
Patógenos emergentes como restricción para el reuso de las aguas residuales municipales tratadas de Cd. Obregón, Sonora

L. Castro-Espinoza*, P. Gortáres-Moroyoqui, I. Mondaca-Fernández, M. M. Meza-Montenegro, J.J. Balderas-Cortez, J. López-Cervantes y F. Lares-Villa

Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro, Cd. Obregón, Sonora, México C.P. 85000.

Recibido 18 Julio 2008, Revisado 3 Agosto 2008, Aceptado 6 Septiembre 2008

Emerging pathogens as restriction to the reuse of treated municipal wastewaters from Ciudad Obregon, Sonora, Mexico

Abstract

The treated wastewater is a low-cost alternative for irrigation of agricultural crops, but their use can be restricted by the microbiological quality. Municipal wastewater treatment plants (PTARM) of Cd. Obregon, deliver around $1 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ of treated wastewater, which is intended to use in agricultural irrigation mixing with water channel. This study measured the concentration of some indicators microorganisms and emerging pathogens in the municipal treated wastewater (ART) and water channel (AC) in which will be use to mix the former. It was simulated hypothetical ART-AC mixtures for getting the impact in microorganisms concentration. It was made actual ART-AC mixtures and were measured the microorganisms concentration. The results indicate high concentrations of fecal coliforms, as well as cysts of *Giardia* and *Cryptosporidium* oocysts in ART. It was also detected the presence of hepatitis A virus (HAV) in ART and ART-AC mixtures. It is recommended that ART be used in unrestricted agricultural crops without mixing with AC until knowing the cysts, oocysts and HAV viability.

Keywords: reuse, emerging pathogens, treated wastewater.

Resumen

Las aguas residuales tratadas son una alternativa de bajo costo en la irrigación de cultivos agrícolas; sin embargo, su uso puede ser restringido por la calidad microbiológica. Las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (PTARM) de Cd. Obregón generan alrededor de $1 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ de aguas residuales tratadas (ART), las cuales se pretende usar en el riego agrícola mezclándolas con agua de canal (AC). En este trabajo se midió la concentración de algunos microorganismos indicadores y patógenos emergentes, tanto en el ART como en el AC con la que se pretende mezclar. Se hicieron simulaciones de mezclas hipotéticas de ART con AC para tratar de medir el impacto de la mezcla en relación con la concentración de microorganismos. Se realizaron mezclados reales y se determinó la concentración de microorganismos. Los resultados indican altas concentraciones de coliformes fecales en el ART, así como de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium*. También se detectó la presencia del virus de la hepatitis A (HAV) en el ART y en las mezclas ART-AC. La metodología usada no permite determinar la viabilidad de los quistes y ooquistes, así como del virus detectado. Se recomienda que el ART sea usada en cultivos agrícolas no restringidos sin mezclarse con el agua de canal, hasta conocer la viabilidad de los quistes y ooquistes, así como del virus detectado.

Palabras clave: reuso, patógenos emergentes, aguas residuales tratadas.

* Autor de correspondencia

E-mail: lcastro@itson.mx; teléfono 644 4 10 09 00 extensión 2110

Introducción

La rápida urbanización incrementa los volúmenes de aguas residuales que se desechan. Estas aguas representan una alternativa de bajo costo en la irrigación convencional de cultivos; dan soporte para la sobrevivencia y genera considerable valor agregado a la agricultura en las áreas peri-urbanas a pesar de los riesgos para la salud y para el medio ambiente asociados a esta práctica (Scott *et al.*, 2002). Cuando se utilizan aguas residuales domésticas el problema por lo general es más de índole microbiológico que químico. La calidad microbiológica de las aguas residuales suele ser medida por la concentración de dos principales indicadores, los coliformes fecales y los huevos de nematodos. Sin embargo, una serie de virus y protozoarios representan riesgos adicionales para la salud. En México, la aplicación de tratamientos de aguas residuales está regulado por los reglamentos federales de la calidad del medio ambiente (Silva-Ochoa y Scott, 2002). Si bien el uso de aguas residuales en la agricultura es una práctica común, sobre todo en las inmensas zonas áridas y semiáridas del país, ésta es practicada principalmente de manera informal, con el resultado de que el tratamiento previsto para su uso en la agricultura no es común. Las juntas municipales de agua que soportan el costo del tratamiento prefieren buscar los clientes que pagan por las aguas residuales tratadas, en particular los campos de golf, espacios verdes urbanos, etc.

Blumenthal *et al.*, (2000) utilizaron tres métodos para establecer nuevas pautas de calidad microbiológica, en las aguas tratadas utilizadas en la agricultura. En los resultados destaca que la guía basada en la ausencia de indicadores fecales en el agua tratada, resultó ser innecesariamente conservadora y un instrumento costoso para la protección sanitaria pública; cuando se utilizaron métodos basados en estudios epidemiológicos o en estudios microbiológicos de transmisión de patógenos, resultaron ser más rentables que el primer acercamiento y además se protege adecuadamente la salud pública.

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales), pero son más fáciles de identificar, a costos más bajos y en menor

tiempo. Una vez que se ha evidenciado 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). En forma adicional a los patógenos que tradicionalmente se han encontrado en el agua, se han venido encontrando organismos que son causantes de enfermedades emergentes. Este tipo de enfermedades comprende aquellas cuya incidencia en los seres humanos ha aumentado en las dos últimas décadas (Weissenbecher *et al.*, 1998). El aumento de estos microorganismos está relacionado con cambios dramáticos en el ambiente y en la población. Frente a este fenómeno, surge la necesidad de incluir nuevos indicadores microbiológicos debido a que se ha encontrado que algunos microorganismos patógenos pueden ser más resistentes a cloración y otros factores de estrés ambiental. Algunos de estos indicadores son los siguientes: virus entéricos, quistes de *Giardia*, ooquistes de *Cryptosporidium* y esporas de *Clostridium perfringens*.

Actualmente Ciudad Obregón, Sonora, cuenta con dos plantas de tratamiento de las aguas residuales municipales, que en conjunto generan alrededor de $1.0 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de aguas residuales tratadas. La cantidad de ART, que se estima es de 31.5 millones de metros cúbicos anualmente, representa irrigar alrededor de 3,000 a 4,500 has por año. Lo que a su vez contribuiría al aporte de agua al Valle del Yaqui, ya que por la sequía, el agua que se les suministra de la Presa Álvaro Obregón no alcanza y limita los cultivos en la zona.

Debido a la escasez de agua en nuestra localidad se plantea reutilizar, en primera instancia, la mitad de esta cantidad ($0.5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) en actividades agrícolas mediante su descarga al canal principal bajo. El objetivo de este trabajo es conocer la calidad microbiológica del ART, la del AC, así como aquella que resulte de la mezcla del ART-AC. Antes de reutilizar el ART se quiere tener la certeza de que la calidad del agua, particularmente la microbiológica, no representará algún problema en la agricultura y sobretodo en la salud pública.

Material y Métodos

Para el presente estudio se establecieron 7 puntos de muestreo. El punto 1 se estableció en el cárcamo de bombeo de la PTARM sur de Cd. Obregón y sirvió para obtener muestras de ART. El punto 2 se localizó justo antes del punto de descarga de ART al canal principal bajo del Distrito de Riego del río Yaqui (DRRY-041). El punto 3 aproximadamente 2 km aguas abajo del punto 2, para el monitoreo de la mezcla de ART-AC. Los 4 puntos restantes fueron distribuidos en el trayecto del canal bajo hacia la costa (Fig. 1).

Determinación de la calidad microbiológica de las ART y del AC. Se hicieron 6 muestreos durante el periodo febrero-julio de 2005 para determinar la concentración y/o presencia de coliformes fecales, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, colifagos (MS-2), HAV, *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. Se hicieron simulaciones de la mezcla entre las AC y ART combinando diferentes gastos del canal con un gasto constante del efluente de la planta de tratamiento ($0.5 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$). El volumen mínimo considerado fue $0.5 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ y el máximo de $99.5 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$, abarcando de esta forma los límites de gasto que se puede manejar en el canal bajo.

Variación de la calidad microbiológica en función del tiempo y distancia, del agua transportada por el canal principal bajo. Se hicieron muestreos de cada sitio con la finalidad de conocer la variación de coliformes fecales, *E. coli* y ocasionalmente se determinó *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. y HAV. Durante el periodo del 10 de enero al 11 de julio de 2006 se hicieron otra serie de muestreos en los 7 puntos. En algunas de estas fechas el distrito de riego efectuó bombeos de ART hacia el canal principal bajo. Esto fue en 4 fechas de un total de 11 que se muestrearon. Lo anterior permitió hacer comparaciones, aunque con ciertas restricciones metodológicas, sobre la influencia de la descarga en la calidad del agua del canal. Una restricción fue que solo se realizaba bombeo en la fecha del muestreo, iniciándose éste aproximadamente a las 6 de la mañana y siendo suspendido 12 h después.

Técnicas microbiológicas empleadas

Coliformes fecales.

Como medios de cultivo se utilizaron Agar mFC (Difco, Detroit, MI), Caldo Verde Bilis Brillante 2% (BD, DifcoTM), Caldo Lactosado (BD,

DifcoTM) y Caldo EC (BD, DifcoTM) preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las técnicas utilizadas para la cuantificación fueron la de extensión en placas, filtración por membrana y número más probable (NMP) (APHA, 1998).

Clostridium perfringens.

Como medio de cultivo se usó el Agar mCP (Acumedia) preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación de *C. perfringens* se llevó a cabo por el método de filtración en membrana descrito por Bisson y Cabelli (1979), el cual consiste en poner las muestras a un baño maría por 20 minutos a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ (choque térmico), con el fin de eliminar las formas vegetativas y estimular la germinación. La muestra se filtró y se hizo pasar por membranas de $0.45 \text{ }\mu\text{m}$. Las membranas fueron colocadas en cajas de Petri con medio mCP, a su vez las cajas son transferidas a una cámara anaerobia, en la cual se incubaron por 24-48 h a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Las colonias amarillas que cambiaron a rosa-rojo después de ser expuestas a NH_4OH fueron consideradas como *C. perfringens*.

Listeria monocytogenes

Los medios utilizados fueron los siguientes: Listeria caldo base de enriquecimiento (UVM) (OXOID, CM0863), caldo base Fraser (OXOID, CM0895), agar base selectivo de *Listeria* (Oxford) (OXOID, CM0856), agar de tripticaseína de soya (TSA, DIFCO) y medio SIM (BD, BIOXON). La técnica empleada fue la descrita en APHA (1998).

Giardia y Cryptosporidium.

Las muestras se procesaron de acuerdo con el procedimiento de anticuerpos fluorescentes descrito en el ICR Microbial Laboratory Manual (Shay-Fout et al., 1996). Para la recolección de muestras de agua del canal fue necesario emplear un equipo de bombeo compuesto por mangueras, conectores, portafiltro, medidor de agua y una bomba; además de un filtro especial para parásitos. Se filtraron entre 100 y 121 litros de agua. El análisis del filtro se realizó antes de que se cumplieran 96 h de la recolección de la muestra. La prueba de inmunofluorescencia se realizó con el kit A 100FLR-20X Aqua-Glo G/C de Waterborne, Inc., New Orleans, LA.

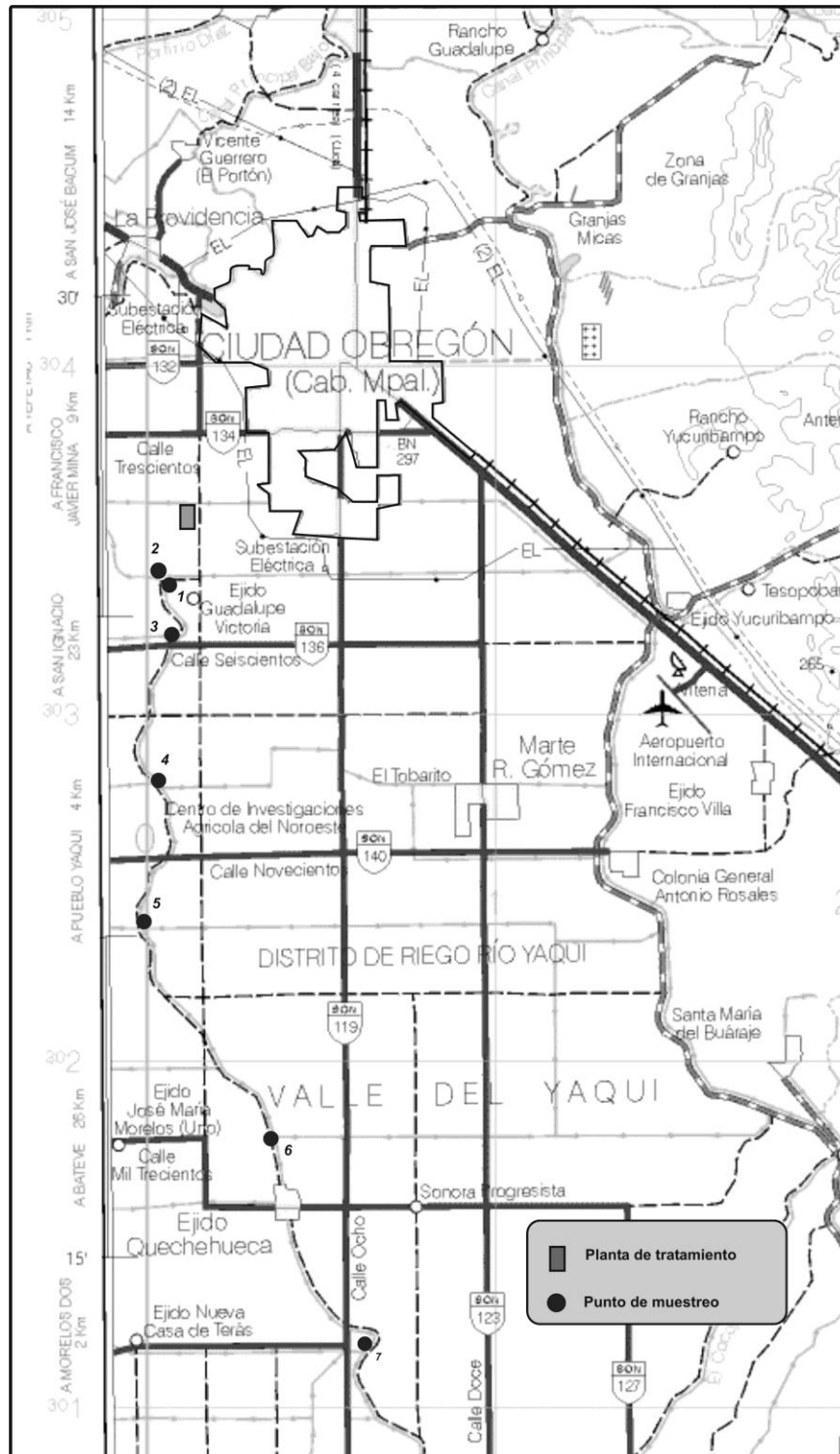


Figura 1. Localización de los puntos de muestreo.

Detección de virus de la Hepatitis A.

La recolección de la muestra se realizó colocando en serie con el filtro para parásitos un filtro para virus cargado positivamente (MDS). La elución del filtro se llevó a cabo antes de 24 h (para evitar la generación de otros microorganismos dentro del filtro). Tanto la elución como la reconcentración del virus se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Shay-Fout *et al.*, (1996).

La metodología de PCR para la detección de virus de la Hepatitis A se dividió en 3 etapas que se describen a continuación: 1) Extracción, se llevó a cabo con el kit Quiamp Viral RNA tal como lo describe el fabricante en su instructivo. 2) Reacción de la Transcriptasa Reversa, para la realización de la RT se preparó una mezcla maestra que contenía 3 μ l de buffer 5X μ l, 0.5 μ l $MgCl_2$, 1.4 μ l de DNTP, 0.5 μ l de Random Hexamers, 0.5 μ l AMVRT, 0.5 μ l inhibidor RNAsa. Por cada reacción de 50 μ l, se agregaron 10 μ l de RNA y se sometió a las siguientes condiciones de reacción: 50°C por 30 min, 95°C por 10 min. 3) Amplificación, para la realización de PCR se preparó una mezcla maestra que contenía 25.55 μ l de DH_2O , 5 μ l de Buffer 10X, 1.5 μ l de $MgCl_2$ 25mM, 0.25 μ l del upstream primer, 0.25 μ l del downstream primer, 0.5 μ l de ampli taq (2.5 u/reacción). Las condiciones de reacción fueron 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min (40 ciclos); y una extensión final de 72°C por 10 min. Electroforesis: el gel se depositó dentro de la solución buffer de corrida (TAE 1X). Se adicionaron 10 μ l de muestra (proveniente del PCR) y 5 μ l de buffer de siembra 3X (azul de bromofenol 0.1% con glicerol 15%). En un pozo adicional se colocaron 8 μ l de marcador de 100 pares de bases y 2 μ l de buffer de siembra. Se corrió el gel a 110 voltios por 45 min. Transcurrido el tiempo de corrida, se colocó el gel en una solución de bromuro de etidio al 0.01% por 5 minutos. Se lavó en agua destilada por 10 min. El gel se colocó en un transiluminador de rayos ultravioleta, para observar las bandas de ADN y determinar la presencia o ausencia del virus en las muestras.

Determinación del Colifago MS-2

La cuantificación del colifago se realizó por medio de la técnica de doble capa de agar (Shay-Fout *et al.*, 1996), la cual se describe brevemente. Se Inoculó un frasco con 25-50 ml de caldo triptocaseína de soya (TBS), con la bacteria

hospedadora, *E. coli* ATCC 15597. Se incubó el frasco inoculado, a 36°C por un intervalo de 3 a 4 horas, para que la bacteria alcanzara su fase exponencial. Para fundir el agar contenido en los tubos (TSA al 1.5 % de agar), se colocaron en un baño a 48-50 °C. Al agar se le añadió 0.5 ml de *E. coli* en fase exponencial, se agregó la muestra y se agitó (Vortex). La mezcla de agar, bacteria y muestra se pasó a las cajas con TSA para incubar a 37°C por 18-24 h. Una vez formada la monocapa de bacterias, se procedió a contar las placas formadas por los bacteriófagos en la monocapa.

Resultados y discusión

Determinación de la calidad microbiológica del efluente de la planta de tratamiento y del agua de canal antes de la descarga y sus mezclas hipotéticas.

Un concentrado de los resultados se presenta en la tabla 1. En los párrafos siguientes se presentan y discuten los resultados para cada uno de los microorganismos en estudio.

Coliformes fecales (CF)

Los datos obtenidos para CF en la salida de la planta, están muy por encima de los valores esperados, ya que se esperaba que los efluentes de la planta estén por debajo del límite de 1000 UFC/100 ml. Sin embargo, los resultados variaron entre 5.0×10^3 y 7.3×10^7 , con una media geométrica de 9.26×10^5 UFC/100 ml. Las concentraciones de CF están en el mismo orden de magnitud que las encontradas anteriormente en el agua residual sin tratar (ARST) reportadas por Gortáres *et al.*, (2003b). Por el contrario, los puntos muestreados en el canal no exceden el límite máximo permisible de CF antes mencionados; el rango estuvo ente 200 y 800 UFC/100 ml. En un principio se pensó que el exceso de CF podría ser atribuido a que los métodos implementados para depurar el agua en la planta de tratamiento eran insuficientes; sin embargo, con estudios realizados posteriormente se aclaró que la planta sí cumple con la norma ya que la concentración de CF varía durante el día; la hora a la que se obtuvieron estas muestras (10:00 a 12:00 AM) es la más crítica para el aprovechamiento del cloro aplicado ya que se evapora una porción de éste.

Como se muestra en la figura 2a, la concentración

Tabla 1. Concentración de microorganismos en los diferentes puntos de muestreo durante el 2005.

Coliformes fecales (UFC 100 ml⁻¹)	Media geométrica	Mínimo	Máximo
Punto 1	9.26E+05	5.0E+03	7.3E+07
Punto 2	447	200	800
Punto 3	567	100	15400
Punto 4	277	100	950
Punto 5	343	100	1350
Punto 6	471	100	1560
Punto 7	482	100	5000
Bacteriofago MS2 (UFP ml⁻¹)			
Punto 1	1993	690	7560
Resto de los punto no se detectó, con límite de detección de 1.6 UFP ml ⁻¹			
Listeria (solo se reporta ausencia o presencia)			
Punto 1	P		
En el resto de los puntos no se detectó			
C. perfringes (UFC l⁻¹)			
Punto 1	443	400	600
Punto 2	63	3	200
Punto 3	63	3	200
Punto 4	63	3	200
Punto 5	63	3	200
Punto 6	63	3	200
Punto 7	63	3	200
Cryptosporidium (ooquistes l⁻¹)			
Punto 1	2106	71	
Punto 2	2.83	ND	34090
Punto 7	0.25	0.1	721
Giardia (quistes l⁻¹)			
Punto 1	14624	621	102272
Punto 2	2.72	ND	288
Punto 7	0.25	ND	0.16

de CF en la mezcla hipotética de ART y ACB está muy por encima de la norma, y resulta insuficiente el gasto máximo en el canal ($99.5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) para lograr disminuir la carga de CF. La concentración a la cual se logra disminuir las CF es $1.23 \times 10^5 \text{ UFC } 100 \text{ ml}^{-1}$, que es cuando se da un gasto al canal de $99.5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ y $0.5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ del cárcamo.

Así cuando el gasto del canal sea el mínimo (es decir, de $1.0 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, donde $0.5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ serían de ART y $0.5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ del canal), se tendrá una concentración en la mezcla de $1.2 \times 10^7 \text{ UFC } 100 \text{ ml}^{-1}$. Por lo que el agua no es recomendada para consumo directo. Sin embargo, Gortarés *et al.*, (2003b) indican que al regar vegetales con agua con una concentración CF entre 2.2×10^2 y $1.7 \times 10^7 \text{ NMP } 100 \text{ ml}^{-1}$, no se encontró una diferencia significativa en la calidad microbiológica de los vegetales regados con estas aguas.

Ahora si se analiza el caso hipotético donde a la

salida de la planta se cumpliera con la norma NOM-001-SEMARNAT-1996 en cuanto a CF, y se grafica la máxima cantidad de microorganismos monitoreados en el canal ($8 \text{ UFC } \text{ ml}^{-1}$); se puede apreciar que se logra cumplir con dicha norma al momento de la mezcla y se sigue disminuyendo la concentración de CF, hasta un valor de $8 \text{ UFC } \text{ ml}^{-1}$ ($800 \text{ UFC } 100 \text{ ml}^{-1}$), que es el valor máximo que se está obteniendo en las muestras del canal sin el agua mezclada con la del cárcamo, como se observa en la figura 2b.

Colifago (MS-2)

Las concentraciones de bacteriófagos en el ART variaron entre 1.24×10^5 y $3.3 \times 10^5 \text{ UFP } 100 \text{ ml}^{-1}$, con una media geométrica de $1.7 \times 10^5 \text{ UFP } 100 \text{ ml}^{-1}$, mientras que en el agua de canal la presencia del bacteriófago fue menor al límite de detección

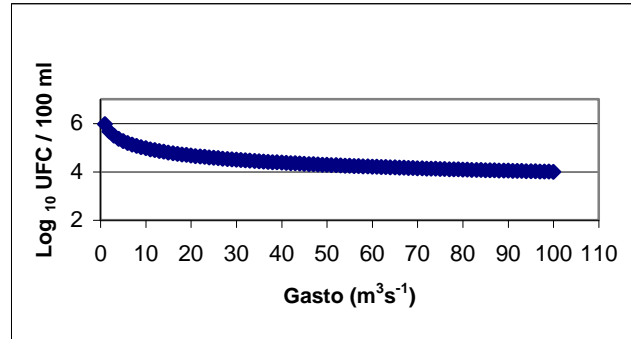


Figura 2a. Concentraciones de CF en las mezclas hipotéticas, usando la media geométrica de los valores obtenidos.

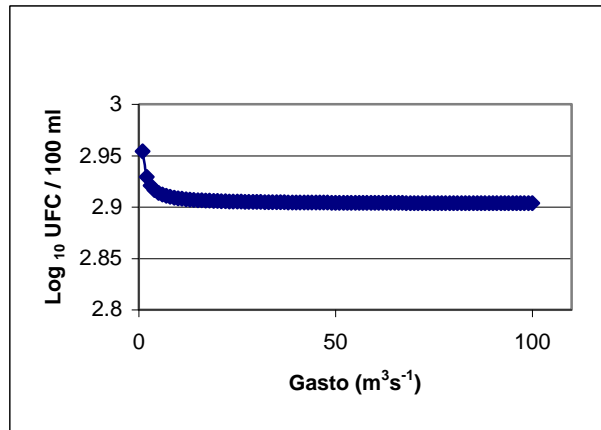


Figura 2b. Concentraciones de CF en las mezclas hipotéticas, suponiendo que la salida de ART cumple con la norma.

(1.67 UFP ml^{-1}). Se puede apreciar la diferencia de concentraciones entre el ART y el agua proveniente del canal. Gortáres *et al.*, (2003a, b) encontraron una concentración media de 1.3×10^5 UFP $100 ml^{-1}$ para el agua de la salida de la planta; para el agua de irrigación (riego), estos investigadores obtuvieron concentraciones bajas de colifagos con 10 UFP $100 ml^{-1}$.

Para el balance de masa realizado a diferentes gastos, se tomó la media geométrica de los diferentes muestreos. En la figura 3 se muestra la concentración de colifagos en las mezclas hipotéticas de las aguas. La mezcla del agua con el gasto mínimo de $1 m^3 s^{-1}$ se tiene una concentración de 8.2×10^4 UFP $100 ml^{-1}$ (log_{10} 4.917 UFP $100 ml^{-1}$) y a la máxima dilución en $100 m^3 s^{-1}$ se baja la concentración del colifagos a 826 UFP $100 ml^{-1}$ (que equivale a log_{10} 2.917 UFP $100 ml^{-1}$).

Los bacteriófagos han sido propuestos como indicadores de contaminación viral por su resistencia en los procesos de desinfección similar a la de los enterovirus. Kott *et al.* (1973) encontraron que hay cerca de un virus entérico humano por cada 1000 fagos en muestras de agua contaminada. Para nuestro caso, el equivalente sería de 8 virus entéricos en un litro, cuando se tiene un gasto de $100 m^3 s^{-1}$. Si se toma en cuenta que la mayoría de los virus como el virus de la Hepatitis A o los Rotavirus requieren de una dosis infectiva baja de 10 – 100 partículas víricas (FDA, 2005), entonces hay probabilidad de adquirir enfermedades virales al consumir directamente esta agua.

Cuevas *et al.* (2003) irrigaron vegetales con agua residual sin tratar con una concentración en el mismo orden de magnitud, que la de la mezcla de agua al mínimo gasto y no detectaron en ninguno

de los vegetales la presencia de colifagos. Lo anterior indica que si el agua es utilizada para irrigar vegetales probablemente no causaría un impacto nocivo para la salud.

Giardia

La concentración de quistes de *Giardia* en los muestreos del 2005 para el ART varió entre 621 y 20308 quistes l⁻¹, con una media geométrica de 14624 quistes l⁻¹. En el agua del canal la concentración de quistes varió desde no detectados (ND), hasta 288 quistes l⁻¹, con una media geométrica de 2.72 quistes l⁻¹ en el punto 2 y 0.25 en el punto 7. Como se puede ver, la concentración de quistes en la salida de la planta tratadora está muy por arriba de la concentración de quistes en el canal. Los resultados coinciden con otras investigaciones (Gortáres et al., 2003b) realizadas al ART de la planta sur, en donde se obtuvo una media de 12000 quistes l⁻¹, cifra similar a la obtenida en este trabajo.

La figura 4 muestra la simulación de la concentración de quistes de *Giardia*, en donde se tomó como base para graficar la máxima

concentración de quistes l⁻¹ en la salida de la planta, que fue de 20308 quistes l⁻¹ (log₁₀ 4.3076 quistes l⁻¹). A pesar del gran efecto de dilución que se da al mezclar el agua del canal bajo con la el ARMT, incluso cuando el gasto es de 100 m³s⁻¹, la concentración de quistes de *Giardia* es de 102.5 en un litro (log₁₀ 2.3053 quistes l⁻¹), nivel que sobrepasa la dosis infectiva que de acuerdo con diversos autores (Bitton, 1999; FDA, 2005) está en el intervalo de 10-100 quistes. Más si esta agua se utilizara únicamente con fines de irrigación de cultivos podría no haber problemas sanitarios, ya que en vegetales irrigados con agua residual (Gortáres et al., 2003a) que presenta una concentración mayor por un orden de magnitud que en la mezcla de las aguas con el mínimo gasto, no se encontró la presencia de *Giardia* en ninguno de los vegetales irrigados. Por otra parte los mismos autores mencionan que este bajo nivel de organismos en los vegetales se puede deber también al método usado para la elución de las muestras.

Cryptosporidium

El análisis de este microorganismo se realizó al

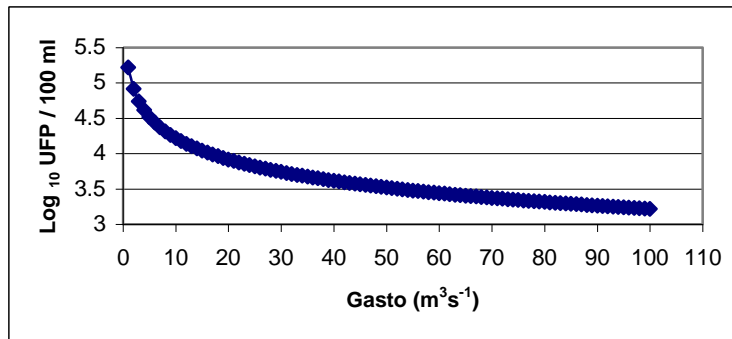


Figura 3. Concentración del colifago MS-2 en las mezclas hipotéticas.

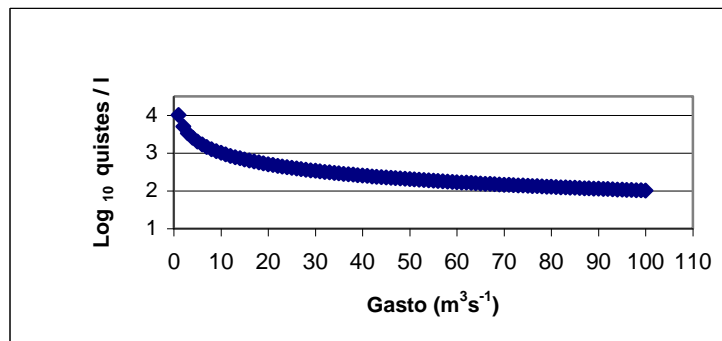


Figura 4. Concentración de *Giardia* en la mezcla hipotética con diferentes gastos.

mismo tiempo que *Giardia*. Las concentraciones muestran las fechas de muestreo, así como la concentración y su punto de muestreo. Estos resultados difieren poco con los realizados en análisis de ARST donde Gortáres *et al.* (2003b) encontraron una concentración de ooquistes l^{-1} con un orden de magnitud menor.

Tal como se muestra en la figura 5, en el gasto mínimo de $1 m^3 s^{-1}$ la concentración de ooquistes l^{-1} es de 4505, cifra muy por encima de la dosis infectiva, e incluso en la máxima dilución, que es de 47 ooquistes l^{-1} , la dosis infectiva que se considera de 1-10 ooquistes (Bitton, 1999; FDA, 2005) es rebasada.

Igual que en el caso de *Giardia*, los ooquistes de *Cryptosporidium* no fueron detectados en vegetales irrigados con agua residual cuya concentración media era de 14454 ooquistes l^{-1} (Gortáres *et al.*, 2003a), que es mayor por un orden a la de la mezcla de las aguas a $1.0 m^3 s^{-1}$. Por lo anterior la probabilidad de que *Cryptosporidium* represente un riesgo sanitario cuando el agua es usada para irrigar cultivos es mínima.

Clostridium perfringens

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para *C. perfringens*, en las distintas fechas de muestreo. Los resultados son menores a los obtenidos tanto en el agua de irrigación como en la salida de la planta, en comparación con otros estudios realizados (Gortáres *et al.*, 2003 a, b).

La mezcla de ambas aguas a diferentes gastos lleva a cabo un efecto de dilución, tal como se aprecia en la figura 6, esto es explicado porque el agua del canal contiene menor cantidad de este microorganismo. En la mezcla con $1.0 m^3 s^{-1}$, que es el caudal mínimo considerado para el canal, hay una concentración de 400 UFC l^{-1} (\log_{10} 2.602 UFC l^{-1}); la cual resulta menor a la dosis infectiva, que es de más de 1×10^8 células vegetativas, para poder contraer la enfermedad (FDA, 2005; Madigan *et al.*, 1999), por lo que incluso con el mínimo gasto, existe poco riesgo de contraer una enfermedad a causa de este microorganismo.

Considerando que el agua de la mezcla aún en su gasto mínimo está por debajo de la dosis infectiva, si ésta agua es utilizada para regar cultivos, existe

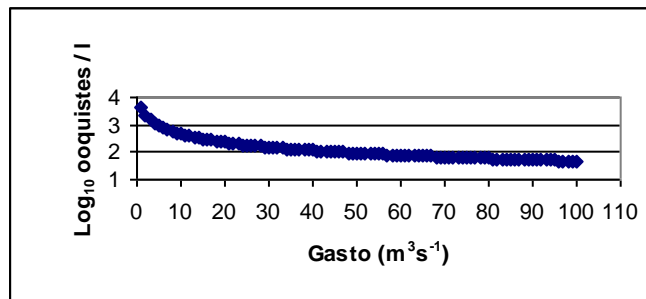


Figura 5. Concentración de *Cryptosporidium* en la mezcla, con diferentes gastos.

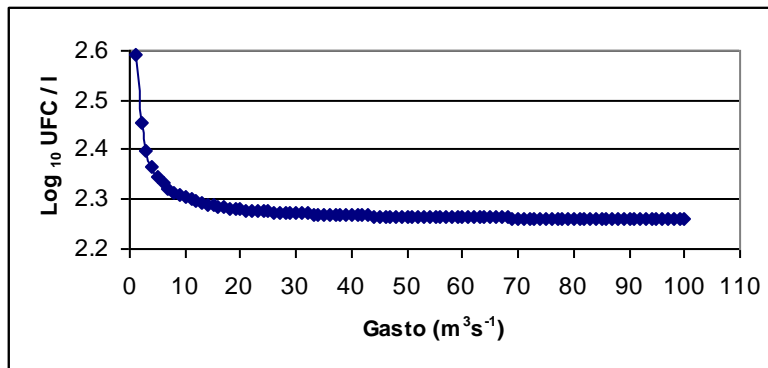


Figura 6. Concentración de *C. perfringens* en la mezcla, con diferentes gastos.

un riesgo sanitario menor, ya que el suelo actúa como un filtro. Incluso si los valores de *C. perfringens* se encontraran tres órdenes más arriba, de acuerdo con Gortáres *et al.* (2003a), no se encontraron diferencia significativa entre los vegetales irrigados con agua sin tratar a los irrigados con agua de los canales.

Listeria spp.

En la tabla 1 se aprecia que *Listeria* es un microorganismo presente en los efluentes de la planta de tratamiento sur, más no así en las aguas del canal. Sin embargo, la técnica utilizada para la detección de *Listeria* no permite cuantificar este microorganismo, solo permite determinar si está presente o ausente.

Los datos obtenidos no permiten predecir en que volúmenes será posible realizar una mezcla, pero es un parámetro importante para tener en cuenta si se quiere realizar la mezcla de las diferentes aguas. También es importante realizar una cuantificación de este microorganismo principalmente en el cárcamo ya que si se tiene un valor parecido al de la dosis mínima infectiva (10^4 células l^{-1}) no es recomendable mezclarla, y una vez obtenida la concentración poder predecir con que volúmenes lograr una disminución en la concentración de este microorganismo.

Determinación de calidad microbiológica del agua de canal bajo a lo largo de su recorrido y el impacto de las descargas de agua residual tratada.

Los resultados se presentan en la tabla 1; como referencia se ponen los resultados del punto 1, para hacer notar la diferencia de concentración de microorganismos.

Bacterias

En el caso de CF, del total de muestreos realizados, en tres ocasiones se realizó la determinación de CF por la técnica del NMP para tomar de referencia a Normas establecidas por SEMARNAT (1997) y para comparar resultados con las unidades de UFC. La Normatividad Mexicana establece máximos de 1000 y 2000 como número más probable (NMP) de CF por cada 100 ml para el promedio mensual y diario, respectivamente (NOM-001-SEMARNAT - 1996). Los resultados obtenidos para CF en las técnicas de NMP y UFC, fueron similares. Las muestras del agua residual tratada exceden a los límites máximos permisibles ya que el valor más

bajo es de 9.3×10^3 , por lo que el límite máximo es de 2000 NMP $100ml^{-1}$, como promedio diario. Cabe destacar que las concentraciones de CF en la descarga varían en el transcurso del día. Se detectan concentraciones muy diferentes durante el día, siendo las más altas antes del mediodía; sin embargo, hay otras horas del día en donde el proceso de cloración es tan eficiente que no se detectan CF en el efluente (datos no presentados, resultados de este mismo estudio).

La NOM-001-SEMARNAT-1996, no incluye a aguas de canal; sin embargo, para efectos de comparación con la norma podemos apreciar valores muy por debajo, comparados con el agua residual tratada. Por lo anterior podemos confirmar una buena calidad microbiológica y la utilización sin restricciones del agua del Canal Bajo en cultivos agrícolas. En el caso de los puntos muestreados a lo largo del Canal Bajo, sin la mezcla de ambas aguas, los datos no pasan de los límites establecidos mencionados anteriormente. Es importante mencionar que una vez realizada la mezcla, los valores del agua del Canal Bajo, aumentaron en los cuatro muestreos en los que se realizó la descarga del agua residual. Excediendo en esta forma de las 1000 UFC $100 ml^{-1}$.

Parásitos

Para que los resultados fueran más confiables se hicieron ensayos de recuperación con concentraciones conocidas de quistes y ooquistes. Los resultados de dichos ensayos de recuperación fueron de 36% para quistes de *G. lamblia* y 32% para ooquistes de *Cryptosporidium*. Estos porcentajes de recuperación son elevados comparados con los reportados por Hansen y Ongerth (1991) con eficiencias de 26.2%. Rose *et al.* (1991) reportaron eficiencias de 29 a 58%, que también son equivalentes a las reportadas por Hutton *et al.* (1995). En la tabla 2 se presentan las medias aritméticas de los resultados tanto cuando se hicieron, como cuando no se hicieron las mezclas de ART y ACB. Se detectaron quistes de *Giardia* en la totalidad de muestras analizadas y ooquistes de *Cryptosporidium* en un 76% de las muestras.

Las concentraciones de quistes y ooquistes en el punto 1 son elevadas, lo que está acorde con los reportes de Gortares *et al.* (2003a). La elevada concentración de *Giardia* y *Cryptosporidium* en ART se atribuye por una parte a que ambos

microorganismos poseen la habilidad para sobrevivir a los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales. Por otro lado los tratamientos tradicionales de desinfección de agua residual, no son efectivos para *Giardia* y *Cryptosporidium*. En México, la NOM-001-SEMARNAT-1996 no considera como indicadores microbiológicos a *Giardia* y *Cryptosporidium*, sin embargo, según la EPA (2002) una instalación de tratamiento de agua adecuadamente operada debería de ser capaz de remover e inactivar el 99.9% de quistes y 99.99 % de ooquistes. Las concentraciones mostradas en la tabla 3 sobrepasan la dosis infectiva, ya que una ingestión de 10 quistes de *Giardia* (Adam, 2001) y 30 ooquistes de *Cryptosporidium* (DuPont, 1995), puede resultar en una infección en el ser humano. Los protozoarios *Giardia* y *Cryptosporidium* son una de las preocupaciones específicas en la reutilización de aguas residuales, ya que el riesgo de la infección puede ser de 10 a 1000 veces mayor que para las bacterias al mismo nivel de exposición (Rose et al., 1991). Aunque las concentraciones encontradas en el agua residual tratada sobrepasaron las dosis infectivas, es importante

hacer énfasis en que para la que la infección se lleva a cabo, es necesario que los quistes y/o ooquistes estén viables. En los ensayos realizados, únicamente se determinó la presencia, pero no la viabilidad por lo que no se puede dictaminar el riesgo de infección.

Virus y bacteriófagos

Los análisis realizados durante el monitoreo detectaron la presencia del HAV en los puntos 1 y 3 (Tablas 4a y 4b), los cuales pertenecen al efluente de la planta tratadora de agua residual y a la mezcla del agua tratada con la del canal bajo respectivamente. Se ha comprobado (Abbaszadegan et al., 1999), que los tratamientos de aguas residuales no remueven ni inactivan en su totalidad la presencia de virus entéricos. En el punto 2 no se detectó el HAV, ni tampoco en el punto 7 (agua muy diluida). Con respecto al bacteriófago, se puede observar en ambos cuadros, que se presentó en el punto 1 con una concentración entre 600 y 1700 UFP ml⁻¹; en el punto 2 hubo concentraciones en cantidades mínimas detectables de 1.6 a 32 UFP ml⁻¹; en el punto 7 hubo desde 3.3 hasta 13 UFP ml⁻¹

Tabla 2. Concentración de CF en unidades de NMP y UFC en 100 ml de muestra.

Fecha (2006)	Coliformes fecales NMP 100ml ⁻¹		Coliformes fecales UFC 100ml ⁻¹	
	ARMT	ACB	ARMT	ACB
25 enero			9.3 x10 ³	260
13 febrero			6.8 x10 ⁴	170
*28 febrero			* < 20	5,640
*7 marzo			6.6 x10 ⁵	5,150
*14 marzo			* < 10	440
*29 marzo			1 x10 ³	2,380
18 abril			1 x10 ³	440
9 mayo	2.4 x10 ⁴	100	8.3 x10 ⁴	170
31 mayo	1.5 x10 ⁴	240	2.7 x10 ⁴	225
13 junio	9.3 x10 ³	240	4 x10 ³	115

* Fecha en la que se realizó la mezcla del ART con la ACB

* < Valor límite de detección

Tabla 3. Concentración promedio de *Giardia* y *Cryptosporidium* en monitoreos con y sin mezcla de agua ART y AC.

Punto de muestreo	Concentración de quistes <i>Giardia</i> /l	Concentración de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> l ⁻¹
	Antes de la mezcla	
1	25857.6	6817.4
2	67.7	20.3
7	32.5	37.9
	Después de la mezcla	
1	17222	3568
3	128	29.1
7	111.3	18.9

Nota: en los muestreos con mezcla, el punto 2 fue sustituido por el 3, para tener información del agua ya mezclada.

Tabla 4a. Monitoreo de HAV y MS-2 en agua sin mezclar

Punto de muestreo	Fecha de muestreo	Resultado del RT-PCR	Cuantificación del Bacteriófago MS2 (UFP ml ⁻¹)
1	10/01/2006	-	1700
1	25/01/2006	+	690
2	13/02/2006	-	< 1.6
2	28/02/2006	-	32

Tabla 4b. Monitoreo de HAV y MS-2 en agua mezclada

Punto de muestreo	Fecha de muestreo	Resultado del RT-PCR	Cuantificación del Bacteriófago MS2 (UFP ml ⁻¹)
3	14/03/2006	+	< 1.6
7	14/03/2006	-	3.3
3	29/03/2006	+	< 1.6
7	29/03/2006	-	13
3	18/04/2006	+	< 1.6

y en el punto 3 no se detectaron (límite de detección = 1.6 UFP ml⁻¹). La relación entre virus y bacteriófagos no fue posible establecerla debido a diversos factores como son la cantidad de agua muestreada, la presencia de población humana en la ubicación de algunos puntos.

Conclusiones

El AC presenta una buena calidad microbiológica ya que los microorganismos estudiados están, o bien por debajo de los límites máximos permitidos por la normatividad o por debajo de concentraciones, en el caso de patógenos emergentes, que implican un riesgo para la salud. El ART presenta altas concentraciones del organismo indicador, CF, en horas del día en que la evaporación de cloro es más alta (medio día); así como altas concentraciones de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium*. También se detectó la presencia de HAV en el ARMT, así como en muestras de mezclas de ART con AC. Tanto las simulaciones de mezclas hipotéticas, como las muestras obtenidas de las mezclas de ART con AC indican que las concentraciones de CF, quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* implican un riesgo. Se recomienda que el ART sea usada en cultivos agrícolas no restringidos, sin mezclarse con el agua de canal, hasta no conocer la viabilidad de los quistes y ooquistes, así como del virus

detectado.

Bibliografía

- Abbaszadegan M, Stewart W. P., Lechevallier M. W., Jeffery S. R., Gerba C. P., 1999. Occurrence of viruses in Ground Water in the United States. Report of investigation.
- Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews. 14: 447 – 475.
- American Public Health Association (APHA). 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 edición. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Bitton, G. 1999. Wastewater Microbiology. Second edition. Willey-Liss. New York, United States of America. pp 121-125.
- Bisson, J.W. y V.J. Cabelli, 1979. Membrane filter enumeration method for *Clostridium perfringens*. Appl. Environmental Microbiology 37:55-66.
- Blumenthal, U., Mara, D., Peasey, A., Palacios, G., Stott, R. 2000. Guidelines for the microbial quality of treated wastewater used in agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. Bulletin of the World Health Organization. 78:1104-1113.
- 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 pp.
- Cuevas Salazar R. , L. Castro Espinoza, P. Gortáres Moroyoqui, & I. Ruiz-Hernández Water Quality Impact On Fresh Vegetables: Coliphages As Microbiological Indicators 4th International Symposium on wastewater reclamation and reuse, Nov 12-14, 2003. México D.F.
- DuPont, H.L., C.L. Chappell, C.R. Sterling, P.C. Okhuysen, J.B. Rose, and W. Jakubowski. 1995. The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. The New England J. of Medicine. 332:855-859 .
- Environmental Protection Agency (EPA). 2001 Method 1623:

- Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA. <http://www.epa.gov/nerlcwww/1623ap01.pdf>
- FDA. 2005 Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. <http://www.cfsan.fda.gov>
- Gortáres Moroyoqui P., Castro Espinoza L, Naranjo J.E., Manshadi F., Gerba C. P., Karpiscak M. M., 2003a. Enteric pathogens in Raw Wastewater and Surface Irrigation Water and Its Impact on fresh Vegetables. 4th International Symposium on wastewater reclamation and reuse, Nov 12-14, 2003. México D.F.
- Gortáres Moroyoqui P., Castro Espinoza L, Torres A., Naranjo J.E., Karpiscak M. M., Gerba C. P., 2003b. Recycling Municipal Treated Wastewater for Crop Irrigation. 4th International Symposium on wastewater reclamation and reuse, Nov 12-14 2003. México D.F.
- Hansen J. y Ongerth J., 1991. Effects of time and watershed characteristic on the concentration of Cryptosporidium oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2790-2795.
- Hutton P., Ashbolt N., Vesey G., Walker J. y Ongerth J., 1995. Cryptosporidium and Giardia in the aquatic environment of Sydney Australia. En: Protozoan parasites and water (W.B. Betts, D. Casemore, C. Fricker, H. Smith, J. Watkins Eds). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra, pp 71-75.
- Kott, Y., Roze, N., Sperber, S., and Betzer N., 1973. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research.* 8:165-171.
- Madigan M, Martinko J. y Parker J., 1999. *Biología de los Microorganismos.* 8 edición. Prentice Hall. Madrid, España. pp. 260-265 y 972.
- Rose J.B., Hass C., y Regil S., 1991. Risk assessment and control of waterborne giardiasis. *Am. J. Public Health,* 81(6):709-713.
- Scott C.A., N.I. Faruqui and L. Raschid-Sally, 2002. Wastewater Use in Irrigated Agriculture: Management Challenges in Developing Countries. En *Wastewater Use in Irrigated Agricultura Coordinating the Livelihood and Environmental Realities* Edited by C.A. Scott, N.I. Faruqui, L. Raschid-Sally.
- Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. (SEMARNAP). 1997. NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. <http://portal.semarnat.gob.mx/semarnat/portal!/ut/p/kcxml>
- Shay-Fout.G., W. Frank, M. James, D. Daniel and E.S. Ronald. 1990. *ICR Microbial Laboratory Manual*, National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. United States of America.
- Silva-Ochoa, P., Scout C.A., 2002. Treatment Plant Effects on Wastewater Irrigation Benefits: Revisiting a Case Study in the Guanajuato River Basin, Mexico. En *wastewater Use in Irrigated Agricultura Coordinating the Livelihood and Environmental Realities* Edited by C.A. Scott, N.I. Faruqui, L. Raschid-Sally.
- Weissenbecher, M., Salvatella R., Hortal M., 1998. El desafío de las enfermedades emergentes y reemergentes. *Rev Med Uruguay* 14:34-48.