



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS:

CONVERSIÓN DE PLANTA DE AGUAS RESIDUALES FÍSICO-QUÍMICA A
BIOLÓGICA DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE LOS REYES
USANDO LODOS ACTIVADOS EN EL PROCESO PRIMARIO

PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p.Q.F.B JOSÉ LUIS MACÍAS ROJAS

ASESOR: Doctor en aspectos moleculares y celulares de la Biología.

RAFAEL ORTIZ ALVARADO

CO-ASESOR: Ingeniero mecánico en producción de energía y diseño

OMAR JESÚS LÓPEZ NERÍ

MORELIA, MICH. Febrero 2014



El presente trabajo (tesis), ha sido realizado en el laboratorio de investigación análisis y aseguramiento de calidad del agua de la facultad de Químico-Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en conjunto con el laboratorio de química del Instituto Tecnológico Superior de los Reyes y la concurrencia de una beca-tesis proporcionada a través del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del estado de Michoacán dentro de la convocatoria 2011 y con el número de expediente no. 34. Así como un apoyo parcial de becanet 2010.

AGRADECIMIENTOS

A la UMSNH y la facultad de Químico-Farmacobiología por permitirme formar parte de la comunidad Nicolaíta.

Al ITSLR por todo el apoyo brindado durante este proyecto.

A mis profesores que me compartieron su conocimiento.

A mis amig@s (Marí, Mariana, Anahí, Marco (compa), Daniel, Julio, Ixchel, Luis) que estuvieron en el trayecto de mi formación.

Muy en especial:

A mis Padres Luis Macías Ramos y Margarita Rojas Martínez y mis hermanas Maru, Karla, Nathaly y Cinthya que sin su apoyo, amor y constancia no hubiera podido alcanzar mis metas.

Al D.C. Rafael Ortiz Alvarado por su gran apoyo y amistad.

Al Ing. Jesús Omar López Neri, por toda la dirección, amistad, apoyo y gratos momentos alcanzados a lo largo del proyecto (aún queda mundo por conquistar).

A P.Q.F.B. Juan Josué Sandoval Ramírez amigo incondicional quien me mostro el camino a seguir en esta apasionante vida.

A Julia y Miguel por su dirección en este mundo y al resto de mis hermanos en la fe (entre ellos Marco, Caty, Sandy, Moy, Micky...y más.)

A lo sumo:

Mis ojos no alcanzan a verte pues apenas y logro ver todo lo creado, sin que mis oídos registren sonidos, en mi corazón percibo la voz de un amor, que aunque no tangible, si perceptible en cada persona a mi alrededor...las palabras no rinden para agradecerte todo lo que has hecho por mí, gracias Dios nuestro.

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	4
2. ÍNDICE DE TABLAS.....	5
3. ÍNDICE DE FIGURAS	6
4. ABREVIATURAS	7
5. RESUMÉN	9
6. INTRODUCCIÓN	10
CAPÍTULO 1 DEMANDA DE AGUA	11
CAPÍTULO 2 CONTAMINANTES BIOLÓGICOS.....	17
CAPÍTULO 3 GEOPOSICIONAMIENTO GLOBAL	24
7. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA.....	30
8. HIPÓTESIS	31
9. OBJETIVOS.....	32
10. MATERIAL Y MÉTODOS	33
11. RESULTADOS.....	36
12. DISCUSIÓN	39
13. CONCLUSIONES	42
14. PERSPECTIVAS.....	43
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

2.ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de contaminación obtenido en la evaluación de la calidad microbiológica del agua de pozo **18**

Tabla 2. Temperatura y pH determinados in situ y localizados por Geoposicionamiento global. **36**

Tabla 3. Densidad poblacional de Enterobacterias por volumen de muestra y su Geoposicionamiento global. **37**

Tabla 4. Tipo de agua según la densidad de microorganismos coliformes fecales por volumen de muestra y su Geoposicionamiento global. **38**

3. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Áreas con escasez de agua en el mundo (tomado de International Water Management Institute)	11
Figura 2. Mar de Aral en la actualidad (NASA 1985).....	12
Figura 3. Cultivo de zarzamora (Tomado Macías rojas).....	14
Figura 4. Método del Número más Probable A) Agregado de la muestra en tubos con medio de cultivo para realizar la dilución, B) Inmersión la campana de Durham, C) Campanas elevadas del fondo demuestran la producción de gas (tomado Ortiz Alvarado).....	20
Figura 5. Calculando la posición usando tres satélites (Tomado Jim Newman)	26

4. ABREVIATURAS

REPDA:registro Público de Derechos de Agua.

CONAGUA: Comisión Nacional del Agua.

NOM-CCA-033-ECOL/1993: Norma Oficial Mexicana que establece las condiciones bacteriológicas para el uso de aguas residuales de origen urbano o municipal o de la mezcla de estas con la de los cuerpos de agua, en el riego de hortalizas y productos hortofrutícolas.

ADN:ácido desoxirribonucleico.

Sp: que no se conoce la especie solo el genero.

NMP: Número Más Probable.

PCR:reacción en cadena de la polimerasa.

qPCR, Q-PCR:reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

ATP:adenosina trifosfato.

CTP:citidinatrifosfato.

GTP:guanosintrifosfato.

TTP:tiamina trifosfato.

ADNc:ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN:ácido ribonucleico.

RT-Q-PCR:reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

RT-PCR:transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa.

$\lambda_{\max}$:lambda máxima.

FRET: transferencia energética de fluorescencia por resonancia.

T_m:temperatura de fusión.

ARNm:ácido ribonucleico mensajero.

OGM:organismos genéticamente modificados.

GPS:Sistema de Geoposicionamiento Global.

NOM-127-SSA1-1994:salud ambiental, agua para uso y consumo humano-limites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

msnm: metros sobre el nivel del mar.

pH: potencial de Hidrogeno.

r.p.m: revoluciones por minuto.

NMX-AA-008-SCFI-2000:Análisis de agua - determinación del pH - método de prueba (cancela a la nmx-aa-008-1980).

U.F.C: Unidades Formadoras de Colonias.

5. RESUMEN

CONVERSIÓN DE PLANTA DE AGUAS RESIDUALES FÍSICO-QUÍMICA A BIOLÓGICA DEL INSTITUTO SUPERIOR DE LOS REYES, USANDO LODOS ACTIVADOS EN EL PROCESO PRIMARIO.

Resumen.

El valle de los Reyes de Salgado Michoacán tiene una vocación agrícola del cultivo extensivo de frutos del genero *Rubus*, como los arándanos, frambuesas y zarzamoras, los cuales tienen como destino el mercado de exportación, generando una agroindustria en los municipios de Los Reyes, Periban y Tocumbo; parte del éxito de esta industria recae en la utilización de agua para el riego de estos cultivos, disponer de agua de calidad para el cultivo de frutos debe apegarse a las normas mexicanas, que preserven la inocuidad alimentaria, más el municipio de Los Reyes realiza descargas de agua residuales en puntos geográficos de los afluentes que se utilizan posteriormente para riego en ciertas zonas de cultivo, lo cual repercute en la carga microbiana de la familia *Enterobacteriaceae*. En el presente trabajo se incorpora la utilización del sistema de geoposicionamiento global para el muestreo de agua utilizada para el riego en esta zona agrícola. Las muestras fueron procesadas para su análisis microbiológico determinado, el género, especie y número de enterobacterias contaminantes, de esta manera se conforma un mapa con datos de longitud, latitud y altitud sobre el nivel del mar permitiendo determinar el sitio de descarga, la carga microbiana el tipo de microorganismo patógeno o potencialmente patógeno con una exactitud geográfica y ser actualizado a través de un monitoreo de laboratorio y plataforma informática.

Palabras Clave: Inocuidad Alimentaria, familia *Enterobacteriaceae*, Geoposicionamiento Global

Apoyado: Cecti Michoacán, PROMEP UMICH-139.

CONVERSION PLANT WASTE-WATER BIOLOGICAL PHYSICAL CHEMISTRY FROM INSTITUTE SUPERIOR OF LOS REYES, USING ACTIVATED SLUDGE IN THE PRIMARY PROCESS.

Abstract.

The valley of Los Reyes de Salgado Michoacán has extensive agricultural potential fruit crop of the genus *Rubus*, such as blueberries, raspberries and blackberries, which are destined for the export market, generating an agribusiness in the municipalities of Los Reyes, Periban and Tocumbo, part of the success of this industry relies in the use of water for irrigation of these crops, having quality water for the cultivation of fruit should abide by Mexican standard that preserve food safety, nevertheless, the city of Los Reyes make waste water discharges in geographical location of the tributaries that are then used for irrigation in certain areas of cropping, which affects the microbial loads of the family *Enterobacteriaceae*. This work incorporates the use of a global positioning system for sampling of water used for irrigation in the agricultural area. Samples were processed for microbiological analysis determined the genus, species and number of enteric contaminants, so it forms a map with longitude, latitude and altitude above sea level, allowing the download site to determine the microbial load the type of pathogenic or potentially pathogenic with a geographical accuracy and to be updated through laboratory monitoring and informatics platform.

Key Word: Food safety, family *Enterobacteriaceae*, Global Positioning System.

Support: Cecti Michoacán, PROMEP UMICH-139.

6. INTRODUCCIÓN

Hablar de agua es hablar de vida en todo su contexto ya que “el agua sigue sustentando todas las formas de vida: algunos organismos de gran simplicidad pueden existir sin aire, pero ninguno puede desarrollarse sin agua, En el hombre solo la tercera parte del peso de su cuerpo está hecha de otros compuestos”. Dado que es el líquido más utilizado, por ende, es el más contaminado; gracias a su formidable reactividad “como sustancia química, es única: es un compuesto de gran estabilidad, solvente notable y poderosa fuente de energía química. Toma algo de casi todas las sustancias orgánicas, pero es poderosamente atraída por casi todos los materiales inorgánicos, incluso ella misma”, sin olvidar que “el agua es una de las pocas sustancias que son más pesadas como líquidos que como sólidos. Líquida, puede subir cuesta arriba a pesar de la fuerza de gravedad (capilaridad). Es tan benigna que en ella pueden medrar infinitas formas de vida, y tan corrosiva que, con tiempo suficiente, desintegrara el metal más duro” tomando en cuenta estos aspectos podemos asimilar la importancia de este líquido y como fácilmente es impregnado de grandes y variables contaminantes ya sean físicos químicos o biológicos que de manera independiente y en concentraciones moderadas pueden darle al agua un color, sabor y olor característico, pero al sobrepasar ciertos límites pasa a contaminar este invaluable líquido, teniendo como responsabilidad evaluar la calidad del agua y así determinar si es factible el tratamiento de las aguas. En un estudio dirigido por el investigador Stanley Grant, de la Universidad de California en Irvine, un equipo internacional de científicos afirma que reciclar las aguas residuales fruto de las actividades cotidianas es el mejor método para acabar con la escasez que sufren muchos países, entre ellos España. Por lo anterior es indiscutible el hecho de que debemos optar por métodos para el tratamiento de aguas que sean viables, económicos y de gran impacto a nuestra sociedad como a nuestra rutina diaria no solo por el hecho de crear conciencia sino para tener un modo de vida más condescendiente con futuras generaciones.

CAPITULO 1

DEMANDA DE AGUA

1.1 Escases a nivel mundial.

Debido a que el agua (tanto de lluvia como por irrigación artificial) es un factor determinante en el rendimiento de los cultivos, la optimización de los recursos hídricos en general es medular dentro de uno de los más grandes desafíos de este siglo: la alimentación sustentable de 9 mil millones de personas en un mundo de clima cambiante donde la lluvia y la temperatura son cada vez más erráticas (ver figura 1). (www.ifibyne.fcen.uba.ar/new/temas-de-investigacion/laboratorio-de-fisiologia-y-biologia-molecular-lfbm, 2012)

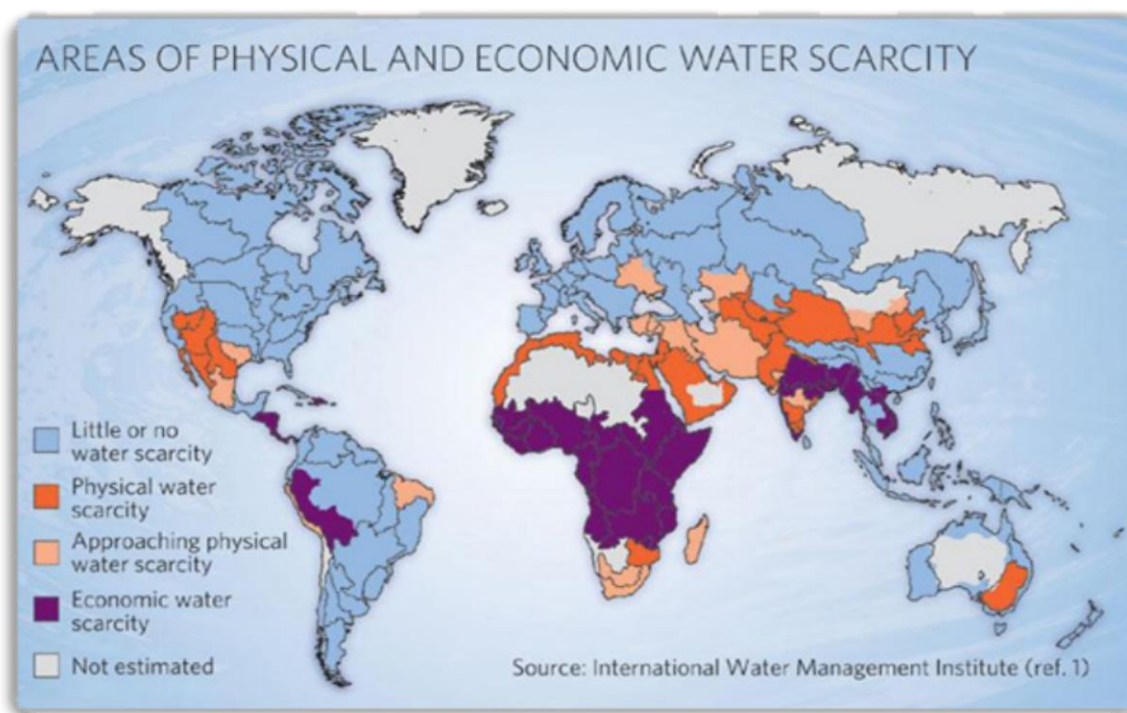


Figura 1. Áreas con escasez de agua en el mundo (tomado de International Water Management Institute).

Ya sea por la contaminación o por una excesiva demanda de la misma, es probable que diez países africanos experimenten una severa escasez de agua, entre ellas Egipto que está perdiendo vitales provisiones del río Nilo mientras otras naciones desarrollan las fuentes del río. En China, cincuenta ciudades enfrentan ya la escasez de agua. En India, decenas de miles de pequeñas poblaciones enfrentan la escasez. En la ex Unión Soviética el agotamiento de agua de río para la irrigación y para otras necesidades ya ha hecho que el mar de Aral descienda dos tercios desde 1960(ver figura 2) y en los Estados Unidos, un quinto de la tierra irrigada es sometida al excesivo bombeo de agua de pozo. En México, se extrae un 40% más de agua de cuanto se reemplaza, lo que hace que la tierra se hunda e introduce la posibilidad de tener que importar agua dulce (<http://www.ecojoven.com/tres/05/aguas.html>, 2011). Es indiscutible la gran demanda por este vital líquido en el mundo y de la necesidad por reutilizar este vital líquido.

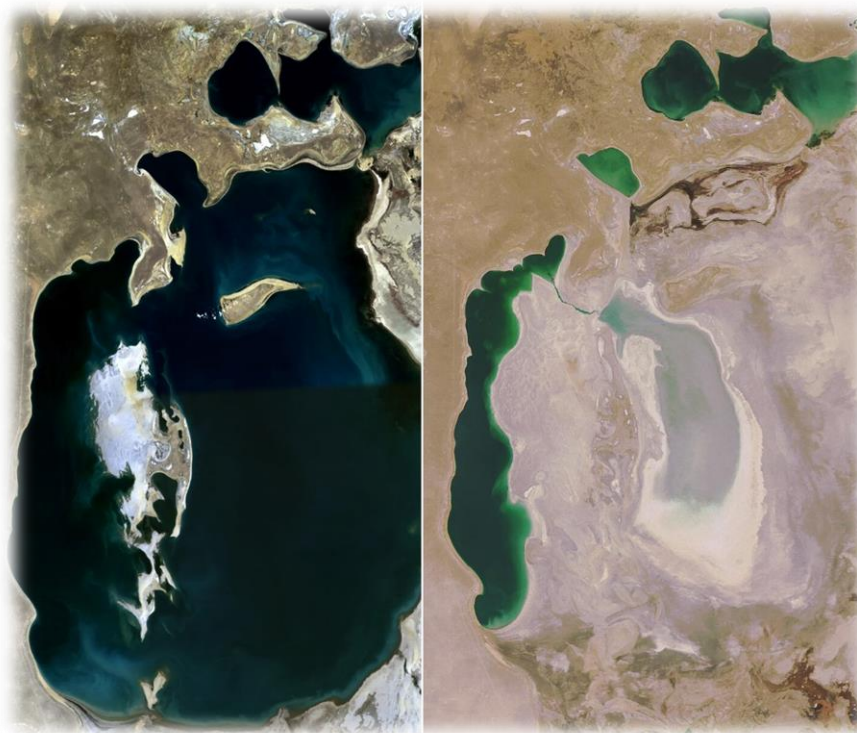


Figura 2. Mar de Aral en la actualidad (NASA 1985).

1.2 Aprovechamiento del Agua en Los Reyes Michoacán.

En la región de Los Reyes de Salgado Michoacán cuya cuenca Los Reyes pertenece a la Región Hidrológica denominada Balsas en la cuenca del río Tepalcatepec y a la subcuenca río Itzécuaro. La hidrología superficial está integrada por los ríos Itzécuaro, Atapan o El Salitre, Agua Blanca, Los Reyes, Huatarillo (Zitzio), El Chivo-Itzécuaro (La Majada), Apupataro, entre otras corrientes menores.

Según el Registro Público de Derechos de Agua (REPDa) de la Comisión Nacional del Agua (Conagua), el uso agrícola tiene el dominio de los aprovechamientos superficiales con 123 usuarios (71%) y un volumen de 35,770,407.29 m³ (57%) del total concesionado; mientras que son apenas 23 usuarios del público-urbano con 1,109,457.74 m³, representando el 21% y 41% respectivamente. Una parte importante del Valle Los Reyes es abastecida de riego por medio de manantiales y sus afluentes. Con respecto a los aprovechamiento de agua subterránea en el municipio de Los Reyes, corresponde al uso agrícola 672,624.00 m³ (77%) y al público urbano 865,247.75 m³ (22.2%).

En el municipio de Los Reyes se estima una superficie de 13,884 hectáreas dedicadas a la agricultura (Plan de desarrollo municipal 2008-2011 Los Reyes, Michoacán). El Valle Los Reyes es la principal zona de cultivo de zarzamora, seguido de la producción de caña y aguacate. Estos cultivos son abastecidos de agua superficial y subterránea a través de las siguientes fuentes:

En primer lugar el manantial *la majada*, del cual se forma el río El Chivo, en segundo lugar por manantiales u ojos de agua localizados por todo el Valle, y en tercer lugar se riega por los ríos Los Reyes y Agua Blanca, los cuales al paso por la ciudad de Los Reyes se van contaminando con las aguas de drenaje. Esta agua es usada para el riego en los potreros de Las Cajas, Las Bodegas y Las Cirandas, además de que sus escurrimientos van a formar parte del mismo sistema de canales que desembocan en el río El Chivo, a la mitad del curso del río entre las

localidades de San Sebastián y Los Limones (Evaluación diagnóstica de estabilidad ambiental, 2009).

1.3 Cultivos en Los Reyes.

El cultivo de la zarzamora (ver figura 3) inició en el año de 1994 con 4 ó 5 plantaciones comerciales de la variedad *brassos*, cuya superficie no excedía las 3 hectáreas. Actualmente esta fruta abarca 4 mil 500 hectáreas, de las cuales 3 mil 750 están en la jurisdicción de Los Reyes y el resto en Tecombo y Peribán. La producción del ciclo 2010 arrojó 30 mil toneladas de zarzamora, de las cuales el 90 por ciento se exportó a Estados Unidos, como principal mercado, y el resto a Europa y Japón. La producción del valle representa el 95 por ciento de la estatal y el 90 por ciento de la nacional.



FIGURA 3. Cultivo de zarzamora (Tomado Macías rojas).

1.4 Regulación normativa para el uso de aguas residuales.

Para asegurar la calidad e inocuidad del producto fresco es indispensable contar con agua que cumpla con las normas Mexicanas correspondientes, como la “Norma Oficial Mexicana NOM-CCA-033-ECOL/1993, que establece las condiciones bacteriológicas para el uso de aguas residuales de origen urbano o

municipal o de la mezcla de estas con la de los cuerpos de agua, en el riego de hortalizas y productos hortofrutícolas” (Instituto Nacional de Ecología). La presente norma oficial mexicana es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional para:

Otorgar las autorizaciones, permisos o concesiones para el uso o aprovechamiento de aguas residuales en el riego de hortalizas y productos hortofrutícolas.

1.5 Restricciones de las aguas residuales.

La Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, a través de la Comisión Nacional del Agua, otorga autorizaciones, permisos y concesiones para el uso de aguas residuales de origen urbano o municipal o de la mezcla de estas con la de los cuerpos de agua en riego de frutos y hortalizas.

Las restricciones de las aguas residuales de origen urbano o municipal o de la mezcla de estas con la de los cuerpos de agua, que se dispongan a través de su uso en el riego de frutos de consumo crudo, en lo relativo a parámetros bacteriológicos se clasifican en los siguientes tipos para efectos de determinar las clases de cultivos no permitidos:

I.- Tipo 1.- La que contenga menos de 1,000 coliformes totales por cada 100 ml. y ningún huevo de helminto viable por litro de agua.

II.- Tipo 2.- La que contiene de 1 a 1,000 coliformes fecales por cada 100 ml. y cuando más un huevo viable de helminto por litro de agua.

III.- Tipo 3.- La que contiene de 1,001 a 100,000 coliformes fecales por cada 100 ml.

IV.- Tipo 4 - La que contiene más de 100,000 coliformes fecales por cada 100 ml

En la actualidad la identificación de microorganismos patógenos de tipo bacteriano, fúngico, protozoarios o viral en muestras de agua está lo suficientemente desarrollado y aplicado en los laboratorios de microbiología y de análisis de agua y calidad de la misma, a través de herramientas en medios de cultivo selectivos, biología molecular, microscopia y pruebas inmunológicas, con las correspondientes variantes.

Pero es necesario incorporar plataformas de muestreo de datos sobre el terreno de muestreo, dado que los afluentes y cuerpos de agua utilizados para el uso y consumo humano son susceptibles a variaciones del volumen métrico, por los accidentes geográficos, así como el desarrollo de las zonas conurbadas y por ende las descargas de aguas residuales.

CAPITULO 2

CONTAMINANTES BIOLÓGICOS

2.1 Enterobacterias.

Las enterobacteriás (Enterobacteriaceae) son organismos células procariontes, por lo que pertenecen a las denominadas Eubacterias, comúnmente se les denomina bacterias, las que están relacionadas con patologías que comprometen particularmente el sistema gastrointestinal en organismos superiores como es el género *Homo sapiens*. Las enterobacterias están implicadas en procesos de contaminación en alimentos y particularmente en fuentes de agua para uso y consumo humano (Meays et al., 2004), por lo que es indispensable contar con criterios científicos que permitan su identificación de otros grupos de microorganismos.

Los criterios taxonómicos en la actualidad incluyen:

Morfología bacterias con una reacción negativa a la tinción gram, la morfología clásica es bacilar, cocobacilos y otros pleomórficos. Algunos géneros poseen un flagelo que les permite desplazarse, aunque algunos géneros no son móviles.

La actividad enzimática, permite identificar parte del metabolismo de los diferentes generos pero, en general son oxidasa negativo (excepto Plesiomonas, que es oxidasa positivo), es decir, carecen de la enzima cito cromo oxidasa. Son capaces de reducir nitrato en nitrito. Son anaeróbicos facultativos.

Son fermentadores de carbohidratos en condiciones anaeróbicas con o sin la producción de gas (en especial glucosa y lactosa), y oxidadores de una amplia gama de substratos en condiciones aeróbicas, como el citrato, malonato.

La familia *Enterobacteriaceae*, posee géneros que son patógenos clásicos lo cuales es necesario monitorear de manera constante en afluentes de agua, como lo son el género *Salmonella sp.* y *Shigellas sp.*, trabajos recientes sugieren que

existe una fuerte correlación entre la actividad humana (en los conglomerados urbanos) y la calidad del agua y la prevalencia de las enfermedades transmitidas por el agua a través de la red municipal de agua potable en donde han sido estudiadas muestras de agua a través del análisis de los indicadores microbiológicos utilizados actualmente para evaluar la calidad del agua potable y estudios de tipo retrospectivo de las enfermedades infecciosas transmitidas por el agua tratada en los centros de salud locales.

Tabla 1. Porcentaje de contaminación obtenido en la evaluación de la calidad microbiológica del agua de pozo (tomado de Degbey et al. 2011)

Agente contaminante	Porcentaje%
<i>Escherichiacoli</i>	12.5
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	12.2
<i>Staphylococcusaureus</i>	12.2
<i>Salmonella sp</i>	12.1
<i>Clostridiumperfringens</i>	12
estreptococos fecales	11.1

Manifestándose los procesos infecciosos en altas tasas de procesos diarreicos, infecciones urinarias, fiebre tifoidea, los estudios de tipo retrospectivo fueron consistentes con los resultados de la evaluación de la calidad microbiológica del agua de pozo. Estos resultados demuestran que la actividad humana ha influido en la calidad del agua, especialmente la falta de saneamiento y puntos de control, de análisis y de aseguramiento de la calidad del agua para uso y consumo humano aun en países catalogados como países desarrollados, en los cuales el acceso a servicios de agua potable deben estar asegurados. (Degbey et al. 2011).

En la actualidad la determinación del tipo de microorganismo no es solamente el único criterio de calidad microbiológico de la calidad del agua, adicionalmente es necesario contar con el dato que permita conocer la concentración o densidad

poblacional de microorganismos en una muestra de agua. Esto se logra a través de dos tipos de herramientas: NMP y PCR.

2.2 El método del número más probable (NMP).

(Most probable number - MPN - en inglés), también referido como el método de los ceros de Poisson, es una forma de obtener resultados cuantitativos a través de concentraciones de elementos discretos a partir de datos de incidencia positiva/negativa. Es una estrategia eficiente para determinar densidades de población celular que se utiliza cuando una evaluación cuantitativa de elementos celulares individuales no es viable.

La metodología se basa en determinar la presencia o ausencia (positivo o negativo) de atributos de crecimiento o actividades metabólicas específicas de microorganismos en copias obtenidas por diluciones consecutivas a partir de muestras de suelo u otros ambientes. Se basa en el principio de que una única célula viva puede desarrollarse y producir un cultivo turbio. El método requiere la realización de una serie de diluciones en serie de la muestra de cultivo, en un medio líquido adecuado (Caldo Lauril Sulfato de Sodio) para el crecimiento de dicho organismo de un volumen diez veces mayor. Luego, se incuban las muestras de esos tubos y, pasado un tiempo, se examinan los tubos. Aquellos tubos que recibieron una o más células microbianas procedentes de la muestra, se pondrán turbios, mientras que los tubos que no recibieron ninguna célula permanecerán transparentes.

Al aumentar el factor de dilución, se alcanza un punto en el que algunos tubos contendrán tan sólo un microorganismo y otros tubos no contendrán ninguno. Al calcular la probabilidad de que los tubos no hayan recibido ninguna célula, se puede estimar el número más probable de microorganismos presentes en la muestra original, a partir de una tabla estadística.

La precisión del método del número más probable aumenta con el número de tubos que se usan; cinco tubos por dilución se consideran como una relación adecuada entre precisión y economía.

Una condición del método es la necesidad de poder reconocer un atributo específico de la población en el medio de crecimiento que se emplee. La estimación de la densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en sucesivas diluciones en serie y el empleo del cálculo probabilístico (Ver figura 4).

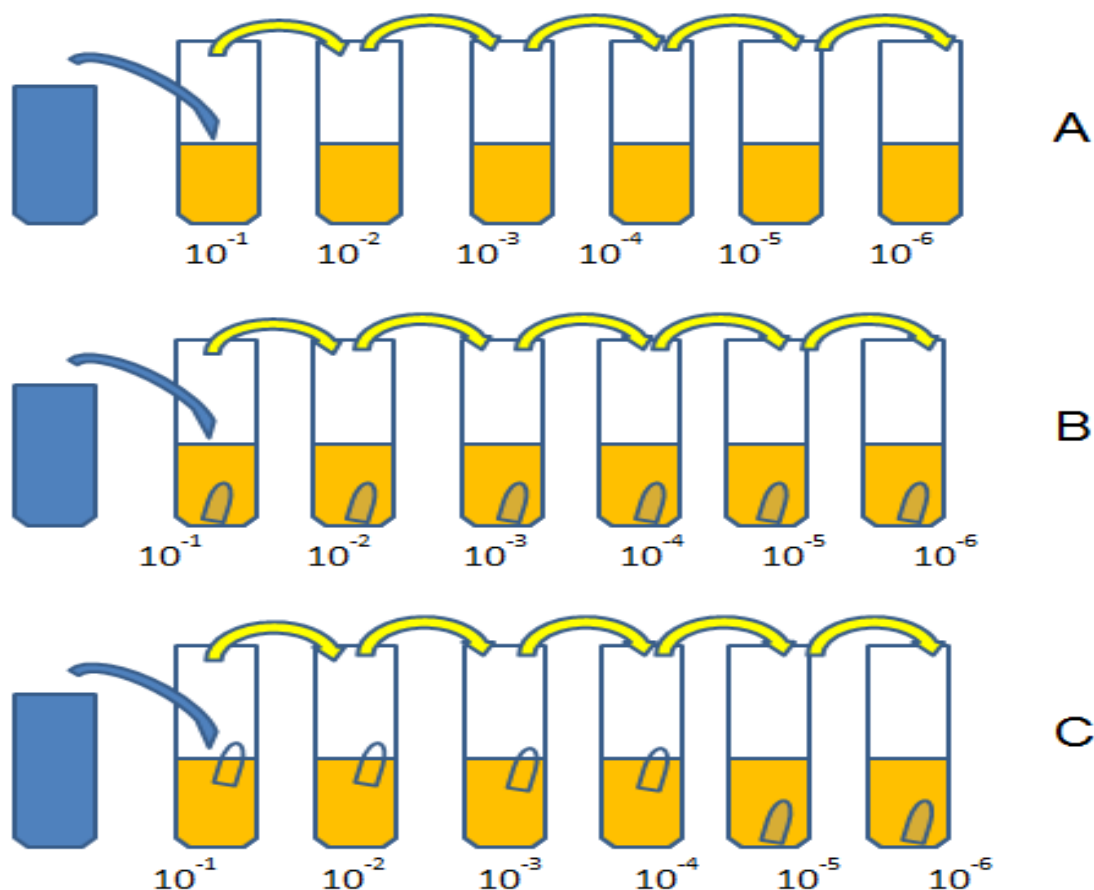


Figura 4. Método del número más probable A) Agregado de la muestra en tubos con medio de cultivo para realizar la dilución, B) Inmersión la campana de Durham, C) Campanas elevadas del fondo demuestran la producción de gas (tomado Ortiz Alvarado).

Hay muchas entidades discretas que son fáciles de detectar pero difíciles de contar. Una aplicación es el de cualquier clase de reacción de amplificación o reacción de catálisis que impide una cuantificación fácil, pero permite que su

presencia sea detectada de modo muy sensible. Algunos ejemplos comunes son: crecimiento de microorganismos, acción enzimática, o catálisis química. El método del NMP supone tomar la disolución original o muestra y subdividirla en un factor (frecuentemente 10 veces, o 2 veces) y evaluar la presencia/ausencia en múltiples subdivisiones.

El grado de dilución para el cual comienza a aparecer la ausencia indica que los elementos se han diluido tanto que hay muchas submuestras en las que no aparece. Un juego de repeticiones para cualquier concentración dada permite una resolución más fina, para usar el número de muestras positivas y negativas que estiman la concentración original dentro del apropiado orden de magnitud.

2.2.1 Aplicaciones.

Este método se usa para contar microorganismos difíciles de cultivar en medio sólido, o para determinar el número de células que pueden crecer en un medio líquido determinado, como el análisis para determinar la contaminación del agua potable, determinando el número de bacterias *Escherichiacoli* que pueden crecer en un medio con lactosa. La presencia de *E. coli* en el agua potable es una prueba de contaminación.

2.3 Cuantificación de la expresión génica (PCR).

La cuantificación puede realizarse en términos absolutos o relativos. En el primer caso, la estrategia es relacionar la señal de amplificación obtenida con el contenido en ADN empleando una curva de calibrado; para este enfoque es vital que la PCR de la muestra y de los elementos de la recta de calibrado posean una misma eficiencia de amplificación. En el segundo caso, se expresa el cambio en los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm) interpretado como ADN complementario (ADNc, generado por transcripción inversa del ARNm); esta cuantificación relativa es más fácil de realizar, puesto que no requiere curva de

calibrado, y se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar *versus* un gen control (también llamado de referencia, interno o, en inglés, *housekeeping gene*, *gen constitutivo*).

Por tanto, en la cuantificación relativa es irrelevante en qué unidades se expresa la cuantificación, y sus resultados son comparables entre múltiples experimentos de RT-Q-PCR. De hecho, el propósito de emplear uno o más genes de normalización es corregir la variación no específica, como las diferencias en la cantidad y calidad del ARN empleado, que pueden afectar a las eficiencias de retrotranscripción y de PCR. No obstante, el aspecto crucial es que la estabilidad del gen de referencia sea una realidad.

La selección de los genes internos se ha realizado clásicamente en Biología Molecular analizando la estabilidad de la expresión en estudios cualitativos o de baja sensibilidad, como el examen visual de geles de ARN, densitometría de Northernblots. En plena era de la genómica, es posible realizar una aproximación a gran escala empleando los chips de ADN para muchos organismos. No obstante, se ha descrito que la mayoría de los genes empleados como normalizadores en la cuantificación de la expresión de ARN mensajero varían según las condiciones experimentales. Por ello, es preciso realizar un estudio metodológico previo a emplear a fin de seleccionar, con ayuda de herramientas estadísticas, los más apropiados.

Se han desarrollado varios algoritmos estadísticos que detectan qué gen o genes son los más apropiados para la normalización de un conjunto de tejidos bajo unas condiciones dadas: algunos, como geNORM o BestKeeper, realizan, sobre una matriz de expresión de genes de referencia para diversos tejidos, comparaciones por pares y medias geométricas.

2.3.1 Modelización.

A diferencia de la PCR de punto final (PCR convencional), la PCR en tiempo real permite cuantificar el nivel de producto obtenido en cualquier momento de la amplificación mediante la señal de fluorescencia (en realidad, mediante su nivel sobre un umbral). Los valores de fluorescencia, expresados como logaritmos a fin de estudiar fácilmente la fase exponencial de amplificación, que aparece como una línea recta al representar gráficamente el logaritmo de la fluorescencia frente al número de ciclo; este segmento, denominado segmento cuantificable, permite valorar la cantidad de ADN inicial.

Las cinéticas de tres PCR de tres muestras distintas (K, L y M) de concentraciones de ADN inicial decrecientes (concretamente, se reducen a la décima parte cada vez) se representan en un gráfico del logaritmo de la fluorescencia (en ordenadas) frente al ciclo de PCR (en abscisas). No se representan las fases previas a la exponencial.

2.3.2 Enfoques.

Como se indicaba anteriormente, es posible por tanto cuantificar la expresión génica en términos absolutos como en relativos (es decir, por comparación con la expresión de otro gen). En el segundo caso, es de vital importancia seleccionar como gen estándar aquél que cuya expresión realmente no varíe cuando se somete al individuo al tratamiento experimental cuyo efecto en la transcripción se desea estudiar (por ejemplo, un estrés ambiental, biótico o tipo de tejido).

CAPITULO 3

GEOPOSICIONAMIENTO GLOBAL

3.1 Historia.

El GPS surgió debido a la necesidad de las fuerzas armadas de tener un sistema de navegación preciso y que funcionara en aplicaciones diversas. El desarrollo de la tecnología de GPS descansa en progresos en ciencias físicas, en la electrónica, en ciencias de materiales y en muchas otras, pero fue el desarrollo de dispositivos extremadamente precisos para medir el tiempo; relojes atómicos, junto con progreso en la tecnología espacial, que en realidad hicieron posible el GPS. Relojes precisos son esenciales porque el GPS depende en el cronometraje del tiempo que toma a señales de los satélites llegar a los receptores en la tierra para determinar la posición, y los tiempos de viaje de estas señales son extremadamente cortos.

3.2 Medida de Tiempo con Precisión.

Todos los átomos emiten ondas electromagnéticas cuando cambian su estado energético debido a la reorganización de sus electrones. Estas ondas se conocen como frecuencias resonantes y son extremadamente precisas y características de cada tipo de átomo. En 1944, I. I. Rabi, ganador del Premio Nobel de ese año por el desarrollo de la técnica de resonancia magnética para medir las frecuencias resonantes de los átomos, sugirió que debido a la precisión de las resonancias atómicas, ellas podrían ser usadas para crear relojes extraordinariamente precisos. En 1948, la Oficina Nacional de Normas en los Estados Unidos, fabricó el primer reloj atómico. Este utilizaba moléculas de amoníaco, y el tubo de haz era un tubo de cobre envuelto sobre la esfera del reloj. Nunca fue usado ya que era menos fiable que un común reloj de cuarzo, con error de un segundocada cuatro meses. El primer reloj atómico práctico fueconstruido en 1955 y ocupaba una sala completa del Laboratorio Nacional de Física, en Gran Bretaña. Utilizaba las frecuencias resonantes de cesio, y tenía una precisión de un segundo en 300

años. En 1956 se fabricó una versión portable, el "Atomichron", que podía moverse fácilmente de sitio a sitio.

3.3 El primer satélite de GPS.

El primer satélite de GPS fue lanzado en el 1978. Comenzando en el 1989, una segunda generación de satélites (Satélites de Bloque II) fue puesta en servicio. El sistema alcanzó operación plena en el año 1995. En el presente, la flotilla de satélites de GPS consiste en por lo menos 24 satélites Bloque II. En 1983, luego de que una aeronave Coreana de pasajeros fue derribada por los soviéticos porque penetró su espacio aéreo debido a errores de navegación, el presidente Ronald Reagan declaró que el sistema GPS sería disponible para usos civiles luego de que se completara.

Debido a que el sistema GPS fue desarrollado principalmente para aplicaciones militares, errores de cronometraje (disponibilidad selectiva, "selective availability" - SA) fueron aplicados a las señales de GPS, lo cual limitaba la precisión de posicionadores militares. Durante la guerra del Golfo Persa en 1991, el sistema GPS se había hecho tan indispensable, que no habían suficientes posicionadores (receptores) militares para las tropas, por lo cual el Departamento de Defensa tuvo que usar posicionadores civiles y eliminar temporalmente la SA. La SA global fue eliminada permanentemente en el año 2000, pero el servicio militar Estadounidense aún puede introducir errores en las señales en extensiones geográficas limitadas.

3.4 Funcionamiento del GPS.

GPS depende en que cada satélite en la constelación transmita su posición exacta y una señal de tiempo extremadamente precisa a los recibidores en la tierra. Dada esta información, los receptores GPS pueden calcular su distancia al satélite, y combinando esta información de cuatro satélites, el receptor puede calcular su posición exacta usando un proceso llamado trilateración.

3.4.1 Trilateración.

Si uno conoce la distancia a un satélite, uno sabe que su posición se encuentra sobre una esfera con centro en el satélite y con un radio igual a la distancia (ver Figura 5).

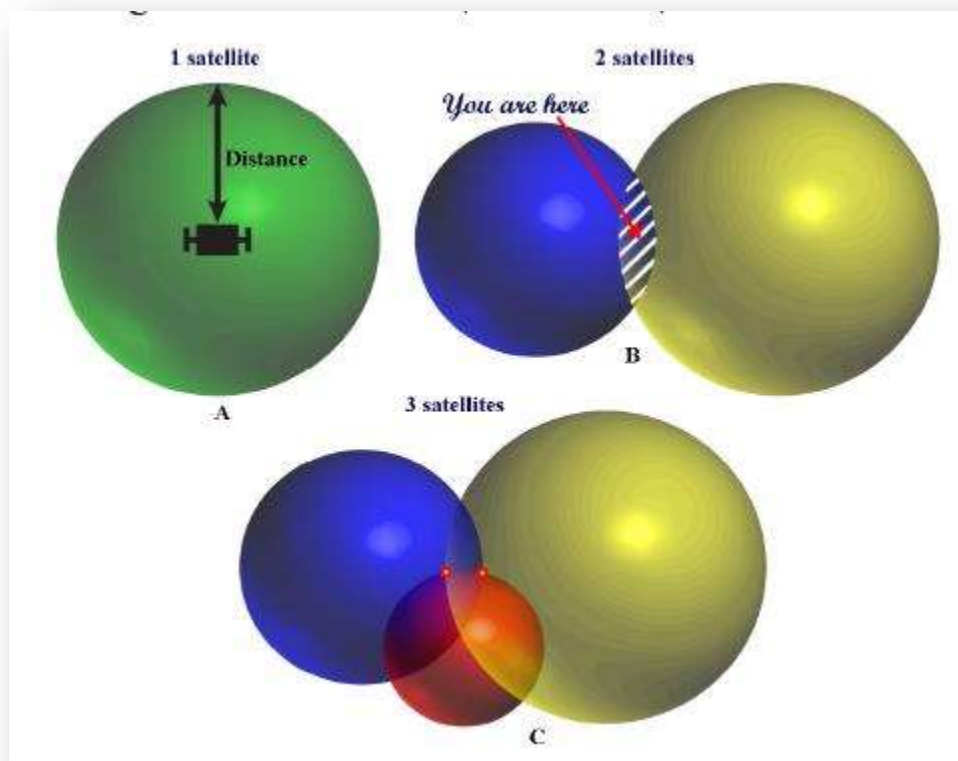


Figura 5.Calculando la posición usando tres satélites (Tomado Jim Newman)

Si uno obtiene la misma información de un segundo satélite, puede estrechar su posible posición al área que tienen en común las dos esferas (región matizada, Cuadro 3B). Si se añade información de un tercer satélite, se puede precisar aún más la posición a los dos puntos donde las tres esferas cruzan (cuadrados pequeños, Cuadro 3C). Para determinar cuál de los dos puntos representa nuestra posición actual, podemos tomar una cuarta medida, pero generalmente uno de los dos puntos obtenidos de tres satélites representa una posición absurda (por ejemplo en el espacio abierto) o con movimiento imposiblemente rápido, por lo

cual se puede eliminar sin necesidad de la cuarta medida. Sin embargo, la cuarta medida aún es necesaria.

3.4.2 El cuarto satélite.

La distancia a los satélites se calcula midiendo el tiempo que toma a la señal a llegar del satélite al receptor (Distancia = velocidad X tiempo). Debido a que las señales de radio viajan a la velocidad de la luz (186,000 millas por segundo) los tiempos en tránsito de satélites a receptores son extremadamente pequeños y se necesitan dispositivos de cronometraje extremadamente precisos para medirlos con exactitud, por lo cual surge la necesidad de llevar relojes atómicos en los satélites. Sin embargo, los receptores no llevan relojes atómicos lo cual introduce errores en ese lado del sistema, y aún errores de cronometraje pequeños pueden resultar en grandes errores de posición. Aquí es donde entra en juego la cuarta medida. Si las cuatro medidas son exactas, la esfera definida por la cuarta medida debe cruzar las otras tres en un punto que representa la posición actual. Si existen errores, la cuarta esfera no cruzará a todas las otras. Debido a que el error del receptor es el mismo para las cuatro medidas, un ordenador en el receptor puede calcular una corrección que haga que las cuatro esferas crucen, y aplicar la corrección a las medidas para obtener la posición correcta. La cuarta medida también permite al sistema calcular una posición en tres dimensiones que incluye no solo latitud y longitud, sino también altitud. Las medidas de altitud, sin embargo, se reportan con referencia a un modelo matemático de la tierra para poder expresarlas en relación a un datum convencional (normalmente nivel del mar). El modelo es solo una aproximación por lo cual las medidas de altitud son menos precisas que las de latitud y longitud, y los errores son diferentes en diferentes partes del planeta.

3.5 Otros errores.

Otros errores tienen influencia en las medidas de las señales de los satélites GPS, entre ellos están la interferencia atmosférica y reflejos de obstáculos en la tierra como árboles y edificios. Se utilizan varios métodos como la corrección por frecuencia doble, filtros de señales, y modelos matemáticos para disminuir sus efectos.

3.6 Usos para el GPS.

Enumerar todas las aplicaciones para el GPS sería una labor imposible. Seguido se dan solo algunos ejemplos de aplicaciones de GPS en el mundo moderno como en la agricultura, navegación en tierra y mar, usos militares, mapas y agrimensura, recreación, referencia de tiempo y ciencias.

3.7 Aplicación en las Ciencias.

Las aplicaciones de GPS en las ciencias biológicas, es innovador al poder seguir poblaciones de diferentes organismos a través de sus migraciones en globo terrestre. Así mismo el GPS es especialmente valioso para investigadores de campo, para construir mapas y localizar sus estaciones de muestreo, para definir límites de hábitáculos, para análisis espacial de rasgos naturales, para seguir a poblaciones de animales, y muchas otras. GPS también es usado ampliamente en la sismología, física, ciencias del espacio y en muchas otras ramas de la ciencia.

3.8 GPS en la actualidad.

En la actualidad existen herramientas informáticas, acoplados a sistemas móviles conocidos como Sistemas de Geoposicionamiento Global los que ofrecen la capacidad gestionar información a través de Sistemas de Información Geográfico, proporcionando longitud, latitud y altitud sobre el nivel del mar, generando una exactitud de ± 2 metros en el punto geográfico de referencia y permitiendo tomar

la muestra de agua correspondiente, para su posterior análisis en el laboratorio correspondiente. De esta forma se genera un mapa que permite actualizar información respecto al tipo de microorganismo y el número de microorganismos correspondientes, los cuales se pueden consultar desde cualquier punto que tenga acceso a internet.

Al conjuntar herramientas de muestreo a través de Geoposicionamiento, herramientas de identificación y cuantificación microbiana por biología molecular de enterobacterias se permite poder monitorear la descarga de aguas residuales en cuerpos de agua para su uso en cultivos (Shipp et al., 2000, Parmar y Ritter et al., 2002, Keshari 2011).

De esta forma la decisión de utilizar una sola herramienta o una o la combinación de herramientas de identificación bioquímica, molecular para enteropatógenos y la posibilidad de contar con herramientas que permitan trazar su concentración a lo largo de fuentes de agua para su uso y consumo humano son propuestos ya por otros autores en otras latitudes y en fechas recientes (Meays et al., 2004, Roslev y Bukh, 2011), por lo que es necesario plantear una serie de preguntas que permitan analizar y plantear protocolos de investigación que conduzcan a su factibilidad y su utilización en el campo Mexicano particularmente en el estado de Michoacán.

Teniendo este breve antecedente es necesario contar con herramientas metodológicas que permitan en primer término identificar los puntos de descarga de agua residual o municipal o en su mezcla con cuerpos de agua; segundo poder identificar y cuantificar los microorganismos patógenos como el género *Salmonella* (O'Reagan et al., 2008, Chen et al., 2010) y ligados a la mezcla de aguas residuales en los cuerpos de agua, tercero contar con herramientas de identificación de microorganismos por medio de biología molecular lo cual permite aumentar la sensibilidad, reducir los tiempos de identificación y por consecuencia los costos (McCabe 2011, Peed et al. 2011)

7. JUSTIFICACIÓN DE LA PROPUESTA

El contar con agua de calidad adecuada permite el desarrollo de las actividades humanas, en donde el cultivo de frutos cuyo mercado es la exportación es primordial asegurar la calidad e inocuidad del agua de riego de acuerdo a la norma Oficial Mexicana NOM-CCA-033-ECOL/1993 y Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, en la actualidad el Municipio de Los Reyes de Salgado no cuenta con estudios publicados sobre la calidad del agua, por otro lado el Instituto Tecnológico Superior de Los Reyes se encuentra interesado en desarrollar herramientas innovadoras que permitan su uso en los diferentes sectores de la agroindustria de las frutillas rojas en las cuales descansa una buena parte de la economía local y en donde las buenas prácticas de inocuidad alimentaria son difundidas a través de los seminarios impartidos a través de la División de Innovación educativa a los productores de los municipios de Los Reyes, Periban y Tocumbo, de esta manera en el presente manuscrito se presenta una revisión exhaustiva sobre las metodologías encaminadas a la identificación de enterobacterias en cuerpos de agua los cuales son susceptibles de contaminación por fuentes de origen animal y/o humano, así como el planteamiento de la utilización de tecnologías de trazamiento de la concentración de microorganismos entéricos en puntos de descarga en cuerpos de agua, y abordando la factibilidad de estas tecnologías.

8. HIPÓTESIS

La utilización del Geoposicionamiento global y la conjunción de herramientas de identificación microbiana de enterobacterias nos permitirán calcular el sitio de descarga así como determinar la población microbiana y los posibles efectos a la salud humana en la Región de Los Reyes Michoacán.

9. OBJETIVOS

Objetivo General:

Generar herramientas que permitan el monitoreo de la carga microbiana en agua residual y mezclas con cuerpos de agua para su tratamiento en plantas tratadoras de agua locales en el Municipio de Los Reyes.

Objetivos Específicos:

El presente trabajo incluye realizar un muestreo de cuerpos de agua que recorren el municipio de los Reyes con geoposicionamiento global (GPS),

Identificar y cuantificar la carga microbiana presente en las cuerpos de agua que se mezclan con los puntos de residuos sólidos y líquidos de la zona de los Reyes.

La conjunción de metodologías como la GPS y la identificación de microorganismos patógenos así como su carga por volumen de agua muestreada.

10. MATERIAL Y METODOS

10.1 Muestreo *in situ*.

Se muestreo un volumen de 100 mL con frascos estériles y una profundidad media de 30 cm en el afluente de agua de los Reyes de Salgado Michoacán abarcando un recorrido de 18 Km de longitud desde un altitud de 1290 msnm hasta los 1460 msnm, se tomaron muestras de 9 sitios geográficos cada uno de los puntos de muestreo se geoposicionó con un Sistema Móvil de Geoposicionamiento Global Modelo GPSmap 60Cx de la marca GARMIN, asegurando la triangulación con 5 satélites, para obtener un error de lectura de ± 4 metros a nivel global.

10.2 Determinación de pH y Temperatura.

En cada uno de los 9 puntos de muestreo se determinó *in situ* la temperatura con termómetro de mercurio y a una profundidad media de 30 cm. Se determinó también el pH con un potenciómetro portátil marca Corning pH15 calibrado previamente con las soluciones de referencia de la marca Corning, siguiendo las recomendaciones de la Norma Mexicana NMX-AA-008-SCFI-2000.

10.3 Transporte.

Posteriormente las muestras transportaron en aislamiento térmico, dentro de una unidad de enfriamiento portátil preservando las muestras a una temperatura de 10°C, hasta su refrigeración por un espacio de 12 horas en el Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de la Calidad del Agua de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

10.4 Determinación de la Carga microbiana.

Para ello se utilizaron la metodología de la determinación del número más probable lo que permite la identificación y cuantificación de coliformes y coliformes fecales (Familia *Enterobacteraceae*) utilizando el medio de cultivo caldo laurillactosado de la marca Difco reconstituyéndose y esterilizándose en autoclave a 15 lbs de presión, 121°C por 15 minutos. Para cada una de las 9 muestra de agua se tomó una alícuota de un mililitro y realizaron pruebas por triplicado, utilizando, las diluciones correspondientes de 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} de la muestra en el tubo de cultivo provistos con la campana de Durham inmersos en el medio de cultivo e incubado en un baño metabólico, a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y 120 r.p.m., y verificando cada 12 horas la producción de gas por un total de 48 horas, realizando la lectura en los últimos tubos correspondientes a la serie de diluciones correspondientes a la muestra procesada por triplicado y aplicando el análisis estadístico para la validación de los resultados.

Para la identificación de coliformes fecales se realizó la prueba correspondiente de producción de gas, pero a la temperatura de $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ con agitación de 120 r.p.m. en la serie de tubos por triplicado y con las diluciones de 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} de la muestra en el tubo de cultivo provistos con la campana de Durham inmersa en el medio de cultivo, realizando lecturas cada 8 horas terminando la lectura final a las 24 horas, realizando la lectura en los últimos tubos correspondientes a la serie de diluciones correspondientes a la

muestra procesada por triplicado y aplicando el análisis estadístico para la validación de los resultados.

11. RESULTADOS

Tabla 2. Temperatura y pH determinados in situ y localizados por Geoposicionamiento global. (Luis Macías)

Punto	Nombre	Latitud	Longitud	Altitud	Temperatura ° C	pH
1	Entrada a planta de tratamiento.	19. 36941°	102.38680°	1290 msnm	22.0	8.17
2	Salida fosa séptica	19. 36924°	102.28692°	1295 msnm	20.5	8.04
3	La paz	19. 36941°	102.38680°	1296 msnm	22.0	8.09
4	Privada constitución (a 10 metros del panteón)	19. 35429°	102.29149°	1303 msnm	21.5	8.05
5	Centro	19. 35234°	102.28312°	1327 msnm	22.5	8.19
6	Guadalajara	19. 35003°	102.27490°	1349 msnm	21.5	8.14
7	Rio Itzicuaro (La planta)	19. 34816°	102.25818°	1434 msnm	17.5	7.40
8	La planta zona baja.	19. 34809°	102.25819°	1437 msnm	17.5	7.35
9	La planta	19. 34763°	102.25758°	1460 msnm	17.5	7.32

Los resultados de la **Tabla 2**, Provenientes de los nueve puntos de muestreo con el nombre local del sitio del afluente natural y de descarga de aguas residuales de tipo municipal y la localización geográfica expresada en latitud y longitud y la altitud en metros sobre el nivel del mar (msnm), muestran el valor correspondiente de temperatura y pH (NMX-AA-008-SCFI-2000), del cuerpo de agua, determinados, *in situ*. La geolocalización de estos resultados ofrece un error de ± 4 metros a nivel global con una referencia de al menos 5 satélites.

Tabla 3. Densidad poblacional de Enterobacterias por volumen de muestra y su Geoposicionamiento global.

Punto	Nombre	Latitud	Longitud	Altitud	Promedio
1	Entrada a planta de tratamiento.	19. 36941°	102.38680°	1290 msnm	1,000,000, UFC/mL
2	Salida fosa séptica	19. 36924°	102.28692°	1295 msnm	100,000 UFC/mL
3	La paz	19. 36941°	102.38680°	1296 msnm	1,000,0000 UFC/mL
4	Privada constitución (atrás del panteón)	19. 35429°	102.29149°	1303 msnm	100,000 UFC/ mL
5	Centro	19. 35234°	102.28312°	1327 msnm	1,000,000 UFC/mL
6	Guadalajarita	19. 35003°	102.27490°	1349 msnm	10,000 UFC/mL
7	Rio Itzicuaro (planta)	19. 34816°	102.25818°	1434 msnm	1,000 UFC/mL
8	La planta zona baja.	19. 34809°	102.25819°	1437 msnm	1,000 UFC/mL
9	La planta	19. 34763°	102.25758°	1460 msnm	Negativo

Los resultados de la **Tabla 3**, Carga Total de Coliformes Fecales provenientes de los nueve puntos de muestreo con el nombre local del sitio del cuerpo de agua natural y de descarga de aguas residuales de tipo municipal y la localización geográfica expresada en latitud y longitud y la altitud en metros sobre el nivel del mar (msnm), en cada punto el valor expresando en Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C) es el resultado por triplicado de la dilución correspondiente y el resultado total por unidad de volumen de agua, estos resultados ofrecen un error de ± 4 metros a nivel global con una referencia de al menos 5 satélites.

Tabla 4. Tipo de agua según la densidad de microorganismos coliformes fecales por volumen de muestra y su Geoposicionamiento global.

Punto	Nombre	Latitud	Longitud	Altitud	Tipo de agua según la carga microbiana	Promedio
1	Entrada a planta de tratamiento.	19. 36941°	102.38680°	1290 msnm	Tipo IV	1,000,000, UFC/mL
2	Salida fosa séptica	19. 36924°	102.28692°	1295 msnm	Tipo III	100,000 UFC/mL
3	La paz	19. 36941°	102.38680°	1296 msnm	Tipo IV	1,000,000 UFC/mL
4	Privada constitución (atrás del panteón)	19. 35429°	102.29149°	1303 msnm	Tipo IV	100,000 UFC/ mL
5	Centro	19. 35234°	102.28312°	1327 msnm	Tipo IV	1,000,000 UFC/mL
6	Guadalajarita	19. 35003°	102.27490°	1349 msnm	Tipo III	100,000 UFC/mL
7	Rio Itzicuaru (planta)	19. 34816°	102.25818°	1434 msnm	Tipo III	10,000 UFC/mL
8	La planta zona baja.	19. 34809°	102.25819°	1437 msnm	Tipo III	10,000 UFC/mL
9	La planta	19. 34763°	102.25758°	1460 msnm	Tipo I	1,000 UFC/mL

Los resultados de la **Tabla 4**, Carga Total de Coliformes provenientes de los nueve puntos de muestreo con el nombre local del sitio del cuerpo de agua natural y de descarga de aguas residuales de tipo municipal y la localización geográfica expresada en latitud y longitud y la altitud en metros sobre el nivel del mar (msnm), en cada punto el valor expresando en Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C) es el resultado por triplicado de la dilución correspondiente y el resultado de calidad en escala de I a IV conforme a la norma la NOM-CCA-033-ECOL/1993; estos resultados ofrecen un error de ± 4 metros a nivel global con una referencia de al menos 5 satélites.

12. DISCUSION

En las determinaciones de la **Tabla 2**, proveniente de los nueve puntos de muestreo se observa que la temperatura en los puntos geográficos 9, 8 y 7 se mantiene en los 17.5°C, así como el pH (Cabral, 2010, Norma Mexicana NMX-AA-008-SCFI-2000), sin variación significativa de 7.32, 7.35 y 7.40 respectivamente, lo que está en concordancia con baja carga microbiana y la posible baja actividad microbiana influida por la tasa metabólica correspondiente para estos puntos localizados a una altitud sobre el nivel del mar de los 1460 a los 1434 msnm, los asentamientos humanos son escasos y es el lugar de origen del afluente, más sin embargo, los asentamientos humanos ejercen un efecto en la carga microbiana en los puntos 7 y 8 (**Tablas 3 y 4**), no así en la calidad del agua, la cual está en conformidad con las normas Oficiales Mexicanas NOM-CCA-033-ECOL/1993 y NOM-127-SSA1-1994; no así para los puntos 6 a 1 en donde se muestra el flujo acuífero, en sentido descendente de los 1349 a los 1290 msnm, que es donde se concentra la mayor densidad poblacional humana, más no donde se encuentra la mayor actividad de contaminación, en el municipio de los Los Reyes, por ejemplo se obtuvo un valor de 1×10^6 UFC/mL para los puntos 5, 3 y 1, **Tablas 3 y 4**, respectivamente, que es donde se obtienen los valores más altos de Temperatura desde los 21.5° hasta 22.5°C, por ejemplo el punto 5 de la **Tabla 2**, es donde se encuentra el Centro de la ciudad, es uno de los puntos geográficos con una mayor contaminación debido a enterobacterias en donde se encuentran valores no conformes a las normas NOM-CCA-033-ECOL/1993 y NOM-127-SSA1-1994, por lo que este punto es un punto crítico de riesgo potencial de

contaminación, para el afluyente utilizado para riego de cultivos del genero *Rubusspp.* y de efecto en la calidad e inocuidad de los frutos frescos de este cultivo extensivo. Los puntos 4 y 2 de las **Tablas 3 y 4**, muestran la carga microbiana expresada en UFC/mL de los cuales se observa que solo el punto 4 es un asentamiento humano regular en donde su efecto sobre la carga de enterobacterias es considerable y permite clasificar el agua calidad de tipo III conforme a la NOM-CCA-033-ECOL/1993, el punto 2 de la **Tabla 3** muestra agua de calidad Tipo III (según la NOM- CCA-033-ECOL/1993) el punto 2 no corresponde a un asentamiento humano formal, sino al producto parcial del tratamiento del agua, en donde la carga microbiana 1×10^5 UFC/mL permite su uso para riego cultivo de tipo hortofrutícola como es el caso de las Zarzamoras, Arandanos y Frambuesas cultivados en los campos adyacentes a este afluyente, así mismo se observa el posible efecto en la salud humana al contabilizar hasta 1×10^5 UFC/mL de coliformes fecales en este punto de la **Tabla 4**, lo cual tiene un efecto negativo, al comprometer la inocuidad de los frutos frescos a comercializar.

De esta manera la identificación de puntos críticos de contaminación por patógenos humanos en cuerpos de agua y puntos de descarga como es el caso de las bacterias pertenecientes al grupo de enterobacterias, por metodologías como el número más probable está citado en las normas oficiales mexicanas correspondientes Oficial Mexicana NOM-CCA-033-ECOL/1993 y NOM-127-SSA1-1994, las cuales son de carácter obligatorio, más sin embargo, los cuerpos y afluentes de agua están sometidos de manera natural a variaciones en su volumen, por accidentes geográficos y a la evaporación por radiación solar así

como por la precipitación pluvial (Betancourt et al., 2000), debe considerarse también que la actividad humana tiene un efecto sobre el volumen de los cuerpos de agua y sus afluentes, por su explotación para diversos fines como es el consumo humano de agua potable y aguas de tipo recreacional (Emiliani et. al., 1999, NOM-CCA-033-ECOL/1993 y NOM-127-SSA1-1994) y su explotación en riego para el cultivo de productos hortofrutícolas en donde el agua tiene un papel determinante para el acarreo de patógenos humanos potenciales como por ejemplo levaduras del genero *Candidaspp.* (Arvanitidou, et al., 2005), y patógenos humanos entéricos como es el caso de la familia *enterobacteracea*(Meays, et. al., 2004, Briancesco, 2005, Degbey et al., 2011).

13. CONCLUSIONES

De esta manera con los resultados presentados y organizados de acuerdo a su Geoposicionamiento global y con un error de ± 4 metros se puede identificar puntos críticos y de riesgo a la salud humana y de esta manera generar mapas locales, con sitios de contaminación potenciales y reales de patógenos humanos en descargas municipales sobre cuerpos y afluentes de agua que son usados para consumo humano y riego de frutos comerciales, así la generación de este tipo de información permite a las autoridades como la Comisión Nacional de Agua y Las Jurisdicciones Sanitarias, la gestión y operación de plantas tratadoras de agua en beneficio de la salud humana.

14. PERSPECTIVAS

- Con la información recabada se esperaría poder tener mapeo de las zonas con principales puntos de riesgo.
- Establecer puntos de muestreo para tener un control de la calidad del agua.
- Transportar esta metodología en otras áreas de contaminación.
- Teniendo puntos de referencia ahora se podrá establecer el rendimiento de la planta de tratamiento de aguas residuales del ITSLR en cuanto al área biológica.
- Determinar estudios por contaminación física y química.
- Promover el estudio obtención y aplicación de pruebas rápidas para la determinación de coliformes.

15. BIBLIOGRAFIA

Degbey C, Makoutode M, Agueh V, Dramaix M, de Brouwer C. (2011). Factors associated with the quality of well water and the prevalence of waterborne diseases in the municipality of Abomey-Calavi in Benin. *Sante*. Mar 1;21(1):47-55

Chen J, Zhang L, Paoli GC, Shi C, Tu SI, Shi X. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *Int J Food Microbiol*. 2010 Feb 28;137(2-3):168-74. Epub 2010 Jan 7.

Katsou E, Malamis S, Haralambous K. Pre-treatment of industrial wastewater polluted with lead using adsorbents and ultrafiltration or microfiltration membranes. *Water Environ Res*. 2011 Apr;83(4):298-312.

McCabe EM, Burgess CM, O'Regan E, McGuinness S, Barry T, Fanning S, Duffy G. 2011. Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hlyA* gene of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. *Food Microbiol*. 2011 May;28(3):447-56. Epub 2010 Oct 27.

O'Regan E, McCabe E, Burgess C, McGuinness S, Barry T, Duffy G, Whyte P, Fanning S. 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiol*. 2008 Sep 21;8:156.

Parmar DL, Keshari AK. 2011. Sensitivity analysis of water quality for Delhi stretch of the River Yamuna, India. *Environ Monit Assess*. 2011 May 5.

Peed LA, Nietch CT, Kelty CA, Meckes M, Mooney T, Sivaganesan M, Shanks OC. 2011. Combining Land Use Information and Small Stream Sampling with PCR-

Based Methods for Better Characterization of Diffuse Sources of Human Fecal Pollution. Environ Sci Technol.

Ritter L, Solomon K, Sibley P, Hall K, Keen P, Mattu G, Linton B. 2002. Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. Toxicol Environ Health A. 2002 Jan 11;65(1):1-142.

Meays CL, Broersma K, Nordin R, Mazumder A. (2004). Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. J Environ Manage. 2004 Oct;73(1):71-9.

Roslev P, Bukh AS.(2011). State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water.ApplMicrobiolBiotechnol. 2011 Mar;89(5):1341-55. Epub 2011 Jan 6.

Saeedi M, Khalvati-Fahlyani A. 2011. Treatment of oily wastewater of a gas refinery by electrocoagulation using aluminum electrodes. Water Environ Res. 2011 Mar;83(3):256-64.

Shipp AM, Gentry PR, Lawrence G, Van Landingham C, Covington T, Clewell HJ, Gribben K, Crump K. 2000. Determination of a site-specific reference dose for pollution for fish-eating populations. ToxicolInd Health. 2000 Nov;16(9-10):335-438.

Tambone F, Scaglia B, Scotti S, Adani F. 2011. Effects of biodrying process on municipal solid waste properties in water. *Bioresour Technol*.

Tezcan Un U, Koparal AS, BakirOğütveren U. 2009. Hybrid processes for the treatment of cattle-slaughterhouse wastewater using aluminum and iron electrodes. *Hazard Mater*. 2009 May 30;164(2-3):580-6. Epub 2008 Aug 22

Arvanitidou M, Kanellou K, Vagiona DG. (2005). Diversity of *Salmonella* spp. and fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. *Environ Res*. 99(2):278-84.

Betancourt JL, Latorre C, Rech JA, Quade J, Rylander KA. (2000). A 22,000-Year Record of Monsoonal Precipitation from Northern Chile's Atacama Desert. *Science*. 289(5484):1542-1546.

Briancesco R. (2005). Microbial indicators and fresh water quality assessment. *Ann Ist Super Sanita*. 41(3):353-8.

Cabral JP. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health*. 7(10):3657-703.

Degbey C, Makoutode M, Agueh V, Dramaix M, de Brouwer C. (2011). Factors associated with the quality of well water and the prevalence of waterborne diseases in the municipality of Abomey-Calavi in Benin. *Sante*. Mar 1;21(1):47-55.

Emiliani F, Lajmanovich R, Acosta MA, Bonetto S. (1999). Temporal and spatial variations of coliforms and *Escherichia coli* in fluvial recreational waters (Salado River, Santa Fe, Argentina). Relationship with the quality standards. *Rev Argent Microbiol*. 31(3):142-56.

Katsou E, Malamis S, Haralambous K. Pre-treatment of industrial wastewater polluted with lead using adsorbents and ultrafiltration or microfiltration membranes. (2011).Water Environ Res. Apr;83(4):298-312.

Levett KJ, Vanderzalm JL, Page DW, Dillon PJ. 2010. Factors affecting the performance and risks to human health of on-site wastewater treatment systems. Water Sci Technol. 62(7):1499-509.

Meays CL, Broersma K, Nordin R, Mazumder A. (2004). Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. J Environ Manage.73(1):71-9.

Parmar DL, Keshari AK. (2011). Sensitivity analysis of water quality for Delhi stretch of the River Yamuna, India. Environ Monit Assess.

Saeedi M, Khalvati-Fahlyani A. (2011). Treatment of oily wastewater of a gas refinery by electrocoagulation using aluminum electrodes. Water Environ Res. 2011 Mar;83(3):256-64.

Shipp AM, Gentry PR, Lawrence G, Van Landingham C, Covington T, Clewell HJ, Gribben K, Crump K. 2000. Determination of a site-specific reference dose for pollution for fish-eating populations. Toxicol Ind Health. 2000 Nov;16(9-10):335-438.

Tambone F, Scaglia B, Scotti S, Adani F. (2011). Effects of biodrying process on municipal solid waste properties in water. Bioresour Technol.

Tezcan Un U, Koparal AS, BakirOğütveren U. (2009). Hybrid processes for the treatment of cattle-slaughterhouse wastewater using aluminum and iron electrodes. Hazard Mater. 2009 May 30;164(2-3):580-6. Epub 2008 Aug 22.

