1999-E

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES



"DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA DETECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN AGUA PURIFICADA"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:
JUAN CARLOS LEÓN MURILLO

LAS AGUJAS ZAPOPAN, JALISCO. SEPTIEMBRE 2001



Universidad de Guadalajara

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACION DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGIA

COMITÉ DE TITULACION

C. JUAN CARLOS LEÓN MURILLO PRESENTE.

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS con el título "DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA DETECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN AGUA PURIFICADA", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el M.V.Z. JOSÉ JESÚS CASTAÑEDA SANDOVAL y como asesora la Q.F.B. JOSEFINA CASAS SOLÍS.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
"AÑO IRENE ROBLEDO GARCÍA"
Las Agujas, Zapopan, Jal., 27 de octubre del 2000

DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS ARÁMBULA SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. M.V.Z. JOSÉ JESÚS CASTAÑEDA SANDOVAL- Director del Trabajo.

c.c.p. Q.F.B. JOSEFINA CASAS SOLÍS.- Asesor

c.c.p. Expediente del alumno

MERL/ARVA/mam*

C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ PRESIDENTA DEL COMITÉ DE TITULACIÓN DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJAARA PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (a) pasante: <u>LEÓN MURILLO JUAN CARLOS</u>, con el Título <u>DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA DETECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN AGUA PURIFICADA</u>, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de examen de tesis profesional respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechando la ocasión para en jarle un cordial saludo.

A TENTAMENTE Las aguas, Zapopan, Jal., 05 de junio del 2001

Jino Cases &

A V Z JOSÉ DE PSÚS CASTAÑEDA SANI

M.V.Z. JOSÉ DE JESÚS CASTAÑEDA SANDOVAL

EL ASESOR

SINODALES:

I.-Q.F.B. JOSÉFINA CASAS SOLÍS

2.- Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA

3.- BIOL. HÉCTOR ROMERO RODRIGUEZ

SECRETARIA ACADEMICA
GENCIAS BIOLOGICAS Y ACROPECUAS
UNIVERSIDAD DE GUADALA LA

DEDICATORIA

Con todo mi amor y eterno agradecimiento a mis padres por haberme dado su apoyo constante e incondicional en mi formación personal y profesional.

A Mony por su amor y comprensión, que tanto ha tenido que ver para que haya logrado mi propósito.

A mi hijo Carlitos por su cariño que ha sido motivo de inspiración en mis obligaciones, quehaceres y metas propuestas.

A Gaby por enseñarme a enfrentar la vida por muy pesada que esta nos parezca.

A la Sra. Teresa Leyva por darme palabras de aliento y apoyo incondicional.

A mis hermanos por el apoyo y afecto que me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y permitirme lograr una de mis metas.

A mi alma mater la Universidad de Guadalajara por darme la oportunidad de estudiar.

A mi Director de tesis, M.V.Z. José de Jesús Castañeda Sandoval por su valiosa amistad, confianza y por haber otorgado todo lo necesario para la realización de la misma.

A mi asesor Q.F.B. Josefina Casas Solís por su gran ayuda, tiempo y enseñanzas que he recibido de su parte, para mi formación profesional.

A los maestros sinodales a quienes generosamente opinaron y perfeccionaron con su experiencia y conocimientos esta investigación.

A él Dr. Homero Ango Aguilar de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Perú, por haberme proporcionado medios invaluables para la realización en mi proyecto de tesis.

A él Dr. Eduardo Vázquez Valls por sus conocimientos impartidos dentro y fuera del aula.

INDICE

		Páginas
RES	SUMEN	1
1	INTRODUCCION	
H	ANTECEDENTES	
	Historia de los bacteriófagos Características de los bacteriófagos Clasificación de los bacteriófagos Replicación de los bacteriófagos. Ciclo litico productivo Ciclo lisogénico o reductivo Aplicación de los bacteriófagos Virus presentes en agua Eliminación de virus en agua Calidad virológica del agua Cuantificación de virus Determinación de placas de lisis Eficiencia de Plaqueo Métodos para concentración de virus en agua Bacterias presentes en el agua Bacterias entéricas indicadoras NOM – 041 – SSA –1-1993	4 5 6 7 9 10 11 14 16 17 18 19 20 24 24 26
111	JUSTIFICACION	27
IV	HIPOTESIS	27
٧	OBJETIVOS:	
	Objetivo GeneralObjetivos Particulares	28 28

Vi	RECURSOS	29	
VII	MATERIAL -	29	
VIII Prep	METODOLOGIA: paración de medios Diagrama de Flujo	30 32	
	Limpieza y cuidados en el manejo de las muestras Análisis virológico:	33	
Prep	ctivación de la cepa E.coli XLB1 paración de los cultivos bacterianos Pretratamiento de las muestras de agua Detección de bacteriófagos en las muestras de agua Control positivo - isis bacteriólogico: Coliformes totales Coliformes termotolerantes (fecales) Recuento de mesófilos	34 34 35 35 37 39 40 40	
IX	RESULTADOS	41	
X	DISCUSIONES	47	
Χì	CONCLUSIONES	49	
ΥII	RIRI IOGRAFÍA	51	

-

RESUMEN

El agua constituye aproximadamente las dos terceras partes del peso total del organismo y es uno de los principales componentes del cuerpo, tanto desde el punto de vista anatómico como funcional; fisiológicamente hablando es necesaria para la supervivencia humana, siempre y cuando exista un equilibrio entre su ingestión y pérdida. El agua interviene en la digestión, absorción, circulación y excreción; asimismo, actúa como medio de transporte para los nutrientes y para todas las sustancias en el organismo, además ayuda a mantener el balance de los electrólitos.

El agua generalmente llega al consumidor a través de tuberías luego de un estricto tratamiento de potabilización; sin embargo, el crecimiento demográfico ha obligado a que cada casa o unidad habitacional se tengan instaladas cisternas, sistemas de bombeo o tanques elevados de almacenamiento que requieren de un lavado periódico y minucioso, así como de un mantenimiento sanitario que mantenga limpio el líquido.

Por tal motivo, y paralelamente a la aparición de un mayor número de casos de enfermedades gastrointestinales en nuestra población; debe de ser cada vez más limpia la purificación, comercialización y consumo de las aguas envasadas.

Las empresas envasadoras someten al agua a diferentes procesos para poder cumplir con los requisitos que exige la norma oficial mexicana, los cuales tienen diferentes métodos de

filtración y purificación. El aumento en la demanda del líquido ha provocado la aparición de purificadoras improvisadas que carecen de instalaciones adecuadas para tratar el agua y que no cumplen con la Norma Oficial, presentando microorganismos patógenos, los cuales provocan daños graves a nuestra salud.

Comúnmente la calidad microbiologica en nuestro país se establece mediante el analisís bacteriológico, sin embargo, estas pruebas no descartan la presencia de virus, por lo que se hace necesaria su detección, ya que estos son causantes de la hepatitis, poliomielitis y enfermedades entéricas entre algunas.

Por esta razón, la finalidad de este trabajo de investigación fue estandarizar técnica para detección de bacteriófagos en agua purificada y llevar a cabo su análisis bacteriológico; se analizaron por triplicado 12 marcas de aguas comercializadas en la Zona Metropolitana de Guadalajara.

Las muestras de agua fueron tomadas de forma aleatoria y sin preferencia de marca comercial. La razón de este trabajo de investigación es conocer la calidad virológica del agua que bebemos.

La técnica original propuesta por la American Public Health Association (APHA) al Dr. Homero Ango Aguilar para la detección de bacteriófagos en aguas potables y residuales; de la cual se desarrolló nuestra técnica a nuestras condiciones de trabajo.

INTRODUCCION

Los virus entéricos al igual que las bacterias coliformes, pueden ser transportados de desechos humanos hasta el agua y casi todas las especies bacterianas, son capaces de hospedar una especie o más de virus conocidos como bacteriófagos, en el caso de *Escherichia coli* se denominan colifagos.

La multiplicación de los virus es a expensas de bacterias jóvenes en fase de reproducción activa, ocasionando disolución o lisis de la membrana que al romperse libera a las partículas virales al medio extracelular. No todas las infecciones virales terminan rápidamente en lisis, sino que puede establecerse entre el virus y la bacteria hospedera el fenómeno de lisogenia caracterizandose por que el ácido núcleico del virus se incorpora al material genético de la bacteria transmitiéndose a generaciones posteriores de la misma y actúan como vector hasta que se encuentren las condiciones necesarias para que el virus se exprese, provocando finalmente lisis celular (Cuninham 1979).

Aprovechando esté fenómeno lítico es posible cuantificar la presencia del virus bacteriófago en una muestra de agua; enfrentando a estos a un cultivo puro de *Escherichia coli*, cada bacteriófago es capaz de formar en placas de agar zonas claras (no crecimiento celular), llamadas unidades formadoras de placas (UFP) siendo así cuantificadas y reportadas (Ango y Cols. 1996)

Para evaluar la calidad bacteriológica nos basamos en la Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA 1 –1993 vigente y publicada el viernes 24 de marzo de 1995 en el Diario Oficial de la Federación.

ANTECEDENTES

Historia de los bacteriófagos.

La denominación de bacteriófagos es debido a Félix D' Herelle, quien en el año de 1917 demostró que los filtrados de heces, libres de bacterias, procedentes de enfermos con shigelosis, eran capaces de lisar cultivos de Shigella.

Reportan que otros bacteriólogos, entre ellos Twort (1915), ya habían realizado antes observaciones análogas (Alvarado, A. 1999)

En la década de los cuarenta, se produjeron dos acontecimientos que renovaron el ímpetu y enfoque de la biología de los fagos. En primer lugar el desarrollo del microscopio electrónico proporcionaba la posibilidad de que las partículas fágicas se observaran claramente, confirmando así su naturaleza particular, su diversidad y tamaño. En segundo lugar, mientras que los primeros investigadores habían trabajado en forma aislada diversos fagos, en los Estados Unidos un grupo de científicos concentraron sus esfuerzos en un grupo particular de fagos de *Escherichia coli*, concretamente los llamados fagos T (Douglas, J. 1988).

Kostenbader y Cliver en 1973 propusieron pruebas para enterovirus formadores de placas. Dichas técnicas parece que son útiles en situaciones en las que persisten los virus contaminantes aún cuando los análisis para los indicadores bacterianos comunes den resultados negativos. (Douglas, J. 1988).

Torella y Morita en 1979 hallaron más de 10,000 bacteriófagos libres por mililitro de agua, en la Bahía de Yaquina de la costa de Oregon (USA). En aguas similares habrá cantidades análogas de fagos, encontrándose distribuidos en aguas de mar como en las continentales, se ha demostrado que son patógenos para el humano. Existen virus diversos en las aguas continentales y marinas, pero no se establece ninguna diferencia entre las formas marinas y las de agua dulce (Rheinheimer, G. 1987).

Procedentes de aguas residuales y heces humanas se han reportado más de cien tipos diferentes de virus, una persona infectada podría expulsar más de 1,000,000 de partículas infecciosas de virus por gramo de heces. Pueden estar latentes estas partículas infecciosas durante meses en el agua, el suelo, los mariscos y bacterias; además resisten a procesos de purificación del agua. (Junkin, M. 1988).

Características de los bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan a bacterias, entidades biológicas más pequeñas y sencillas que se conocen capaces de autoreplicarse, es decir, hacer copias de sí mismas y solamente pueden reproducirse en el interior de las bacterias.

Los fagos constan de una masa central de ácido nucleico encerrada en una cubierta protectora de proteínas, llamada cápside. Y está formada por subunidades denominadas cápsomeros, no

poseen enzimas para la producción de energía ni ribosomas para la replicación independiente.

La morfología de los bacteriófagos es de dos formas estructurales: con simetría cúbica o simetría helicoidal; los fagos cúbicos son generalmente sólidos regulares, o específicamente, poliedros, icosaedros, los fagos helicoidales son alargados. Los fagos tienen la característica de poseer distintos tipos de ácidos nucleicos (ADN o ARN) en cadena simple o doble. (Granados, P.1996)

Clasificación de los bacteriófagos

- 1. Fagos de simetría binaria, ADN bicatenario y cola contráctil (fago T- par, fago T- 2).
- Fagos de simetría binaria, ADN bicatenario y cola no retráctil (fago de Escherichia coli).
- Fagos icosaédricos sin cola de ADN monocatenario (fago-X 174).
- 4. Fagos sin cola de ARN monocatenario (colifago f2).
- Fagos filamentosos de ADN monocatenario (fago de Escherichia coli).

(Granados, P.1996)

Replicación de los bacteriófagos.

Ciclo lítico productivo.

Fagos T.

Adsorción o adherencia: Proceso de fijación de la partícula vírica sobre la superficie de las bacterias, en el cual Intervienen:

- Receptores de la pared bacteriana (específicos para cada fago).
- Placa terminal o basal del fago, que contacta con el sitio receptor.
- Cofactores de adsorción: iones de calcio y magnesio, etc.
- La adsorción depende de la concentración de las bacterias del medio.

Penetración o inyección: Una lisozima del fago disminuye en un punto la rigidez de la pared, haciendo una microperforación. Después se contrae la vaina o cubierta helicoidal y penetra el canal central en el citoplasma bacteriano, impulsando el paso del ácido nucleico al interior.

Multiplicación: fase de eclipse. Primero se interrumpe el metabolismo bacteriano y se inducen enzimas que van a dirigir la síntesis fágica. El ADN bacteriano es desintegrado por una ADNasa inducida por el ADN fágico, la sintesis del nuevo DNA y proteínas

son por cuenta del ARN ribosómico y de transferencia de la bacteria infectada. (Granados, P.1996)

Multiplicación: fase de maduración. Las móleculas de ADN sintetizado se incorporan a las proteínas estructurales, y aparecen partículas víricas completas.

Liberación: Una lisozima fágica produce la lisis de la pared bacteriana y se liberan los fagos del interior, que son capaces de infectar otras bacterias.

Fagos ADN monocatenarios

La replicación tiene lugar mediante la síntesis previa de otro ADN complementario, gracias a una ADN polimerasa bacteriana. Estos virus parecen no alterar el metabolismo bacteriano.

Fagos ARN

Sólo se fijan en los pili sexuales de la bacteria. El filamento de ARN lleva información para tres proteínas: la proteína A (de ensamblaje), la proteína de cápside y una replicasa. El ARN actúa con una doble función como:

- a) ARN mensajero, utilizando los elementos de la bacteria realiza la síntesis de las tres proteínas.
- b) Matriz sobre la que opera la ARN replicasa. Dará lugar a un gran número de ARN de los futuros fagos. (Granados, P.1996)

Características para que se dé el ciclo lítico

- a) Que el fago sea virulento.
- b) Existencia de receptores en los pili o en la pared bacteríana.
- c) Que la bacteria se encuentre en fase de multiplicación.

Ciclo lisogénico o reductivo.

Se origina con virus atemperados, cuyo DNA es siempre bicatenario y puede integrarse en el cromosoma de la bacteria bajo una forma letal potencial, que es el *profago*. El DNA fágico también tiene la posibilidad de no integrarse y quedar libre en el citoplasma bacteriano como un fago vegetativo, a modo de un plasmido.

En este ciclo se comprueban las siguientes etapas:

Adsorción (igual que en ciclo lítico).

Penetración (igual que en el ciclo lítico)

Integración: Requiere de la recirculación de la mólecula viral.

Características del ciclo lisogénico

- a) Necesidad de infección por un fago atenuado o atemperado.
- b) Integración en el cromosoma bacteriano del DNA fágico, con su transmisión a la descendencia.
- c) La bacteria lisogenizada es inmune a los fagos homólogos.
- d) La aparición de fagos libres en un cultivo de bacterias puede ser incrementada por un proceso de inducción.
- e) La lisogenia, su mantenimiento y la inmunidad que impone están ligados a una proteína represora codificada por el DNA vírico.

- f) La integración de un profago puede dar a la bacteria caracteres que antes no tenía: conversión.
- g) Los fagos pueden intervenir en los fenómenos de transferencia genética: **transducción**. (Granados, P. 1996)

Inmunidad: La bacteria lisógenica es inmune a la infección por el fago homólogo al profago que ella aloja debido a que éste sintetiza continuamente un represor específico que reprime la expresión de las funciones víricas.

Lisis espontánea Si se interrumpe la síntesis del represor, el profago es separado del cromosoma de la bacteria y se inicia un ciclo lítico que conduce a la lisis de la célula huésped (Granados, P. 1996).

Aplicación de los bacteriófagos

Los estudios sobre la interacción bacteria-bacteriófago son útiles para el conocimiento de las relaciones huésped-parásito, en infecciones en vegetales, animales y para conocer la contaminación por patógenos víricos en el agua y los alimentos.

El modelo bacteria-bacteriófago es útil en investigación genética por que el bacteriófago contiene un mínimo de material genético, pués es haploide, es decir, tiene cromosoma sin emparejar, puede cultivarse y observarse cambios raros (en genoma) en una gran población.

Son útiles para la detección e identificación de bacterias patógenas, además se usan los fagos para conocer la dosis de

radiación; conociendo la susceptibilidad de los bacteriófagos a la radiación e incorporándolos a los materiales que se van a irradiar, se puede calcular la dosis de radiación a partir del grado de destrucción del bacteriófago. Esto proporciona una medida directa de la eficacia biológica de un tratamiento con radiaciones (Granados, P. 1996).

Virus presentes en el agua.

Son producidos en grandes cantidades por individuos infectados y son excretados en las heces. Generalmente pasan a través de la planta de tratamiento de aguas residuales sin afectarse en lo mínimo y así se encontrarán en las aguas superficiales. La infección tiene lugar cuando un virus es ingerido en alimentos o agua contaminada. Los virus pasan a través del estómago y generalmente infectan células del canal digestivo inferior. Estos desprenden gran número de partículas virales, se ha reportado hasta 10,000,000 partículas virales por gramo de heces, y pueden continuar desprendiéndose durante un largo tiempo; por ejemplo, el período de excreción medio para la poliomielitis es de más de 50 días (Gray, N.1996).

Los virus de la hepatitis, enterovirus, retovirus y adenovirus, se ha reportado que todos son transmitidos vía el agua. En Gran Bretaña fue de gran preocupación el virus tipo A es propagado por la contaminación fecal en los alimentos, aguas potables y las que se utilizan para ducha, estas epidemias se han asociado a estos orígenes, otro foco de infección son las piscinas y áreas de costa

utilizadas para el baño que reciben grandes cantidades de aguas residuales.

Los virus no son fácil de cultivar in vitro de modo que limita los estudios de epidemias. Las epidemias de hepatitis A, generalmente suceden con un patrón cíclico dentro de la comunidad, infectan la población no queda susceptible a posteriores infecciones de virus, por lo tanto, no se producen nuevos casos de cinco a diez años hasta que hay una nueva generación (generalmente de niños) que no ha sido previamente expuesta.

No hay tratamiento para la hepatitis A, la profilaxis es una buena higiene personal, la adecuada protección y tratamiento del agua. Los síntomas de esta enfermedad aparecen de 15 a 45 días después de la exposición e incluyen náuseas vómitos, dolor muscular e ictericia. Este virus cuenta con el 87% de todas las enfermedades virales transmitidas por el agua en USA (Craun, F.1986).

Enterovirus, virus de la poliomielitis, coxsackievirus y ecovirus, todos producen infecciones respiratorias y están presentes en las heces fecales de las personas infectadas. En Gran Bretaña debido a los programas de vacunación en las comunidades es común encontrar el virus de la poliomielitis en las aguas residuales, (por los desechos humanos) no indicando una actual infección. Se piensa que el reovirus está asociado a la gastroenteritis mientras que el adenovirus 3 está asociado con las piscinas y origina fiebre faringoconjuntivitis.

Los animales homotermos parecen ser capaces de portar virus patógenos para los humanos. Por ejemplo, el 10% de los perros sabuesos mostraron que son portadores de virus entéricos humanos.

Por lo cual, aparece un peligro de infección por agua de lluvia contaminada especialmente por heces en zonas pavimentadas. La mayoría de los virus permanecen viables en el agua a bajas temperaturas durante varias semanas. Se han encontrado virus en suministros de aguas superficiales y subterráneas.

En USA se encontraron que el 20% de los pozos y perforaciones están contaminados con virus. Dos virus que han originado recientes epidemias de enfermedades debido a la contaminación del agua potable son el virus Norwalk y el rotavirus (Craun, F. 1991; Cubitt, W. 1991)

El virus Norwalk es de particular preocupación para la industria del agua que parece que no se ve afectado con los niveles normales de cloración originando diarreas severas y vómitos. Se sabe que la infección por este tipo de virus sólo da lugar a una tolerancia a corto plazo, mientras que la inmunidad de por vida está otorgada por la mayoría de los otros virus entéricos. En 1986 alrededor de 7,000 personas que permanecieron en una estación de esquí en Escocia fueron infectadas con un virus del tipo Norwalk se observó que el abastecedor privado no trataba el agua y además provenía de una corriente sujeta a la contaminación de un pozo séptico.

El rotavirus es el mayor causante diarréico ocasionando la muerte de alrededor de seis millones de niños cada año en los países en desarrollo. Sin embargo en Europa no representa un problema debido a una mejor higiene, nutrición y cuidados médicos. Las epidemias ocurren ocasionalmente en hospitales y asociado con la diarrea infantil, puede ser mucho muy serio si lo contrae un adulto (Gerba, P. and Rose, B. 1990).

Eliminación de virus en agua.

Al igual que las bacterias, los virus también se reducen significativamente cuando el agua está almacenada. Por ejemplo, el número de virus en el río Támesis decrece de entre 12 y 49 UFP /litro después del almacenamiento. Resultados similares se han reportado en el virus de la poliomielitis del agua del río Lee, los investigadores encontraron una reducción en un 99.8 % en menos de 15 días a 15-16 °C comparado con las nueve semanas para una reducción similar a 5-6 °C. Para una óptima eliminación de todos los microorganismos de origen fecal, 10 días de retención en los estanques deberían lograr una reducción de entre el 75% y 99% sin tener en cuenta la temperatura.

La coagulación utilizando alumbre alcanza del 95 al 99% de eliminación de todos los virus, siendo otros coagulantes como cloruro de hierro y sulfato de hierro no tan eficientes. La utilización de polieletrólitos como coadyudantes de la coagulación no mejora la eliminación de virus como con las bacterias, la filtración rápida sobre arena no es muy efectiva en eliminación virus a no ser que el agua haya sido coagulada previa a la filtración. La filtración lenta sobre arena es efectiva en eliminar la mayoría de las partículas virales en el agua, con porcentajes de eliminación entre 97 y 99.8% (Rohlich, A. 1977; and Sobsey, D. 1979). Sin embargo, siempre hay alguna contaminación cuantificable que queda en el agua y por eso se requiere la desinfección posterior a la filtración (Logsdon, S. 1990).

El carbón activo puede eliminar virus; éstos son adsorbidos en él por atracciones electrostáticas entre los grupos amino cargados positivamente en el virus y los grupos carboxilicos negativamente en la superficie del carbón; la eficacia de eliminación es muy variable dependiendo del pH (la máxima eliminación ocurre a pH 4.5), la concentración de compuestos orgánicos en el agua y el tiempo durante el cual el filtro ha estado funcionando. Son comunes porcentajes de eliminación del 70 al 85% (Gray, F. 1994).

El ablandamiento por cal-sosa se emplea en algunas plantas para remover calcio, el magnesio o ambos. Se ha informado que la precipitación de calcio en un pH de aproximadamente 10 produce alrededor de un 75% de remoción de virus, principalmente atrapándolos en el precipitado, en forma similar a la coagulación y sedimentación. Cuando el proceso de cal sobrante se usa para precipitar magnesio, normalmente el pH se eleva por encima de 11. En estas condiciones, los virus no sólo son removidos por el flóculo, si no que son inactivados por el pH. Se ha observado que este proceso produce una remoción superior al 90% (Slade, S. 1978).

La desinfección química parece ser el método más confiable para inactivar a los virus presentes en el agua; el tratamiento mediante otros procesos previos a la desinfección sirve principalmente para reducir la carga de virus en este proceso y además para lograr la eficiencia en la remoción de la materia que puedan interferir en la eliminación del virus (Junkin, M. 1988).

La mayoría de los virus entéricos son más resistentes al cloro que las bacterias coliformes. Análisis hechos a muestras se observó en el caso de coliformes y otras bacterias el ácido hipocloroso parece indicar que es el desinfectante más eficiente, debiendo mantenerse la dosis de cloro y pH que aseguren la existencia de un residuo. Sobsey concluyo que: " es probable que se puedan obtener reducciones de virus entéricos en más del 99.9% en aguas relativamente limpias" (Sobsey, D. 1979).

Calidad virológica del agua.

El conocimiento con el que se cuenta para evaluar la calidad virológica del agua y la efectividad del tratamiento con respecto a los virus es mucho menor con respecto a las bacterias patógenas. El problema radica en el inadecuado conocimiento sobre la cantidad de virus que debe ingerir para que se produzca la enfermedad (Junkin, M. 1988).

La OMS recomienda que el agua de consumo humano se encuentre exenta de virus infecciosos que dañen su salud. Esto se logra: primero utilizando una fuente que no esté contaminada; segundo, tratando apropiadamente la fuente contaminada con microorganismos (Reiff, F. 1995).

Cuando se cuenta con los recursos necesarios para efectuar los análisis virológicos, es conveniente examinar la fuente de agua natural y la sometida a tratamiento de purificación para detectar la posible presencia de virus (Reiff, F. 1995).

Cuantificación de virus.

Para comprender la naturaleza de los virus y su replicación se necesita cuantificar el número de partículas víricas. Los viriones son demasiado pequeños para ser observados por el microscopio ordinario. Estos son vistos por el microscopio electrónico, pero tal instrumento es demasiado costoso para ser usado en forma rutinaria en estas investigaciones.

En general los virus se cuantifican midiendo sus efectos sobre las células que infectan. Resulta común hablar de una *unidad infectiva vírica*, que es la unidad más pequeña que causa efecto detectable en un hospedador susceptible; determinando el número de unidades infectivas en el volumen de un líquido se obtiene una estimación de la cantidad del virus (Madigan and cols.1999).

Determinación de placas de lisis

Cuando una partícula vírica inicia una infección sobre una monocapa de células que están creciendo por extensión de una superficie, puede ocurrir la aparición de una zona de lisis o de inhibición del crecimiento que origina un área clara sobre la monocapa de las células en crecimiento, a este efecto se le denomina una placa de lisis o calva, y se supone que cada una se origina por el proceso de replicación iniciado por un virión.

Las calvas son "agujeros" sobre el fondo continuo formados por el crecimiento confluente de las células. Con virus bacterianos, se pueden obtener calvas cuando se mezclan partículas viríricas y bacterias hospedadoras, en agar vertiendo la mezcla en una fina capa, depositando sobre la superficie de un medio sólido (agar nutritivo). Durante la incubación del cultivo la bacteria crece y forma una capa opaca visible a simple vista, donde se inicie una infección por el virus ocurrirá la lisis célular, a esta zona de lisis se le denomina para su cuantificación como Unidad Formadora de Placa (UFP).

Este procedimiento también permite el aislamiento de cepas víricas puras, ya que si una calva la origina un virión aislado, todos los viriones en una calva determinada serán probablemente idénticos desde el punto de vista genético. Se pueden tomar algunos viriones de una calva para inocularlos en un cultivo bacteriano nuevo, al fin de obtener una línea pura de virus.

El desarrollo de la técnica del ensayo de la formación de calvas fue tan importante para el avance de la virología como lo fue el establecimiento de los cultivos sólidos por Koch para el avance de la bacteriología.

Se pueden obtener calvas producidas por virus animales utilizando como hospedadores sistemas de cultivos de células animales. Sobre una placa Petri o una botella plana se prepara una monocapa de células animales en cultivo y se añade encima la suspensión vírica, las calvas aparecerán luego como zonas de destrucción de las células animales (Madigan y cols. 1999)

Eficiencia de plaqueo

Un concepto importante en virología cuantitativa es la idea de la eficiencia de plaqueo, refiriéndose a la capacidad de lograr el efecto necesario para que se formen el número de placas que representa el grado de virulencia real con el que se ataca al cultivo celular. La cuantificación de las placas de lisis es siempre menor que la que resulta de determinar los virus por microscopía electrónica. La eficiencia con la que los viriones infectan células raramente alcanza el 100% y a menudo es considerablemente mucho más baja. Esto no significa que los viriones que no hayan causado infección sean inactivos, aunque en ocasiones pueda ser el caso. El hecho puede reflejar simplemente, que bajo las condiciones usadas no ha ocurrido una infección efectiva con tales partículas. Aunque la eficacia de plaqueo con virus bacterianos suelen superar el 50%, con algunos virus animales puede ser tan baja como el 0.1 o el 1% no se sabe

muy bien por qué las partículas víricas varían en infectividad. En determinados casos es posible que las condiciones usadas para la cuantificación no sean las óptimas. Como es técnicamente difícil contar viriones mediante un microscopio electrónico, resulta también complicado determinar la eficacia real de plaqueo, pero el concepto es importante tanto en investigación básica como en la práctica médica. Debido a que la eficacia de plaqueo raramente se acerca al 100%, cuando para cuantificar virus se usa el método placas de lisis, es más exacto expresar la concentración de la suspensión vírica (llamada el título) como el número de unidades formadoras de placas y no como un número absoluto de unidades de viriones. (Madigan y cols. 1999)

Métodos para la concentración de virus en agua.

A) Método de Gauze Pad: fue uno de las primeras técnicas usadas para detectar virus presentes en el agua; es una modificación de la técnica empleada por Moore para recobrar bacterias del agua. En este se usan unas almohadillas o cojinetes (pad) que son llenadas por algodón o esponjas de plástico, son colocadas en el agua por períodos, usualmente de uno a varios días. Durante ese tiempo los virus son adsorbidos o atrapados por el cojinete de la corriente del arroyo, antes son tratados primero para formar la concentración de virus, con hidróxido de sodio diluido, para incrementar el pH del cojinete a 8.0, esto facilita la elución del virus del cojinete. El líquido atrapado en el cojinete es

- analizado para conocer si existe presencia de partículas virales. Este método no es cuantitativo, pero es de gran ayuda para aislar virus en aguas naturales y residuales. (Gordan, K.1992)
- B) Método de incorporación de la muestra: En esta técnica el medio de cultivo convencional debe ser concentrado para permitir la incorporación de la muestra a ensayar de un volumen de 10 a 60 ml. en un cultivo celular con crecimiento previo, cuando requiere el cambio del medio de crecimiento por el de mantenimiento (a este último se le adiciona la muestra de agua sin bacterias) se supone que la presencia de la misma ocurre una inoculación por el posible virus presente en ella, provocando entonces lisis celular la cual nos permite cuantificar. (Gordan, K. 1992)
- C) Ultracentrífugación: Es muy usada para la concentración de pequeñas partículas suspendidas en los líquidos. La ultracentrífugación es del orden de 60 000 gravedades por hora, primero la muestra se, centrífuga a una velocidad baja para reducir el número de partículas grandes incluyendo a las bacterias. El sobrenadante es usado para ultracentrífugarlo, el sedimento obtenido de este, es el que contiene los virus y se le resuspende en un pequeño volumen de medio de cultivo. (Gordan, K. 1992)

- D) Membrana filtro adsorción: esta técnica es basada en el fenómeno de adsorción de los virus sobre la matriz de los filtros del tipo Gellman o Millipore siendo el poro de estos de 10 a 20 veces mas largo que los virus (logrando pasar), se le adiciona a la muestra Mg Cl2 incrementándose la adsorción y se pasa por la membrana filtradora, los virus son eludidos posteriormente de la membrana con gelatina /suero, o con lauril sodio sulfato, este método recobra entre un 50 80 % de enterovirus. (Gordan, K. 1992)
- E) Ultrafiltros solubles: El agua para analizar es pasada por un filtro soluble, donde los virus son concentrados, el filtro es entonces disuelto con un solvente y la suspensión contiene el virus el cual se inocula al cultivo celular. Se usan filtros de gel con alginato de aluminio y una solución de citrato de sodio al 3.8 % como solvente. (Gordan, K. 1992)
- F) Hidroextracción: una muestra de agua es colocada en una dialisis de celulosa donde es sumergido un agente hidrófilico (poliethylen glicol) el agua es entonces absorbida de una fase con un alto peso molécular, es ahí donde se encuentran los virus. (Gordan, K. 1992)

- G) Método de separación de fases: Es basado en el descubrimiento de Albertsson en el que dos sistemas de fases en solución acuosa hechas de dos polimeros como dextran sulfato y polithylenglicol; la separación de las partículas depende de su tamaño logrando diferentes gradientes por lo tanto en un sitio de esa solución se logra un botón de partículas virales. (Gordan, K. 1992)
- H) Electroforesis: Los virus son usualmente cargados negativamente hasta neutro en valores de pH y pueden entonces moverse en dirección al cátodo (+) cuando una suspensión de virus es colocada en campo eléctrico. Este principio fue usado por Bier para concentrar bacteriófagos en agua. (Gordan, K. 1992)
- Adsorción a partículas: Los virus posiblemente adsorbidos del agua sobre una variedad de partículas son eludidos de un pequeño volumen de líquido, esto involucra el uso de precipitados de sales inorgánicas como fosfato de calcio, cobalto clorado, hidróxido de aluminio y sulfato de amonio o el uso de polieléctrolitos insolubles. Primero son adicionados a la muestra de agua para que las partículas virales se adsorban en las paredes de las móleculas y después sean separadas por centrifugación o filtración (Gordan, K. 1992)

Bacterias presentes en el agua.

Las bacterias son el grupo más importante en cuanto a frecuencia de detección en el agua potable y en epidemias de enfermedades registradas. Las enfermedades más importantes están asociadas comúnmente con la contaminación fecal del agua. Por ejemplo, en regiones templadas estas incluyen Salmonella (tifoidea y paratifoidea), Campylobacter, Shigella (disentería bacteriana), vibrio cholerae, Escherichia coli y Mycobacterium tuberculosis (Gray, F.1996).

Bacterias entéricas indicadoras.

Escherichia coli, los coliformes (grupo coli-aerogenes) y las Enterobacteriaceae son comúnmente usados como indicadores de contaminación de origen fecal en el agua y los alimentos; hay otros grupos de microorganismos indicadores como los enterococos, que algunos autores proponen, y los grupos que no tienen origen entérico, representa una desventaja para emplearlos como indicadores de contaminación (estafilococos y mesófilos aerobios, anaerobios o esporulados) (Moreno y cols. 1992).

Escherichia coli es un germen cuyo hábitat natural es el tracto entérico del hombre y de los animales. Por ello la presencia de este microorganismo en los alimentos y el agua indica, generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal. E. coli es el

indicador clásico de la presencia de patógenos entéricos en: el agua, los moluscos, productos lácteos y en otros alimentos.

La enumeración de *E.coli* en el agua constituye una medida de la cuantía de contaminación, mientras que los niveles detectados en los alimentos pueden estar influenciados por otros factores, como la multiplicación del microorganismo, su muerte, inactivación o su adherencia a las partículas del alimento. Con todo, cifras sustanciales de este enteropatógeno en un alimento o en el agua sugieren una falta general de limpieza en el manejo del mismo y un almacenamiento inadecuado, aunque en algunas ocasiones su presencia no constituye una connotación directa de que sea un patógeno sino que implica únicamente un cierto riesgo por la presencia de dicho patógeno. En otras palabras, la presencia de *E.coli* en los alimentos y el agua no guarda siempre una estrecha correlación con la presencia de *salmonella* u otros microorganismos patógenos.

Coliformes habitualmente este termino comprende *E. coli* y diversas especies pertenecientes a otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, surgió como un intento de encontrar métodos rápidos y fiables para establecer la presencia de *E. coli* y variantes estrechamente relacionados sin necesidad de purificar los cultivos obtenidos en las pruebas para coliformes o de aplicar las relativamente costosas.

Mesófilos aerobios Las bacterias que crecen en placa de agar a 30-37°C, pueden ser generalmente consideradas por algunos autores como organismos indicadores, aunque representan una medida mucho menos precisa y fiable del peligro de intoxicación por

el consumo de agua. Los recuentos elevados en mesófilos aerobios, por ejemplo en productos crudos o no tratados, a menudo están constituidos por la microflora normal o quizás indican una alteración incipiente del alimento y no un peligro potencial para la salud del consumidor; en el agua indican que el manejo fue inadecuado, por esa razón no son tomados en cuenta en los parámetros de salubridad del agua (Moreno, B. 1992).

Parámetros microbiológicos del agua purificada comercial según la NOM – 041- SSA 1-1993.

Límite Máximo	
Mesofílicos aerobios UFC/ml.	100
Coliformes Totales * NMP/100 ml.	No detectable, o cero en UFC
Coliformes fecales **UFC/100 ml.	Cero
Vibrio cholera***	Negativo

^{*} Técnica de número más probable

^{**} Método de filtración de membrana

^{***} Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo establecerá los casos en los que se habrá de determinar la presencia de este agente biológico (en México).

JUSTIFICACIÓN

Entre las enfermedades transmitidas por el agua, el grupo de las diarreicas es la causa principal de la morbilidad y mortandad infantil en los países en vías de desarrollo, existen también otras enfermedades en donde el agua tiene un papel muy importante en la transmisión y son ocasionadas por los virus: hepatitis A, el tipo Norwalk de la gastroenteritis, los rotavirus y el de la poliomielitis.

Debido a la alta incidencia de enfermedades transmitidas por el agua contaminada y por qué se conoce que los virus son resistentes algunos procesos de purificación del agua y por que además en México no existe una técnica para diagnosticar virus bacteriófagos en agua purificada, por lo que es necesario realizar una investigación respecto a las posibilidades de elaboración de una metodología que nos permita detectar bacteriófagos de forma rápida y que sea específica, con un costo accesible para el pronóstico verídico y así la prevención oportuna de infecciones gastrointestinales ocasionadas por virus hospederos de *Escherichia coli* presentes en agua.

HIPÓTESIS

Si hay presencia de coliformes fecales entonces es posible detectar bacteriófagos en dicha muestra.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar técnica para detección de virus bacteriófagos en volumen de agua empleado para el análisis bacteriológico según la Norma Oficial Mexicana (NOM-041-SSA-1-1993)

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Estandarizar técnica para detección de bacteriófagos a nuestras condiciones de trabajo bajo la modificación del Dr Homero Ango Aguilar y utilizarla en doce marcas de agua comercializadas en la Zona Metropolitana de Guadalajara
- 1.2 Determinar mesófilos aerobios, coliformes fecales y totales de esas mismas muestras, de acuerdo a la citada norma.
- 1.3 Correlacionar los resultados obtenidos de los coliformes fecales de cada una de las muestras en función de la presencia de bacteriófagos.

RECURSOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

MATERIAL

Medios: endo, cuenta estándar, nutritivo, Mac Conkey, triple azúcar hierro, lisina hierro, agar y caldo soya tripticasa, (Marca Bioxon o Merck). Luria-Bertani sólido (LB) y en líquido (LBD), SOB y diluyente de fagos.

Equipo de filtración Millipore

Agua bidestilada estéril

Cultivos puros de Escherichia coli XLBI

Bacteriófagos Gem-3 vector de clonación comercial de Promega.

Muestras comerciales de agua purificada (presentación 1.5 y 19 litros)

METODOLOGIA

PREPARACIÓN DE MEDIOS:

Los medios de cultivo y soluciones para bacterias empleados en la detección de bacteriófagos, se esterilizan por autoclave durante 15 minutos a 121°c, 15 libras de presión.

Para preparar un litro:

Medio -Luria Bertani (LB)	
Bacto Triptona (Difco) ó Peptona de Caseína	10g
(Bioxon Cat. 153)	
NaCl	5g
Extracto de levadura (Bioxon)	5g
Para Placas se agrega Bactoagar (Difco) ó Agar	15g/Lt
bacteriologico (Bioxón Cat. 150-1)	

Bacterial Strains (SOB)	
Bacto Triptona (Difco) ó Peptona de Caseína	20g
(Bioxon Cat. 153)	
NaCl	0.5g
Extracto de levadura (Bioxon)	5g

(Maniatis y cols. 1989)

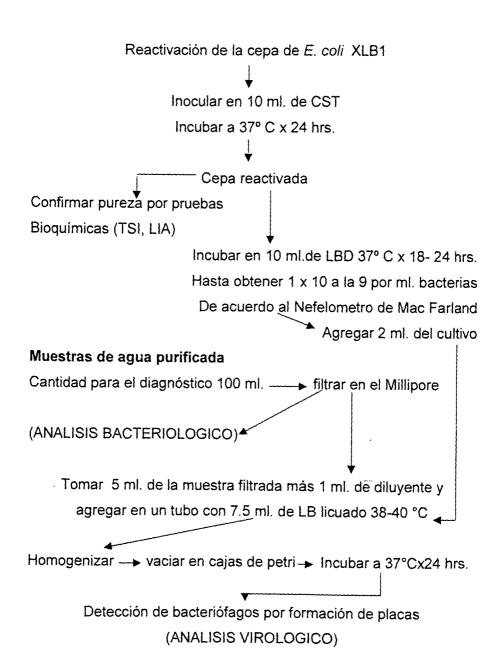
Medio LBD

Este medio LBD se prepara similarmente que el medio SOB, pero con la adición de maltosa (0.2% final) (1 ml de una solución al 20% por cada 100ml de medio) y MgSO4 (10 mM final) (1 ml de una solución 1M por cada 100 ml de medio), los cuales son posteriormente esterilizados.

Diluyente de Fagos	
NaCl	5.8g
MgSO4.7H2O	2g
1M Tris-HCl pH 7.5	50ml
2% gelatina (Agar)	5ml
H2O cbp 1 litro	

(Maniatis y cols. 1989)

DIAGRAMA DE FLUJO



Limpieza y cuidados en el manejo de las muestras.

El manejo adecuado de las muestras que se analizaron fue con estricta limpieza, para lograr esto se desinfectó la campana de flujo laminar con solución de hipoclorito de sodio al 20% con ayuda de una gasa para ese fin, posteriormente se desinfectaba con una solución de alcohol al 70 % de igual forma se limpiaron los envases de las muestras en su exterior, para más seguridad en un área completamente estéril, (bajo mechero y campana de flujo laminar). cabe mencionar que los materiales, medios de cultivo, equipo, etc. todo fue debidamente esterilizado por autoclave 121°C por 15 minutos y se usó sin que se perdiera la esterilidad, de tal forma que no se presentará riesgo alguno y se reflejara en los resultados; también uno de los cuidados primordiales es el de la bioseguridad personal, va que los microorganismos son altamente infectivos, para esto se usó un recipiente de litro conteniendo 500 ml. de una solución concentrada de hipoclorito de sodio, para depositar el instrumental y la cristalería contaminada para su posterior esterilización.

ANALISIS VIROLOGICO

Reactivación de la cepa Escherichia coli XLB1

Se inoculo la cepa bacteriana XLB1 en 10 ml. de caldo soya tripticasa (CST), manteniendo las debidas condiciones de asepsia y bioseguridad, luego fue incubada a 37 grados centígrados por 24 horas. Después se verificó el crecimiento y la pureza de la cepa, sembrándose una asada, por agotamiento en superficie sólida en Agar Mac Conkey (MC) y confirmada bioquímicamente por siembra en los medios diferenciales triple Azúcar Hierro (TSI) y Agar Hierro y Lisina (LIA).

Preparación de los cultivos bacterianos.

A partir de la cepa reactivada y para lograr la concentración 1X10 a la 9 bacterias por mililitro, determinada por comparación con el nefelómetro de Mac Farland, se inoculó 1 ml del cultivo de la cepa XLB1 previamente cultivada a 2 tubos con 10 ml. de LBD (medio líquido), después se procedió agitar los tubos completamente herméticos por cada hora hasta cumplirse la concentración deseada, para el posterior procesamiento de muestras.

Pretratamiento de las muestras de agua

Las muestras de agua purificada, antes de su procesamiento fueron filtradas utilizando el equipo de filtración básico (embudo, bomba de vacío, matraz kitasato estéril) y una membrana filtrante de 0.45 um (Millipore), con la finalidad de eliminar la carga microbiana acompañante y obtener del filtrado los posibles colifagos presentes; el volumen que se utilizó para el filtrado fue de 100 ml.

Detección de bacteriófagos en las muestras de agua.

Para este fin se tomaron 5 ml. de cada muestra (por triplicado) de agua purificada comercial, previa filtración (procedentes de diferentes lotes de elaboración según fabricante).

Se preparó 5 tubos con 7.5 ml de medio sólido LB licuado a baño maría a temperatura de 38-40 °C y a tres de estos tubos se les agregó los 5 ml. de agua previamente filtrada, a los dos tubos restantes se les adicionó únicamente agua desmineralizada estéril y filtrada, usándo uno como control positivo, (en donde esperamos tener presencia de calvas por inoculación del fago) el cual nos indica que el procedimiento fue el correcto y el otro como control negativo (sin inoculación de fagos) en donde no esperamos la formación de calvas sino únicamente el cultivo puro y uniforme de *E. coli* sin espacios entre colonias, esto nos sugiere que no se presentó contaminación alguna. (ver figuras 2-6)

A los cinco tubos se les agregó 2 ml. del cultivo XLB1 preparados a la concentración antes mencionada, además se les coloca 1 ml. de diluyente de fagos como factor de adherencia entre los posibles bacteriófagos y las membranas bacterianas, excepto al control positivo por que el fago al ser inoculado se encuentra disuelto en diluyente de fagos a 500 UFP por ml. (la forma de inoculación puede ser por salpicadura o por incorporación directamente del fago comercial en la placa).

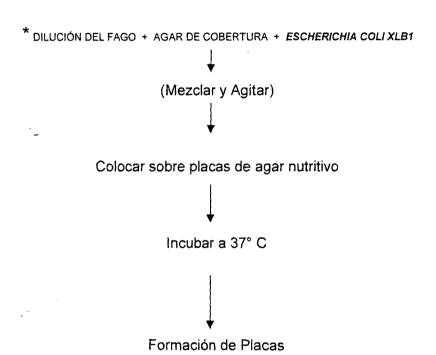
La mezcla de las muestras o con el agua desmineralizada (en el caso de los controles), con el medio (LB) y el diluyente de fagos; se agitan los cinco tubos que contienen las muestras y se vierten por separado en cajas de petrí que presentan en su fondo Agar Nutritivo, éste sirve como base para que el crecimiento de la cepa de *E. coli* XLB1 sea uniforme y homogéneo permitiendo así observar la formación de placas.

Es importante hacer notar que en el momento del vertido se tiene que rotar manualmente la caja de petri para uniformar el espesor del agar LB y no se presentarán burbujas en la superficie, ya que es ahí donde se presentan las UFP.

Se incubo el cultivo por 24 horas a 37 °C, por seguridad se realizó una segunda observación a las 48 horas.

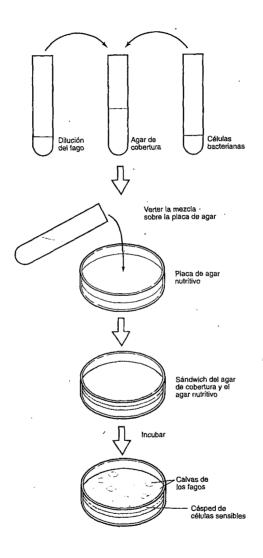
La aparición de UFP se identifican como zonas claras, translúcidas a simple vista a contra luz dejando un área brillante en la superficie del medio por falta de crecimiento bacteriano (ver figura 2 y 4). Este procedimiento se aplicó de igual manera para las doce marcas de agua purificada.

CONTROL POSITIVO



^{*} NOTA: Para el control negativo se usa agua estéril en lugar de la dilución del fago .

CONTROL POSITIVO



Tomado de: Biología de los Microorganismos (Madigan, M. T. 1999)

ANALISIS BACTERIOLOGICO

La técnica que se empleo fue por Filtración de membrana, citada Norma de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Dependiendo de la muestra se realizaron diluciones 1/10 sobretodo en aquellas que se presentó crecimiento bacteriano confluente, utilizando como diluyente agua grado reactivo (estéril). Para este análisis se utilizó el equipo de filtración Millipore, que consistió en hacer pasar por medio de vacío, la muestra de agua a través de la membrana de celulosa de 0.45 um, Millipore el volumen utilizado para cada filtración fue de 100 ml. y con la ayuda de una pinza se retiró la membrana de la unidad de filtración y se colocó, en una placa petri preparada con el medio adecuado; con la cuadrícula hacia arriba y evitando formar bolsas de aire, se incubó por 24 horas a 37 °C, en posición invertida.

Coliformes totales:

Se procedió con la misma técnica de filtro de membrana, pero con la diferencia que se siembra en un medio Endo, se incubaron a 37 °C por 24 horas, cuantificándose las colonias de un color rojo, con brillo metálico y reportándose el número de UFC de coliformes totales /100ml.

Coliformes Termotolerantes: (Fecales)

Se procedió de la misma manera que para coliformes totales, pero a diferencia de la temperatura de inoculación a 44.5 °C por 24 horas, cuantificando las colonias de brillo metálico iridiscente verdoso, y reportando como número de UFC de coliformes fecales /100 ml.

Para la identificación de *Escherichia coli*, las colonias características, fueron transplantadas a los medios diferenciales de TSI y LIA e incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas, realizándose luego la lectura respectiva (pruebas Bioquímicas).

Recuento de Mesófilos:

Luego de procesada la muestra, el filtro de membrana se colocó en una placa petri conteniendo agar cuenta estándar estéril y se incubó a 37°C por 24 horas en posición invertida y se cuantificó todas las colonias existentes; reportándose como número de UFC de mesófilos / 100 ml.

RESULTADOS

_		A(GU	Α				A(GÜ	4 F	IEL	,		A(GU/	4				A	GU.	A				A(GU/	4				A(GU/	4						
PRESENTACION		DI ROMA														SANTORINI						PALADIUM							SANTA MARIA						OSMOVITA					
15	DE LITROS		M	UE	ST	RA		M	MUESTRA						MUESTRA							MUESTRA							MUESTRA							MUESTRA				
I	E			Uŀ				UFC						UFC							UFC							UFC							UFC					
z	DE	No	.1	No	.2	No	.3	No	.1	No.2		No.3		No.1		No	No.2		No.3		No.1		No.2		No.3		.1	No	.2	No	No.3		No.1		No.2		.3			
18	<u>δ.</u>	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48			
Ŭ	-	Н	Н	Н	H	Н	H	Н	II	Н	H	H	Н	H	H	H	H	Н	Н	H	H	H	H	Н	H	H	Н	H	H R	H	H	H	H	H	H	H	H			
14		R S.	R	R S	S	R	S	R	R S	R	R	R	R S	R S	R	R	R S	R S	R S	R	R	R	S	R	R	R S	R	R	S	R	R	R	R	R	R S	R	S			
COL	IFORMES		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
FI	ECALES																																Ì	l						
-	ICOBMCC	_	_	_	-	<u> </u>	<u>_</u>		_	_		-	0	0	0	0	0	-	2	0	ò	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
ι -	IFORMES OTALES	U	0	0	0	0	0	0	0	0	U	0	U	١٥	V	U	١٥	2	2	U	١٥	10	ľ	10	١	١	١٧	U	10	١٠	١٧	١٥	10	0	٠ ا	١٧	10			
	SOFILOS	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	9	2	5	3	3	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	2	2			
			ĺ								Ì									7	7	3	8	4	4							2	2	2	2	2	2			
		L		Ĺ	L_												<u> </u>			2	2	0	0	5	5						L	0	0	7	7					
	LIFAGOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
EN	UFP							1							[ļ							ļ															
No.	DE LOTE	S/I	<u>ا</u>	S/I	N N	S/I	N N	110	500	110	500	110	500	121	J	135	;	135		1	500	1	500		500	S/I	1	S/N	1	S/I	4	S/ì	Ý	S/I	1	S/I	Ŋ			
								/10:		/10		/10:		W5		V2		V2		/20			:39		:39			L_	000	1000		-		_		<u> </u>				
1	CHA DE	S/I	7	S/I	F	S/I	F	110	501	110	1501	110	501	300	1401	140)501	180	501	010	601	010	0601	010	1090	220	900	220	900	220	922	S/I	-	S/I	•	S/I	F			
CVI	DUCIDAD			1				L		ļ				L		L		<u></u>		<u>. </u>				ــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ		ــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ		Ь				<u>. </u>		L		Ь				

NOTA: Es importante leer el recuento de UFC en tabla, de arriba hacia abajo en cantidades completas, (Por ejemplo en la muestra Osmovita las cantidades son: 120, 127 y 22 en mesófilos).

RESULTADOS

									~					г	~					T :												T									
		AGUA CIEL						A($3U_{2}$	4				AGUA							GU.	A S	Al	4		AGUA							GU/	ζ.	1						
PRESENTACION								PUREZA AGA							ARCO IRIS							VC.	ISC	O		MONTE AZUL															
1 %	S		N/I	IE	CT	RA																MUESTRA							MUESTRA							MUESTRA					
18	2		IVI			IVA																																			
\vdash	DE LITROS			UF				<u> </u>		UF				UFC							UFC						UFC						UFC								
	1	No	. 1	No	.2_	No	.3	No	No.1		.2	No.3		No	. 1	No	.2	No.3		No	.1	No.2		No.3		No	.1	No	.2	No	.3	No.1		No.2		No	.3				
133	61	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48				
ľШ́		H	H	Н	14	H	H	H	H	11	11	H	11	H	H	H	13	11	Н	H	H	Н	H	H	H	H	Н	H	H	11	11	H	H	Н	Н	H	H				
ľκ		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R				
		S.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S				
	IFORMES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
FE	ECALES		İ	ł	i		i	ł	Ì	ł	ĺ		l	ĺ	ł	1	ĺ	ļ		ł				ĺ		ļ			ĺ	1			İ			1	ł				
001	IFORMES	_	 _ -	_	-	-	-	-	-	_		-				-	-		-		-	-	 	-	-	-	_	_	<u> </u>	-	-	 -	 	1	-	1	+				
	IFORMES OTALES	0	0	Į0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 1				
, ,	JIALES				ĺ	!	ĺ	1	ĺ		1		!	ĺ			ì	1	1				1		1]		1				1								
ME	SOFILOS	9	9	5	5	-	1	9	9	7	7	6	6	7	7	1	1	8	8	3	3	3	3	6	6	3	3	2	2	4	4	2	2	3	3	2	2				
IVIE	3011103	-	1.7	_	Ī	1.	1.	1 "	1	1 1	1'		T	l ′	1'	1	1		1 -	3	3	-	1	0	0	3	3	12	12	4	14	2	2	1 -	1	ì	14				
}		3	3	4	14	1	11	8	8	6	6	9	9	4	4	/	/	2	2	1	1	8	8	2	2	12	3	1	1/	1	1	12	2	3	3	4	14				
ì			1		ł	0	0	1	1			1	[4	4	0	0	0	0	2	21	0	0	0	0	7	7	4	4	0	0	1	1	6	6	8	8				
L		_	ļ			L	L	Ĺ		<u>L</u>			l					<u> </u>						1	Ĺ	0	0	0	0	0	0	_	<u>L</u> _	J	_	_					
CO	LIFAGOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
E	N UFP		1		1	1			ļ	1	l		ĺ	1					Į	1			1	1	[}				{			1			1					
			<u> </u>		<u>L</u>	<u></u>	L	L_	<u> </u>		Ĺ		<u> </u>		<u> </u>		L		L_				L_		<u>L</u>	<u> </u>		<u> </u>	<u>L</u>		L			_		_					
No.	DE LOTE	750		705		705		E04		E04		E04		050		050		050		S/	Ν	S/I	Ν	S/I	Ν	S/I	V] S/1	V	S/N	V	S/I	Ν	S/I	N	S/	N				
		/20:	:47	/20	:47	/20	:47	194	04	106	87	102	38	342	303	131	197	131	212	ļ																1					
FE	CHA DE	070	900	070	900	070	900	200	600	200	600	200	600	300	900	300	900	300	900	S/		S/1		S/I		S/I	7	S/I		S/I	7	S/I		S/I		S/					
1	DUCIDAD	0,0	7.70	1			,,,,,	[-00	.,	~~	(,,,,,	1-00		300	, 00	1.00	,,,,	1500	,,,,,	3/	Г	3/1	ľ	3/1	r.	3/1	•	3/1		3/1	·	3/1	Г	3"	r .	31	.]				

NOTA: Es importante leer el recuento de UFC en tabla de arriba hacia abajo.

RESULTADOS DE BACTERIOFAGOS EN CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS

MARCAS DE AGUA						
		COL	IFAG	OS E	N UFF)
	No	0.1	No	o.2	No	0.3
	CON	TROL	CON	TROL	CON	ΓROL
	+	-	+	-	+	_
AGUA DI ROMA	43	0	43	0	43	0
AGUA FIEL 1.5 LITROS	6	0	6	0	6	0
AGUA SANTORINI 1.5 LITROS	83	0	83	0	83	0
AGUA PALADIUM 1.5 LITROS	7	0	7	0	7	0
AGUA SANTA MARIA 1.5 LITROS	26	0	26	0	26	0
AGUA OSMOVITA 1.5 LITROS	68	0	68	0	68	0
AGUA PUREZA AGA 19 LITROS	103	0	103	0	103	0
AGUA ARCO IRIS 19 LITROS	9	0	9	0	9	0
AGUA SAN FRANCISCO 19 LITROS	6	0	6	0	6	0
AGUA MONTE AZUL 19 LITROS	10	0	10	0	10	0
AGUA MAX 19 LITROS	20	0	20	0	20	0
AGUA CIEL 19 LITROS	7	0	7	0	7	0

1	+ POSITIVO
Γ.	NEGATIVO

MUESTRAS DE PLACAS

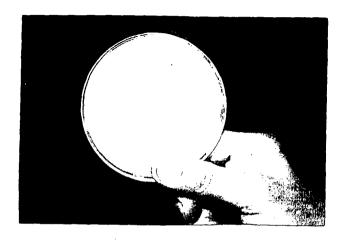


FIGURA – 1 CONTROL NEGATIVO SIN UFP

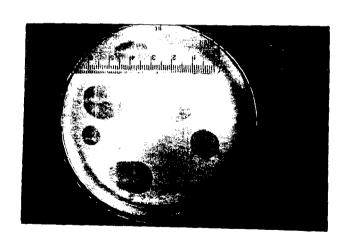


FIGURA – 2 CONTROL POSITIVO CON UFP INOCULADAS POR GOTEO Y SALPICADURA

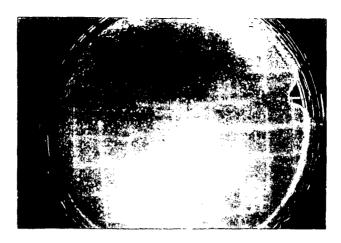


FIGURA – 3 NO PRESENTA UFP POR DEFECTO DE LAS CONDICIONES (SI HUBO INOCULACIÓN DEL FAGO)

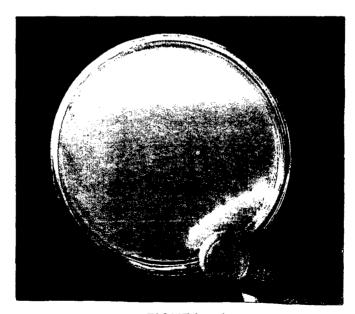


FIGURA – 4
INOCULACIÓN POR DILUCIÓN DEL FAGO

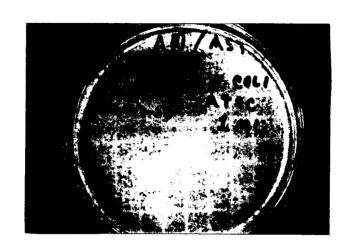


FIGURA – 5
INOCULACIÓN POR DILUCIÓN
CON UNA ALTA CONCENTRACIÓN DE FAGOS

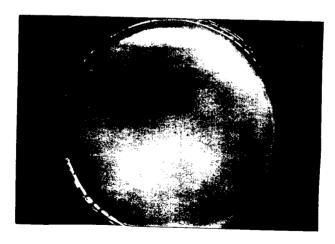


FIGURA – 6
INOCULACIÓN POR DILUCIÓN
CON BAJA CONCENTRACIÓN DE FAGOS

DISCUSIONES

Los procesos de purificación requieren de un estricto control de calidad y la verificación de sus parámetros reguladores.

La técnica desarrollada para detección de virus bacteriófagos nos permite aplicar un análisis exacto en la calidad del agua; esta técnica es de tipo cuantitativa, no nos permite conocer de que tipo de virus se esté aislando, solamente se puede saber el grupo de bacteriófagos por la bacteria que se emplea en el análisis, en este caso usamos *Escherichia coli* XLB1 por lo tanto los virus que se esperan detectar son del grupo de los colifagos.

Una investigación similar a la nuestra realizada en Ayacucho Perú, con el titulo: Detección de Colifagos en Agua Potable y Natural y su Relación con el Análisis Bacteriólogico, confirma que se encontraron colifagos en sus observaciones. En nuestro caso no encontramos alguno en las 36 muestras comerciales. Una de las razones de haber trabajado con agua purificada, es por el impacto que tiene en la salud humana relacionada con su consumo.

Esta técnica fue probada con una dilución del fago en donde recreando las condiciones en el supuesto de que sí estuviera presente el bacteriófago en la muestra, fuera capaz de causar lisis en el cultivo. Observándose que se presentaron zonas de lisis siendo la técnica reproducible y exacta.

Otros métodos citados en este trabajo, son eficaces también en la detección de bacteriófagos, representan un elevado costo en aparatos utilizados un ejemplo es la ultracentrifugación. Otro de los inconvenientes es el factor tiempo, ya que algunos metodologías se usan cultivos de tejidos animales de una línea celular estable; si se carece de ellos en el momento preciso para procesar una muestra, esto representa un contratiempo de primer orden, por que elaborar y conservar líneas celulares se necesita de un especialista que domine la técnica con la suficiente destreza; una limitación muy notable es que únicamente se detectan virus que infectan selectivamente a un tipo de células, así que si cae una especie de virus que no sea especifico entonces no hay formación de calvas en dicho cultivo celular.

Analizando la técnica desarrollada, una de las desventajas contra otros métodos, es que los bacteriófagos no caigan sobre la superficie del agar de cobertura LB inoculado con *E. coli*, él cual es depositado en el agar base (AN), esto por que las calvas solamente se pueden observar en dicha área del agar y no dentro del mismo (por que son: superficiales o aéreas).

Por el costo accesible de elaboración esta técnica es altamente competitiva, confiriéndole una gran ventaja con respecto a la mayoría de las técnicas usadas en el análisis virológico del agua.

Cumpliendo con todos los requisitos necesarios se puede aplicar dicha técnica en muestras de agua purificada, potable y natural.

CONCLUSIONES

- 1.- Se considera confiable la técnica desarrollada para la detección de bacteriófagos del grupo que infectan a Escherichia coli, aplicando a cualquier tipo de agua, pero más especialmente en agua natural y potable.
- 2.- La ausencia de coliformes en las 36 muestras nos indica que el agua comercial analizada de 12 marcas, las cuales son distribuidas en la Zona Metropolitana de Guadalajara cumplen con la Norma Oficial NOM-041-SSA 1-1993.
- 3.- Al no detectarse coliformes fecales en las muestras, no se logró encontrar bacteriófagos, esto nos sugiere la posibilidad de una correlación muy estrecha entre ambos, ya que tienen su formación en el tracto intestinal a partir de las bacterias coliformes. Por lo tanto existiendo bacterias entéricas en el agua, es posible detectar bacteriófagos en la muestra.
- 4.- Se observó una gran presencia de mesófilos aerobios en las muestras con presentación de 19 litros. Y poca presencia en la de 1.5 litros, esto nos sugiere que el fabricante no usa el mismo criterio de purificación para las dos presentaciones, esto puede ser posible por que en la presentación de 19 litros se reutilizan los envases, no siendo así en el caso de los envases de 1.5 litros.

5.- Los mesófilos aerobios nos indican un inadecuado lavado de los envases de 19 litros.

BIBLIOGRAFÍA

ALVARADO, R.A. 1999, Calidad virológica del agua potable, natural y residual en una zona hiperendémica de hepatitis virales, (tesis) Universidad de San Cristóbal de Huamanga pp.22 Ayacucho Perú.

AMERICAN PUBLIC HEALT ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. APHA, AWWA, WPCF. Métodos Normalizados para Análisis del agua potable y residual edición 179 Díaz Santos S.A. 1992.

ANGO, A.H. MARAVI, O. GUEVARA, R. 1996, Evaluación de la Calidad Microbiológica del Agua: Detección de Colifagos, UNSCH Ayacucho Perú.

CRAUN, G.F. 1986 Warbone Diseases in the United States, CRC Press, Beca Rston.

CRAUN, G.F. 1991 Cause of waferborne outbreaks in the United States, Water Science and Tecnology, 24,17 USA

CUBITT, D.W. 1991 A review of the epidemiology and diagnosis of waterborne viral infections.

Water Science and Tecnology, 24 (2), 197.

CUNINHAM, C. 1979 Virológia práctica, Editorial Acribia pp. 110-119 Zaragoza, España.

DOUGLAS, J. 1988 Bacteriophages. Chapman and Hall pp.7-20. USA

GERBA, C.P. and Rose, J.B. 1990 virus in source and drinking water, in: Brinking water Microbiology (Ed. G.A. Mc Feters), Springer-Verlag, New York, pp 386-396, 1990.

GORDAN, MC KAY, 1992 Water Pollution Microbiology, Wiley, Interscience New York - London - Sydney - Toronto pp 353-357 Printed en the USA.

GRANADOS, P.R. 1996 Villaverde P.M.C. Microbiología, Ed. Paraninfo Thomson Editores Internacionales pp. 164-305 Madrid.

GRAY, N.F. 1996 Calidad del agua potable, Ed. Acribia pp 188-294, Zaragoza.

LOGSDON, G.S. (1990) Microbiology and drinking water filtration in: Drinking water Microbiology (Ed. GA. Mc. Feterrs), Springer Varlag, New York, pp. 120-140

JUNKIN, MAC. 1988. Agua y Salud Humana, p.131-143 Ed. Limusa México.

MADIGAN, M.T. MARTINKO. J.M., PERKER J. Brock 1999 Biología de los Microorganismos, Prentice Hall Iberia, Madrid 8va. Edición pp. 250-258. P, 1,064.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SOMBROOK, J. 1989 Molecular Cloning. A. Laboratory manual. Cold Spring (A1 tomo 3) Harbor Laboratory, USA.

MORENO, B. DIAZ V. GARCIA L. MENES L. GUTIERREZ L. POLLEDO F. 1992, Microorganismos de los alimentos pp. 4-23 Editorial Acribia, Zaragoza, España.

NOM-041-SSA-1993, Bienes y Servicios. Agua purificada envasada. Especificaciones Sanitarias. Diario Oficial de la Federación 24 de marzo de 1995 pp 18,61-65 (México).

REIFF, F. 1995 Guía para la selección y aplicación de tecnologías de desinfección del agua para consumo humano en pueblos pequeños, y comunidades rurales en América Latina y el Caribe OMS, OPS, 207-121 Washinton, D.C.

RHEINHEIMER, G. 1987 Microbiología de las aguas, Editorial, pp. 109-120 Acribia, Zaragoza, España.

ROHLICH, G.A. Drinking Water and Health Safe Drinking Water Committee, National Academy of Sciencies, Washington. 1977.

SOBSEY, M.D. 1979 Source Document of Enteric Viruses Agency for International Development, Washinton, USA.

SLADE, J.S. 1978. "Enteroviruses in Slow Sand Filered Water" .Journal of the institution of water Engineers an Scientists 32 (ej: 530-536.