásmidos, y difíciles de tratar y controlar.

Lin *et al* (2004) en un estudio hecho en un río de la provincia de Natal en Sudáfrica muestran que la resistencia a los antibióticos beta-lactámicos es la que predomina en ese ambiente. Mientras que algunas cepas bacterianas adquieren estas características de resistencia de otras bacterias, muchas, tal es el caso de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp.* desarrollan mutaciones cromosómicas en el sitio blanco del compuesto antibacteriano (Sader *et al.* 2005). Otros autores concuerdan que al surgir bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos se hace necesario buscar nuevos agentes antimicrobianos con diferentes mecanismos de acción (Änkö *et al.* 2002).

De las pruebas presuntivas las resistencias a antibióticos de las cepas fueron: ampicilina (72%), carbenicilina (56%), trimetoprim-sulfametoxazol (40%) y cefalotina (40%), concordando con un estudio hecho por Moore *et al* (2009) donde se analizaron 11 ríos y un lago de Irlanda del Norte, y se encontró que usando un ensayo directo de susceptibilidad antibiótica, la resistencia específica medida en porcentaje en todas las muestras examinadas en orden ascendente de los siguientes 19 agentes probados fue: amikacina (17%), gentamicina (17%), ciprofloxacina (33%), colistina (42%), linezolid (42%), tobramicina (42%), vancomicina (42%), ertapenem (67%), eritromicina (75%), meropenem (75%), rifampicina (75%), teicoplanina (75%), tetraciclina (75%), trimetoprim(75%), ácido fusídico (83%), aztreonam (92%), clindamicina (92%), penicilina (92%) y ceftioxitina (100%).

Pierre Servais *et al* (2009) estudió la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos y la resistencia antimicrobiana múltiple entre coliformes fecales que se

encuentran en la cuenca del río Sena, Francia. Entre los microorganismos estudiados encontró que el 42% de los 214 aislamientos de *E. Coli* eran resistente a al menos uno antimicrobiano y el 35% eran resistentes al menos a dos antimicrobianos, concordando con nuestros resultados en los que encontramos que las cepas de *E. coli* fueron en un entre un 45% y 22% multiresistentes en las pruebas presuntivas de antibióticos. Investigó también las fuentes de donde provenían dichos aislados, fueron recolectados en fuentes puntuales (aguas residuales municipales y hospitalarios) y fuentes no puntuales (superficie de escurrimiento y lixiviación de suelos aguas de zonas agrícolas o forestales). Para *E. coli*, la prevalencia de resistencia a antibióticos difiere ampliamente de una fuente a otra y clasificado en este orden: las aguas residuales hospitalarias (71%)> municipal aguas residuales (44%)> fuentes agrícolas no puntuales (16%)> fuentes no puntuales forestales (2%). El nivel de resistencia a antibióticos en los coliformes fecales está relacionado con su nivel de exposición prevista a los antimicrobianos antes de su liberación en el medio ambiente.

El río San Pedro en Aguascalientes, México fue motivo de un estudio en el cual Ramírez Castillo *et al* (2013) concluyen que la presencia de *E. coli* patógeno y resistente a los antibióticos y a flouroquinolonas podrían representar una amenaza potencial para la salud humana y animal, concordando con este estudio. Se sabe que las bacterias al estar en contacto con los antibióticos y otros agentes inhibitorios, generan progenies resistentes a estas sustancias (Salyers *et al.* 2004).

McArthur y Tuckfield (2000) y Mondragón *et al* (2011) demuestran e implican con sus resultados que la contaminación con metales pesados puede contribuir a incrementar la resistencia bacteriana a los antibióticos a través de una selección indirecta y en el artículo publicado por Lucious *et al* (2013) estudiaron efluentes provenientes de la industria curtidora en la India en donde reportan que *P. aeruginosa* y *E. coli* aisladas de estos efluentes muestran alta resistencia al cadmio, y al probar la resistencia a antibióticos *P. aeruginosa* mostró una resistencia al 50% de los antibióticos probados mientras que los aislamientos de *E. coli* mostraron un 83% de resistencia a los antibióticos.

Malik et al (2011) aisló un total de 144 *Pseudomonas spp* provenientes del río Yamuna, de suelo de riego con estas aguas y de aguas subterráneas. Fueron probadas para los siguientes metales Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} y Cr^{6+} . La mayoría de las *Pseudomonas* aisladas de agua y de suelo presentó resistencia a múltiples metales y antibióticos, coincidiendo con lo observado en este trabajo.

7.3 *E. COLI* COMO BIOINDICADOR DE CONTAMINACIÓN

Wiggins et al (1999) estudió *Streptococcus faecalis* provenientes de distintas fuentes (aguas residuales domésticas, residuos sépticos, heces de ganado y aves de corral y aguas cristalinas) y al estudiar los patrones de resistencia a antibióticos de éstos concluye que pueden ser utilizados para clasificar e identificar la fuente de contaminación fecal del agua.

Harwood et al (2000) propone que los patrones de resistencia a antibióticos de *E. coli* y *Streptococcus faecalis* pueden ser utilizados como una huella digital para determinar la fuente de contaminación del agua.

Wicki et al (2011) menciona que localizar los sitios de entrada de heces es importante para la gestión de la calidad del agua y propone el aislamiento de bacterias multirresistentes utilizando placas de agar selectivas, y una fase de tipificación donde los aislamientos seleccionados de *E. coli* sean caracterizados por sus perfiles de resistencia a antibióticos y las técnicas moleculares de huellas digitales (gel de campo pulsado electroforesis [PFGE]). En sus resultados ellos concluyen que cuando las cepas tienen un patrón de resistencia igual se puede localizar el sitio de contaminación fecal. Las ventajas del enfoque que ellos describen es que en los métodos de genotipado que se utilizan actualmente para identificar fuentes de contaminantes fecales son la reducción de tiempo, costos, y el esfuerzo requerido de igual manera da la pauta para que los aislamientos idénticos podrían ser identificados sin la construcción de grandes bibliotecas.

El artículo de revisión Marcadores de seguimiento de fuentes microbianas para la detección de contaminación fecal en aguas ambientales: relaciones entre patógenos y su impacto en la salud (Harwood *et al* 2014) menciona que *E. coli* se ha usado como bacteria indicador de contaminación fecal, no ha logrado utilizarse para la determinación de fuentes de contaminación específica porque aún no se han encontrado marcadores específicos del huésped a los que se le pueda asociar. Sin embargo en un estudio se encontró evidencia de marcadores potencialmente específicos de humanos en una cepa de *E. coli* (Clermont *et al*, 2008) que no fue aislada de ningún otro hospedero dentro del estudio. Se sigue estudiando el genoma completo de *E. coli* donde se pretende identificar genes específicos de cepas de origen ambiental o entérico para determinar la especificidad del hospedador de estos marcadores.

Paruch *et al* (2012) mencionan que el hallazgo de *E. coli* en el medio ambiente no se traduce necesariamente en la amenaza de una enfermedad; sin embargo, su presencia indica definitivamente la contaminación con materia fecal, y reconocen que esta bacteria es el único miembro del grupo de los coliformes fecales que satisface la mayoría de los criterios de un indicador bacteriano de contaminación fecal. Por esta razón se ha sugerido como un indicador concreto en el modelo para la selección de indicadores ecológicos del índice de la salud de los ecosistemas costeros en China (Lin *et al.*, 2012) y se propone en este estudio como bioindicador de contaminación en aguas de los ríos del municipio de Puebla.

En este estudio encontramos similitudes en cuanto a la resistencia a antibióticos, así como los hallazgos de *E. coli* son superiores a los de cualquier otro género de bacterias, por lo que basándonos en los trabajos arriba expuestos concluimos en que *E. coli* puede ser utilizados como un bioindicador de contaminación en las aguas de los ríos de la ciudad de Puebla.

8 CONCLUSIONES.

Se determinó que existen bacterias resistentes a antibióticos y metales pesados en el agua del río Alseseca y en los influentes y efluentes de las aguas de las plantas de tratamiento de aguas estudiadas, concluyendo que el tratamiento que se le da en las mismas es ineficiente si no cuentan con un tratamiento secundario.

Los patrones de resistencia a antibióticos y metales pesados en las bacterias aisladas tuvieron similitudes, por lo que podemos inferir que la contaminación del agua con metales pesados contribuye a incrementar la resistencia bacteriana a los antibióticos.

Concluimos que la resistencia a antibióticos y metales pesados presente en *E. Coli* puede ser utilizado como un bioindicador de contaminación en las aguas del río Alseseca tomando en cuenta que la resistencia a antibióticos y metales pesados fue determinada en los aislados de este género.

El río Alseseca está altamente contaminado, los patrones de resistencia a antibióticos y metales pesados fueron significativos en los aislamientos de este muestreo, encontrando bacterias con multiresistencia a antibióticos como el caso de la cepa 38BUAP que presentó resistencia a cefotaxima, fluoroquinolonas, ácido nalidixico y algunos aminoglucosidos, encontrándose en una población de 10^4 UFC/100mL siendo perteneciente al patotipo aEPEC representando un riesgo para la población infantil de la zona cercana al río.

Otro hallazgo importante es que de los aislamientos de *E. Coli* el 10% dio positivo al patotipo ETEC y el 15% resulto perteneciente al patotipo EPEC, constituyendo un foco de infección para la población que tiene contacto con estas aguas, siendo no aptas para riego.

9 SUGERENCIAS.

Como trabajo posterior se sugiere hacer un estudio con medios de cultivo menos enriquecidos, ya que en reportes bibliográficos se menciona que cuando el medio no tiene tantos nutrientes, como en el caso del agar Mueller Hinton que fue el ocupado en este estudio, el número de colonias aisladas es mayor.

Para detectar de donde proviene la contaminación fecal del río Alseseca se sugiere estudiar los patrones de resistencia de *E. Coli* que se aíslen del sitio para determinar si la contaminación es de desechos humanos o de animales y detener esta contaminación.

Equipar las plantas de tratamiento de aguas de la ciudad de Puebla con tratamientos secundarios en donde se baje la carga de materia orgánica y así evitar la proliferación de bacterias patógenas y que estas sean liberadas al agua del río Alseseca, deteniendo así un problema de salud ambiental.

Para ver el impacto en la salud convendría realizar un estudio de campo en la zona de riego de Tecamachalco en donde es utilizada el agua del río Alseseca y así comprobar si esta clase de bacterias se encuentran en los suelos de estos cultivos.

10 BIBLIOGRAFÍA.

Änkö ML, Kurittu J, Karp M. 2002. An *Escherichia coli* biosensor strain for amplified and high throughput detection of antimicrobial agents. *J. Biomol. Screen.* 7:119–125

Arcos Pulido M. Ávila de Navia S., Estupiñán Torres SM., Gómez Prieto A.C. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA VOL.3 No. 4:* Pp 69-79.

Ashbolt N.J. 2003. Methods to identify and enumerate frank and opportunistic bacterial pathogens in water and biofilms. In: World Health Organization (WHO). *Heterotrophic plate counts and drinking water safety.* Ed. J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker, A. Glasmacher. IWA Pub. London. Pp: 146-176.

Barba J., Bustamante V. H., Flores-Valdez M.A., Deng W., Finlay B. Puente J.L. 2005. A Positive Regulatory Loop Controls Expression of the Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* 187(23):7918–7930.

Borbolla-Sala Manuel E., María del Rosario Vidal-Pérez, Olga E. Piña-Gutiérrez, María Falconi de la Fuente. 2004. Bacterias y virus más frecuentemente asociadas a diarreas infecciosas agudas en el estado de Tabasco. *SALUD EN TABASCO Vol. 10, No.3.* pp 71-74

Campos C. 1999. Indicadores de contaminación fecal en la reutilización de aguas residuales para riego agrícola. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. 250 p.

Castillo Escalante Ignacio. 2001. Zonas en riesgo sanitario– ambiental por la presencia de arsénico y fluoruros en aguas subterráneas. *Contaminación del agua y Efectos en la Salud/ La Salud del Niño y el Ambiente.* Primer taller Nacional. México

Chitanand M. P., Kadam T. A., Gyananath G., Totewad N. D., Balhal D. K. 2008. Multiple antibiotic resistance indexing of coliforms to identify high risk contamination sites in aquatic environment. *Indian J Microbiol* 50:216–220.

Clancey J., Rochelle P., 2006. The evolution of Microbiology in the Drinking Water Industry. American Water Works Association.3(98). 163.191.

Clermont O, Lescat M, O'Brien CL, Gordon DM, Tenailon O & Denamur E. 2008. Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. Environ Microbiol 10: 1000–1006.

Cortés-Ortiz IA, Rodríguez-Ángeles G, Moreno-Escobar EA, Tenorio-Lara JM, Torres-Mazadiego BP, Montiel-Vázquez E. 2002. Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México Salud Publica Mex; 44: 297-302.

Croxen M.A., Law R., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M., Finlay B. 2013 Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 26(4):822-880.

CONAGUA. 2008. Estadísticas del agua en México , edición 2011, capítulo 8 Agua en el mundo. pp 115-126

Croxen M., Law R., Scholz R. Keeney K., Wlodarska M., Finlay B. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 2013;26:822-880.

Donnenberg M.S., Girón J.A., Nataro J.P., Kaper J.B. 1992. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. Molecular Microbiology. 6:22. Pp 3427-3437

Downs T.J., Cifuentes-García E. y Suffet I.M. 1999. Risk screening for exposure to groundwater pollution in a wastewater irrigation district of the Mexico City region. Environ Health Perspect. 107(7): 553–561.

Dunnette, D.A. 1992. Assessing global river water quality: overview and data collection. In: Dunnette DA, O'Brien RJ (eds) The science of global change, the impact of human activities on the environment. America Chemical Society Symposium Series 483:240–259.

Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J. y Allen M.J. 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. Journal of Applied Microbiology, 88, 1068-1168

Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Girón, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutxheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper. 2000. The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE and non-LEE-encoded Virulence Factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Immun.* 68:6115-6126.

Eslava Campos Carlos A. 2001. Enterobacterias causantes de enfermedad intestinal en niños. Contaminación del agua y Efectos en la Salud/ La Salud del Niño y el Ambiente. Primer taller Nacional. México

Eslava C, Villaseca JM, Cravioto A. 1993. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono-Cerezo S, Escobar-Gutiérrez A, Valdespino Gómez JL, ed. México, D.F., Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 251-265

Fernández A, Molina M, Alvarez A, Alcántara M, Espigares A. 2001. Transmisión fecohídrica y virus de la hepatitis A. *Higiene y Sanidad Ambiental.* 1: 8-24.

Frers Cristian. 2008. Problemas de contaminación en el agua. <http://www.ecoportat.net>.

Garcia-Armisen T., Anzil, A., Cornelis, P., Chevreuil, M., Servais, P. 2013. Identification of antimicrobial resistant bacteria in rivers: insights into the cultivation bias, *Water Research*, doi: 10.1016/j.watres.2013.05.036.

Girón, J.A., Ho, A.S., and Schoolnik, G.K. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254: 710-713.

Girón J.A., Levine M. M, Kaper J. 1994. Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 12: 71–82.

Guth B., Pichet C., Gomes T. 2010. *Escherichia coli* situation in Brazil. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Chapter 11. Pp 162-178

Gobel A., A. Thorsen, C.S. McArdell, A. Josa & W. Giger. 2005. Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 3981-3989.

Gobernado M. 2005. Betalactamasas de espectro extendido en aumento. *Rev Esp Quimioterap* 2005; 18: 115-118.

Gold-Bouchot G., Zavala-Coral M., Zapata-Pérez O. y Ceja-Moreno V. 1997. Hydrocarbon concentration in oysters (*Crassostrea virginica*) and recent sediments from three coastal lagoons in Tabasco, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 430-437.

Gutiérrez-Cázares Z., Firdausi Q., Albert M.J., Girón J.A. 2000. Identification of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Harboring Longus Type IV Pilus Gene by DNA Amplification. *J. Clin. Microbiol.* May 2000 **vol. 38 no. 5** 1767-1771.

Harwood V., Levine A, Scott T, Chivukula V, Lukasik J, Farrah S, Rose J. 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol.* 71:316-70.

Harwood V., Staley C., Badgley B., Borges K., Korajkic A. 2014 Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes *FEMS Microbiol Rev* 38 : 1–40

Harwood V., Whitlock J., Withington V. 2000. Classification of Antibiotic Resistance Patterns of Indicator Bacteria by Discriminant Analysis: Use in Predicting the Source of Fecal Contamination in Subtropical Waters. *Appl. Environ Microbiol*; 66: 3698-3704.

Hene L.J., Schneider D.W. y Martínez L.M. 2002. Rapid assessment of organic pollution in a west central Mexican river using a family level biotic index. *J. Environ. Planning Manag.* 45, 613-632.

Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123-140

Kapil A. 2005. The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate. *Indian J Med Res* 121, 83–91

Keraita, B.; Drechsel, P.; Amoah, P. 2003. Influence of urban wastewater on stream water quality and agriculture in and around Kumasi, Ghana. *Environment & Urbanization* 15 (2) 171-178.

Kûmmerer K. 2004. Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemoth.* 54, 311–320.

Lacher D.W., Steinsland H., Blank T.E. Donnenberg M.S., Whittam T.S. 2007. Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J. Bacteriol.* 189:342-350.

LeChevalier M., C. Cawthon, R. Lee. 1988. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 649-654.

LeChevallier, M., N. Welch, D. Smith. 1996. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2201-2211.

Lin J. & PT Biyela. 2005. Convergent acquisition of antibiotic resistance determinants amongst the *Enterobacteriaceae* isolates of the Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA). *Water SA* **31**:257-260.

Lin J., P.T. Biyela & T. Puckree. 2004. Antibiotic resistance profiles of environmental isolates from Mhlathuze River, Kwa Zulu-Natal (RSA). *Water SA.* **30**; 23-28.

Lin J., Lin T. Cui S. 2012. Quantitative selection model of ecological indicators and its solving method. *Ecol. Indic.* 13. 294-302.

Lomborg B. 2001. *The Skeptical Environmentalist. Measuring the real state of de world.*

Lucious S., Sathyapal E., Anuradha V., Vijaya P., Syed Ali M., Yogananth V, Rajan R. y Kalitha Parveen P. 2013. Heavy Metal Tolerance and Antibiotic Sensitivity of Bacterial Strains Isolated From Tannery Effluent. *ASIAN J. EXP. BIOL. SCI.* VOL 4 (4). Pp. 597-606.

McDaniel T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. 1995 A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1664–1668.

Manaia C.M., Vaz-Moreira I., Nunez C. O. 2012. Antibiotic resistance in waste water and surface water and human health implications. In Barceló, Damiá (ed.) - *The Handbook of Environmental Chemistry*. Vol. 20: Emerging organic contaminants and human health. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. E-ISBN 978-3-642-28132-7. p. 173-212

Mancilla-Villa O. R., Ortega- Escobar H.M., Ramírez Ayala C., Uscanga -Mortera E., Ramos-Bello R., Reyes-Ortigosa A.L. 2012. Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambient* [online]. 2012, vol.28, n.1, pp. 39-48.

Malik A., Alem A. 2011. Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ Monit Assess.* 178 : 293–308

McArthur J.V. & R.C. Tuckfield. 2000. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3722-3726

Miller J.R. & Orhoc M.S. 2007. *Contaminated Rivers: A Geomorphological-Geochemical Approach to Site Assessment and Remediation*. Chapter 1. Pp 1-11.

Mondragón V., Llamas-Pérez D, González-Guzmán G, Márquez-González A, Padilla-Noriega R, Durán-Avelar M, Franco B. 2011. Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environ Monit Assess.* 183:329–340

Moore J., Heaney N, Millar B, Crowe M, Elborn J. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Commun. Dis. Public. Health.* 2002; 5:23-26.

Moore J.E., Rao J.R., Moore Peter J., Millar B. C. Goldsmith C. E., Loughrey A., Rooney P.J. 2009. Determination of total antibiotic resistance in waterborne bacteria in

rivers and streams in Northern Ireland: Can antibiotic-resistant bacteria be an indicator of ecological change? *Aquat Ecol.* 44:349–358

Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142-201.

Nishimura L., Girón J.A., Nunes S., Guth B. 2002. Prevalence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Harboring the Longus Pilus Gene in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 40(7): 2606-2608

Ochoa T.J., Barletta F., Contreras C., Mercado F. 2008. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.* 102:852-856.

Paruch A., Maehlum T. 2012. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecological Indicators* 23: 140-142.

Prüss-Üstün A., Covarlan C. 2006. Ambientes saludables y prevención de enfermedades : hacia una estimación de la carga de morbilidad atribuible al medio ambiente: resumen de orientación. Pp 10

Qadri F, Girón J., Helander A., Begum Y., Asaduzzaman M., Xicohténcatl-Cortes J., Negrete E, Albert J. M. 2000. Human Antibody Response to Longus Type IV Pilus and Study of Its Prevalence among Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Bangladesh by Using Monoclonal Antibodies. *J Infect Dis.* 181 (6): 2071-2074.

Qadri F., Svennerholm A., Faruque A.S.G., Sack R. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(3):465-483

Ramírez Castillo F., Avelar González F., Garneau P., Márquez Díaz F., Guerrero Barrera A., Harel J. 2013. Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico *Frontiers in Microbiology* Vol.4 Art.147 pp.1-16

- Rodríguez-Angeles G.** 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mex.* 44:464-475
- Roe M.T.,** E. Vega, and S.D. Pillai. 2003. Antimicrobial resistance markers of Class 1 and Class 2 integron bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg. Infect. Dis.* 9,822-826.
- Sader HS,** M. Castanheira, RE Mendes, M. Toleran, TR Walsh & RN Jones. 2005. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Internatl. J. Antimicrob. Agents.* **25**: 57-61.
- Salyers A.A.,** A. Gupta & Y. Wang. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* **12** (9): 412-416.
- Sharroks A.D.**1994. the designs of primers for PCR. In: PCR Technology, currents Innovation Londres: Griffin, H.G. and Griffin, A.M. Ed. CRC Press.p 5-1
- Servais P.,** J. Passerat. 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France) *Science of the Total Environment* 408: 365–372
- Sincero A.P.,** Sincero G.A. 1999. Physical- Chemical treatment of water and wastewater. CRC press LLC Boca Raton, Florida. Pp 114-129.
- Soto-Galera E.,** Paulo-Maya J., López-López E., Serna-Hernández J.A., Lyons J. 1994.Change in Fish Fauna as Indication of Aquatic Ecosystem Condition in Río Grande de Morelia–Lago de Cuitzeo Basin, Mexico. *Environmental Management.*1994.24.pp.133-140
- Soller, J.A.,** Schoen, M. E., Bartrand, T., Ravenscroft, J.E., and Ashbolt, N. J. 2010 Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non- human sources of faecal contamination. *Water Research* 30: 1-18.
- Sturtevant AB,** GH Cassell & TW Feary. 1971. Incidence of infectious drug resistance among fecal coliform isolated from raw sewage. *Appl. Microbiol.* **21**(3): 487-491
- Tennstedt T,** Szczepanowski R, Braun S, Pühler A, Schlüter A. 2003. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 45:239–252

Trabulsi L.R., Keller R., Tardelli Gomes T.A. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8:508-513.

UNESCO, 2010. El agua en un mundo en cambio. Tercer Informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo. SC-2010/WWAP/03/ES. Pp 1-8

U.S.EPA .1997. The incidence and severity of sediment contamination in surface waters of the United States, vol 1, The national sediment quality survey. EPA-823-R-97-006.

U.S.EPA .1999. 25 years of the safe drinking water. Act: History and Trends.

U.S.EPA .2000. The History of drinking water treatment.

Wicki M., Karabulut F., Auckenthaler A., Felleisen R., Tanner M., y Baumgartner A. 2011. Identification of Fecal Input Sites in Spring Water by Selection and Genotyping of Multiresistant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011.77. p. 8427–8433

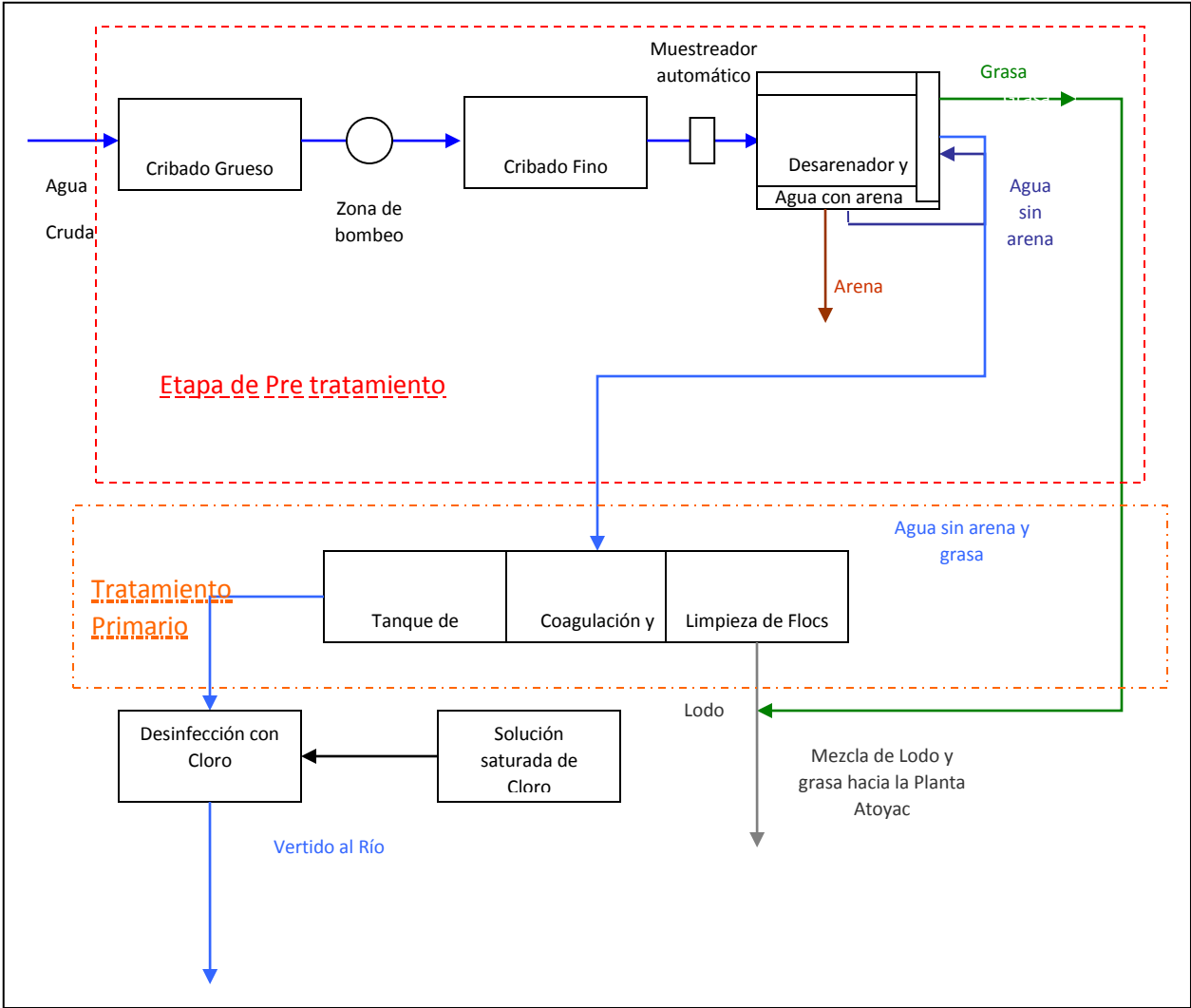
Wiggins B. A., Andrews R. W., Conway R. A., Corr C. L., Dobratz E. J., Dougherty D. P., Eppard J. R, Knupp S. R, Limjoco M. C., Mettenburg J. M., Rinehardt J. M., Sonsino J., Torrijos R. L., y Zimmerman M. E. 1999. Use of Antibiotic Resistance Analysis To Identify Nonpoint Sources of Fecal Pollution. *Appl. Environ Microbiol.* 1999. 65: 3483-3486.

World Health Organization. 2012. World health statistics 2012. WHO Press, Geneva, Switzerland.

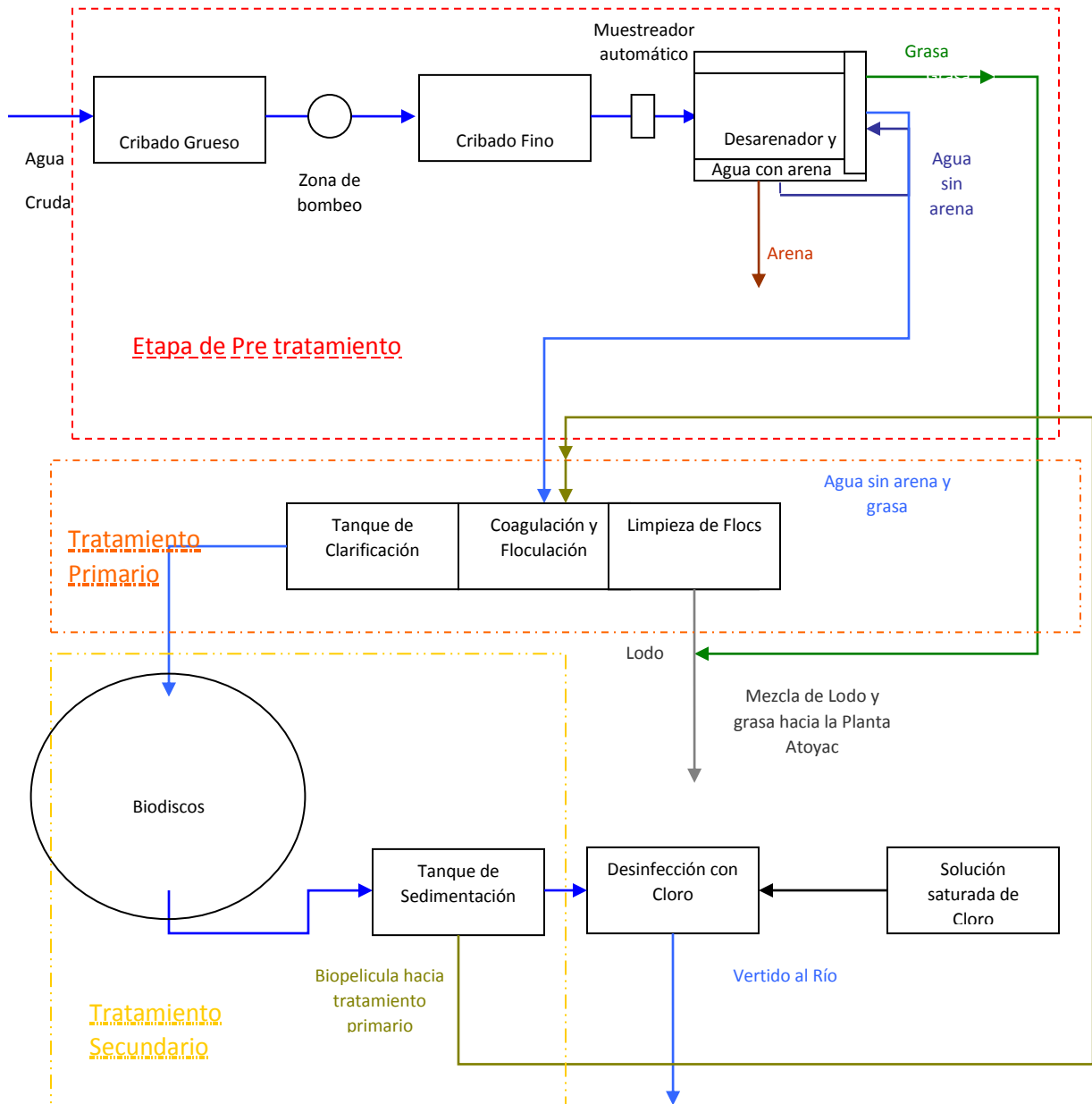
Zhang X., Zhang T., Fang H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 82:397–414

11 ANEXOS

11.1 ANEXO I. ESQUEMA DEL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL EN LA PLANTA ALSESECA SUR DE LA CIUDAD DE PUEBLA



11.2 ANEXO II. ESQUEMA DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO EN LA PLANTA PARQUE ECOLÓGICO REVOLUCIÓN MEXICANA DE LA CIUDAD DE PUEBLA.



AGUAS RESIDUALES.- MUESTREO

RESIDUAL WATERS.- SAMPLING

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

Esta norma establece los lineamientos generales y recomendaciones para muestrear las descargas de aguas residuales, con el fin de determinar sus características físicas y químicas, debiéndose observar las modalidades indicadas en las normas de métodos de prueba correspondientes.

2 DEFINICIONES

2.1 Agua residual

Es el líquido de composición variada proveniente de usos municipal, industrial, comercial, agrícola, pecuario o de cualquier otra índole, ya sea pública o privada y que por tal motivo haya sufrido degradación o alteración en su calidad original.

2.2 Canal abierto

Cualquier conducto en el cual el agua fluye presentando una superficie libre.

2.3 Colector

Es un conducto abierto o cerrado que recibe las aportaciones de agua de otros conductos.

2.4 Descarga

Es el conjunto de aguas residuales que se vierten o disponen en algún cuerpo receptor.

2.5 Muestra simple

Es aquella muestra individual tomada en un corto período de forma tal que el tiempo empleado en su extracción sea el transcurrido para obtener el volumen necesario.

2.6 Muestra compuesta

Es la que resulta del mezclado de varias muestras simples.
