

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**DETECCIÓN DE *GIARDIA SPP.* EN AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD  
DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO**

**T E S I S**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR  
y BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**LUCIA DEL CARMEN HOYOS SALAZAR**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. NOVIEMBRE 2017**

## DEDICATORIA

A mi mamá Guadalupe Salazar Valle y  
a mi hermana Ilse Nallely Hoyos Salazar  
por todo su apoyo y sacrificio  
para terminar este trabajo,  
las amo.

## AGRADECIMIENTOS

A mí directora de tesis Dra. Amelia Portillo López, por darme la oportunidad de trabajar con ella, por su paciencia, dedicación, palabras de aliento y regaños para lograr la meta de concluir con este trabajo

A la Dra. Carmen G. Paniagua Chávez por permitirme la utilización del microscopio epifluorescente, por su tiempo y apoyo en la realización de este proyecto

Al Dr. Leopoldo G. Mendosa Espinosa, por darnos la idea de desarrollar el proyecto y brindarme su tiempo, así como sus conocimientos en el tratamiento de aguas residuales

A la Dra. Roxana Rico Mora, por estar al pendiente de los avances que se realizaron en este trabajo

A mí novio Ricardo Perea Jacobo por ser una luz que ilumina mi camino, por su apoyo constante y su amor incondicional, te amo

A mí papá Martín Eliseo Hoyos Molina por siempre estar ahí en los momentos más difíciles

## RESUMEN

*Giardia lamblia* es un protozooario patógeno que afecta tanto animales como al ser humano. Este microorganismo se trasmite por la ruta fecal-oral al ingerir agua o alimentos contaminados. Tiene una gran incidencia y prevalencia en la población mundial. Su distribución es de naturaleza cosmopolita, sus quistes que son la forma infecciosa son resistentes a condiciones extremas ambientales.

En este trabajo se analiza la presencia de *G. lamblia* y coliformes totales y fecales en efluentes de aguas residuales de las plantas de tratamiento y de la presa Emiliano López Zamora de la ciudad de Ensenada Baja California, México. Para ello se tomaron muestras mensuales durante los meses de junio-noviembre del año 2016. Para la detección de *G. lamblia* se utilizaron las técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La cuantificación de coliformes totales y fecales se llevó a cabo de acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996).

Se detectó *G. lamblia* únicamente por IFD en los efluentes de El Gallo, El Sauzal y El Naranja en los meses de julio a noviembre con concentraciones de 0 a 360 quistes/L. Los valores de coliformes fecales estuvieron en general dentro de la NOM-003 de menor a 1000 CF/100 mL para aguas que tendrán un contacto indirecto u ocasional con el ser humano. Excepto en el efluente de El Naranja, que en el mes de septiembre ambos tipos de coliformes superan los 1800 NMP/100 mL.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

**DETECCIÓN DE *GIARDIA SPP.* EN AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE  
ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO**

**T E S I S**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**LUCIA DEL CARMEN HOYOS SALAZAR**

**APROBADA POR:**



**Dra. Amelia Portillo López**  
Director de tesis



**Dra. Roxana Rizo Mora**  
Sinodal



**Dr. Leopoldo G. Mendoza Espinosa**  
Sinodal

## ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN .....	1
II ANTECEDENTES .....	4
II.1. Características de <i>Giardia</i> .....	4
II.2. Epidemiología .....	8
II.3. Zoonosis.....	9
II.4. Medio acuático .....	13
II.5. Aguas residuales.....	15
II.6. Métodos de identificación.....	21
II.6.1. Microscopia IMF .....	21
II.6.2. Inmunofluorescencia.....	22
II.6.2. ELISA (por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay).....	22
II.7. Técnicas moleculares de diagnóstico .....	23
II.7.1. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción ó RFLP.....	23
II.7.2. Microarreglos .....	24
II.8. Características moleculares de <i>Giardia lamblia</i> .....	24
III JUSTIFICACIÓN .....	30
IV HIPÓTESIS .....	31
V OBJETIVOS .....	32
VI METODOLOGÍA .....	33
VI.1. Área de estudio .....	33
VI.2. Recuperación de quistes y trofozoítos de aguas residuales .....	35
VI.3. Extracción de ADN.....	35
VI.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	36
VI.5. Control positivo de <i>Giardia</i> .....	37
VI.6. Detección de <i>Giardia</i> por Inmunofluorescencia .....	37
VI.7. Detección de coliformes totales y fecales por el número más probable .....	38
VII RESULTADOS.....	39
VII.1. Calidad microbiológica de las aguas tratadas .....	39
VII.2. Inmunofluorescencia .....	43
VII.3. Clonación y transformación del control positivo .....	45
VII.4. Estandarización de la extracción de ADN de las muestras de aguas residuales.....	47
VII.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	49
VIII.- DISCUSIÓN.....	51

IX.- CONCLUSIÓN.....	58
X.- BIBLIOGRAFÍA.....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Número	Título	No de página
I	Especies de <i>Giardia</i>	14
II	Protozoos entéricos patógenos transmitidos por el agua	20
III	Microorganismos patógenos más comunes encontrados en las aguas residuales.	23
IV	Helmintos patógenos más comunes encontrados en las aguas residuales	24
V	Remoción de quistes de <i>Giardia</i> spp en aguas tratadas	26
VI	Genotipos de <i>Giardia lamblia</i>	32
VII	Genes utilizados en el análisis de <i>Giardia lamblia</i>	33
VIII	Estaciones de muestreo.	39
IX	Cebadores para la amplificación del gen ribosomal subunidad pequeña	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Título	No de página
1	Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> compuesto por una fase de trofozoíto y una como quiste.	11
2	Morfología de <i>Giardia lamblia</i> .	12
3	Modo de infección de <i>Giardia lamblia</i> .	13
4	Ciclos principales de transmisión de <i>Giardia lamblia</i> .	16
5	Quiste de <i>Giardia lamblia</i> teñido con la técnica de IMF.	27
6	Quistes de <i>Giardia lamblia</i> identificados con Inmunofluorescencia	28
7	Mapa de los cromosomas de <i>Giardia lamblia</i> .	34
8	Estaciones de muestreo.	40
9	Valores de coliformes totales y fecales del efluente de salida de la planta de tratamiento de agua residual El Sauzal.	45
10	Valores de coliformes totales y fecales del efluente de salida de la planta de tratamiento de agua residual El Gallo.	46
11	Valores de coliformes totales y fecales del efluente de salida de la planta de tratamiento de agua residual El Noroeste.	47
12	Valores de coliformes totales y fecales la presa Emilio López Zamora.	48
13	Valores de coliformes totales y fecales del efluente de salida de la planta de tratamiento de agua residual El Naranjo.	49
14	Quistes de <i>Giardia lamblia</i> en muestras de las plantas de tratamiento	50
15	Número de quistes de <i>Giardia lamblia</i> en el efluente de salida de las plantas de tratamiento de agua residual durante los seis meses de muestreo.	51
16	Mapa del plásmido pUC57.	52
17	Crecimiento de clonas positivas después de ser	53

	transformadas con el plásmido pUC57.	
18	Gel de agarosa (1%) mostrando la calidad de la purificación de ADN utilizando filtraciones de las muestras.	54
19	Gel de agarosa (1%) mostrando la calidad de la purificación de ADN utilizando liofilización de las muestras.	55
20	Electroforesis del producto de PCR para la detección de <i>Giardia</i> en los efluentes de aguas residuales de Ensenada, B.C.	56

## I INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población a nivel mundial y, por consiguiente, el aumento en la demanda del agua para diferentes actividades ha generado el deterioro del recurso hídrico. Una de las fuentes de contaminación más frecuente es la de origen doméstico, la cual se caracteriza por la presencia de altas concentraciones de materia orgánica y microorganismos de origen fecal (Adam, 1991). Las enfermedades transmitidas por el agua, se producen en todo el mundo, provocando brotes en comunidades enteras, ocasionando infecciones sintomáticas en la población.

El género *Giardia* spp cuenta con seis especies de las cuales *Giardia duodenalis* (*Giardia intestinalis* o *Giardia lamblia*) se encuentra relacionada con la infección en el hombre (Cabello, 2007). Es el parásito, patógeno más común en los seres humanos, que se transmite principalmente por la ingestión de agua o alimentos contaminados (Maldonado *et al.*, 1998). Este es un protozooario flagelado del orden de los Diplomonadida de la familia *Hexamitidae* (Adam, 2001), se encuentra en el intestino delgado y es responsable de producir giardiasis, la cual es una parasitosis que se caracteriza por ocasionar espasmos abdominales, anorexia, fatiga, diarrea y náuseas (Glynn *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2009).

*Giardia lamblia* es liberada en ríos y lagos a través de las heces de mamíferos, contaminando de esta forma el agua, y se le considera como una fuente importante de infección. Este patógeno es resistente a los tratamientos de cloración de aguas de las plantas de tratamiento (Mahbubani *et al.*, 1998; Fricker *et al.*, 2002; Karanis, 2006).

En los países subdesarrollados se ha encontrado una alta prevalencia e incidencia del 20 al 67% de la población y en países desarrollados de solo 2-5% (Fraser *et al.*, 2000; Karanis, 2006; Barrientos-Galarza *et al.*, 2008). En México la tasa de incidencia en el año 2015 fue de 9.57 casos por cada 1000 habitantes y en Baja California la incidencia fue de 4.39 casos por cada 1000 habitantes (Secretaria De Salud, 2015).

El diagnóstico de este parásito se realiza mediante la detección de quistes o trofozoítos en la materia fecal, mediante estudios coproparasitológicos, y observación por medio de microscopia inmunofluorescente (IF), pruebas inmunológicas como la técnica de ELISA, la cual está dirigida a identificar los antígenos GSA-65, además se utilizan técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el análisis del Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), estas técnicas analizan la presencia del DNA de *Giardia lamblia* (Cabello, 2007).

Debido a que este organismo es un patógeno del ser humano es de gran importancia su detección en las aguas residuales tratadas que son descargadas en zonas donde el ser humano frecuente. Es por ello que el presente estudio tiene como objetivo detectar *Giardia lamblia* en aguas residuales provenientes de las plantas de tratamiento de la ciudad de Ensenada, B.C. México: Noreste, El Naranjo, El Sauzal y El Gallo, así como del agua de la presa Emiliano López Zamora, mediante técnicas

moleculares de PCR e inmunofluorescencia. Además, se evalúa la presencia de bacterias coliformes totales y fecales. La detección de *Giardia* y coliformes en las aguas tratadas puede proporcionar una visión de la calidad de estas aguas al ser vertidas en el ambiente.

## II ANTECEDENTES

### II.1. Características de *Giardia*

El protozoario *Giardia* fue inicialmente descrito por van Leeuwenhoek en 1681 mientras estaba examinando sus propias heces diarreicas bajo el microscopio (Dobell, 1920), y en 1883 Kunstler utilizó por primera vez el nombre de *Giardia* spp. como género. En 1888, Blanchard sugirió el nombre de *Lamblia intestinalis*, pero Stiles, cambió el nombre a *Giardia duodenalis* (Stiles, 1902). Posteriormente, Kofoid y Christiansen (1915) propusieron los nombres *Giardia lamblia* y *Giardia entérica* (Kofoid y Christiansen, 1920). El nombre de la especie *Giardia lamblia* se aceptó extensamente a través de la década de 1970 sin embargo, a partir de la década de 1980, algunos investigadores han fomentado el uso del nombre *Giardia duodenalis*, y en la década de 1990, el nombre de *Giardia intestinalis* ha sido más frecuentemente utilizado (Adam, 2001).

*Giardia lamblia* tiene un ciclo de vida compuesto por una fase quística y una como trofozoíto (Figura 1). Los trofozoítos presentan una estructura periforme de 12 a 15  $\mu\text{m}$  de largo por 5 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho, aplanados en sentido dorso ventral, cuentan con cuatro pares de flagelos que nacen de los blefaroplastos (anterior, caudal, ventral y posterior), con un disco suctor, el cual utiliza para adherirse a la pared del intestino principalmente en el yeyuno medio, dos axostilos que sirven como esqueleto, dos núcleos de cromatina se encuentran en sentido anterior, membrana nuclear, cuerpos parabasales, borde y surco para discal cuya función es participar en la succión, son anaerobios facultativos y se reproduce en el intestino mediante fisión binaria longitudinal (Kudo, 1985; Kabnick y Peattie, 1990; Cabello, 2007)( Figura 2).

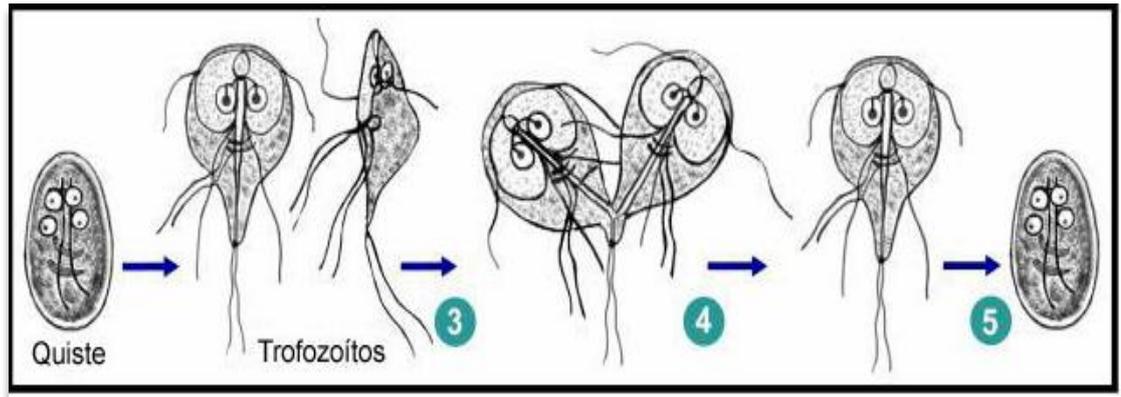


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia* compuesto por una fase de trofozoíto y una como quiste.

Los quistes son ovalados de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y cuentan con una pared de 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$  de espesor, compuesto de una capa filamentosa externa de 7 a 20  $\mu\text{m}$  (Erlandsen *et al.*, 1989; Erlandsen *et al.*, 1990) y una capa membranosa interior; cuenta con dos a cuatro núcleos, restos de flagelos, cuerpos parabasales, vacuolas, axonemas y fragmentos del disco suctor (Kudo, 1985; Gillin *et al.*, 1996; Soltys *et al.*, 1996; Rangel *et al.*, 1999; Adam, 2001).

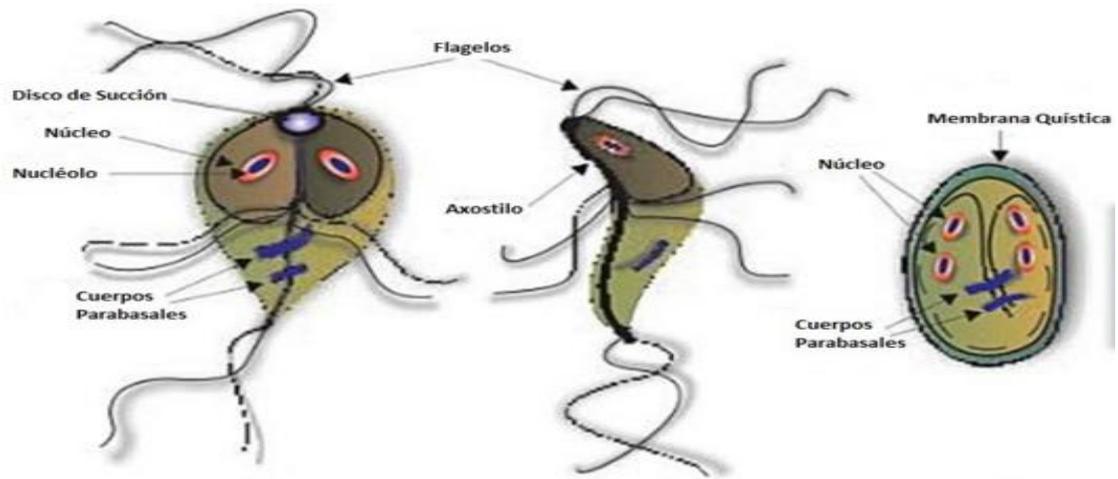


Figura 2. Morfología de *Giardia lamblia*.

La forma infectante es el quiste de *Giardia*, que cuenta con una pared celular gruesa y resistente que le permite resistir en el ambiente. Éste puede resistir en el agua dulce a temperaturas de hasta 4 °C (Bingham *et al.*, 1975; Karanis, 2006) y la forma patógena o causal de la sintomatología de la enfermedad es el trofozoíto. La fase quística consiste en una fase denominada temprana y tardía. La primera fase se completa en aproximadamente 10 h y consiste en la síntesis intracelular y transporte de componentes a la pared del quiste y la fase tardía se completa a las 16 h y consiste en la aparición de la membrana celular del trofozoíto para la iniciación del ensamble de los filamentos de la pared del quiste (Reiner *et al.*, 1989; Erlandsen *et al.*, 1996) (Figura 3).

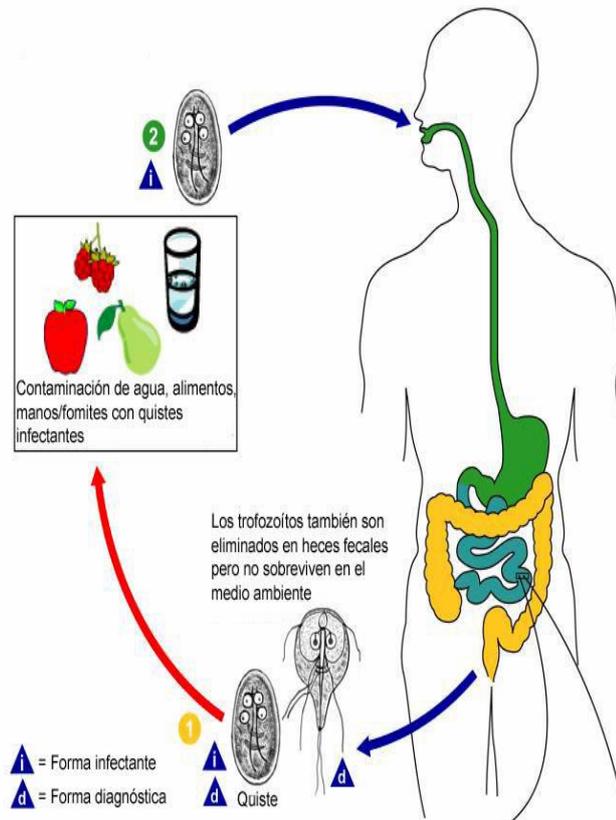


Figura 3. Modo de infección de *Giardia lamblia*, ruta fecal-oral

La infección por *Giardia* puede ser asintomática o sintomática. Cerca del 50 al 70% de los casos registrados son asintomáticos (Mintz *et al.*, 1993). La multiplicación asexual permite una rápida proliferación en el intestino que conduce a la infección aguda (Tibayrenc y Ayala, 2014), esta puede resistir en el intestino delgado desde semanas hasta meses. Los trofozoítos son arrastrados por el tránsito intestinal. El trofozoíto se enquista y sale en la materia fecal al ambiente (Cabello, 2007). El género *Giardia* cuenta con seis especies las cuales se presentan en la Tabla I.

Tabla I. Especies de *Giardia*

<b>Especies</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Morfología del trofozoíto</b>
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Largo y delgado; en forma de lágrima en el cuerpo medio
<i>G. lamblia</i>	Numerosos mamíferos incluyendo al hombre	En forma de pera; en forma de gancho en el cuerpo medio
<i>G. muris</i>	Roedores	Corto y redondeado; pequeña redondeado en el cuerpo medio
<i>G. ardeae</i>	Garzas	En forma de pera; en forma de gancho en el cuerpo medio, disco ventral y flagelos caudales similares a <i>G. muris</i>
<i>G. psittaci</i>	Las aves psitácidas	En forma de pera; en forma de gancho en el cuerpo medio
<i>G. microti</i>	Ratones de campo y rata almizclera	En forma de pera; en forma de gancho en el cuerpo medio, Los quistes contienen dos trofozoítos con discos ventrales maduros

Fuente: (Adam, 2001)

## II.2. Epidemiología

La infección comienza cuando el hospedero ingiere el quiste ya sea al tomar agua o ingerir alimentos contaminados. La dosis infecciosa para *Giardia* se ha estimado estar en el rango de 25-100 quistes. Después de la ingestión, tarda de 1 a 8 semanas de incubación en el organismo huésped (Gerardi y Zimmerman, 2005). El quiste entra en contacto con el ácido estomacal liberando a los trofozoítos en el duodeno. Por cada quiste se liberan de dos a cuatro trofozoítos, los cuales se fijan en la pared intestinal (Adam, 2001), provocando un aumento de las tasas de apoptosis de los enterocitos o células intestinales, disminución de las funciones de la pared intestinal, activación de los linfocitos del hospedero, atrofia en las vellosidades, acumulación

de fluidos intestinales, una mala absorción de los nutrientes, alteración de la producción de enzimas (disacaridasas, glucoamilasa, isomaltasa y ATP) y el aumento de las tasas de tránsito intestinal. Posterior al contacto con el fluido biliar los trofozoítos se enquistan y son arrastrados por el tránsito intestinal saliendo al ambiente (Adam, 2001; Cabello, 2007; Cotton *et al.*, 2011).

Las infecciones por *Giardia lamblia* con frecuencia se prolongan, a pesar de una respuesta inmune que se esperaría que erradicar la infección. Una de las posibles razones de la persistencia de la infección es la variación antigénica de las proteínas de la superficie de la membrana celular del protozoario. La variación antigénica se ha identificado en los seres humanos y ratones, y ésta se produce durante el proceso de enquistado, contribuyendo de esta forma a que la infección perdure en el hospedero (Aggarwal y Nash, 1988; Byrd *et al.*, 1994; Nash, 1997; Svard *et al.*, 1998; Carranza *et al.*, 2002).

### 11.3. Zoonosis

Los ciclos de transmisión de *Giardia* han demostrado que los animales de granja, los animales domésticos y los de vida silvestre pueden albergar genotipos zoonóticos de *Giardia lamblia*, así como los genotipos específicos para cada especie (Figura 4) (Thompson, 2004). El mayor riesgo zoonótico se refiere al genotipo A y B ya que estos afectan al ser humano y se pueden encontrar en numerosos mamíferos. Los genotipos específicos de los animales parecen estar restringidos al ganado (E), perros (D), gatos (F) y roedores (G) (Caccio y Ryanb, 2008). Sin embargo, existe un 0.8% de casos en los que el genotipo C, D, E y F que afectan al

ser humano (Caccio *et al.*, 2008). El mayor riesgo zoonótico es por el genotipo A, particularmente el subgenotipo AI, y en menor medida al genotipo B.

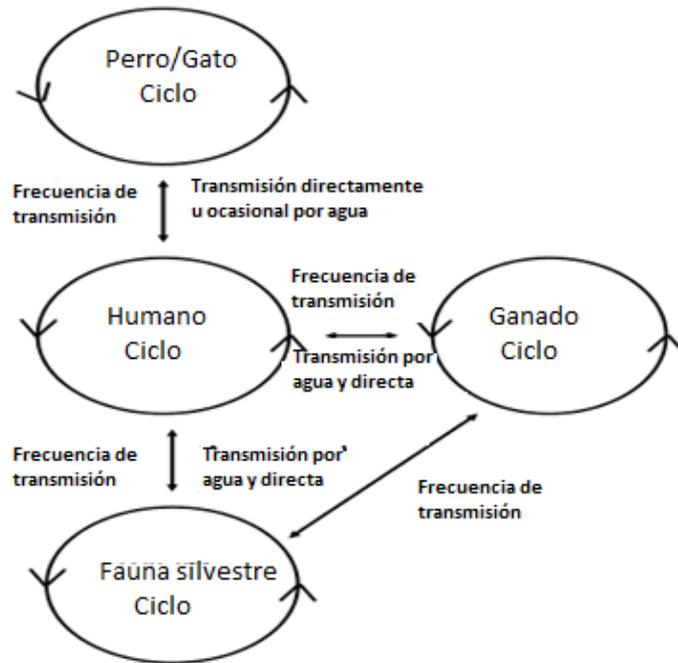


Figura 4. Ciclos principales de transmisión de *Giardia lamblia* (Fuente: Thompson, 2004).

La transmisión zoonótica entre ganado bovino y los seres humanos se ha reportado en numerosos estudios (Uehlinger *et al.*, 2006; Barigye *et al.*, 2008; Xiao y Fayer, 2008; Feng y Xiao, 2011; Khana *et al.*, 2011). Los animales de granja (vacas, ovejas, cabras y cerdos) son infectados con el genotipo E, el cual es predominante en este tipo de mamíferos, pero también se puede encontrar el genotipo A. Un estudio reciente utilizando la técnica de PCR y la amplificación de los genes  $\beta$ -giardin y triosa fosfato isomerasa determinó la presencia de *Giardia duodenalis* en el ganado

de 207 granjas provenientes de Alemania, Reino Unido, Francia e Italia, identificando una prevalencia del genotipo A en: Francia 61%, Alemania 41%, Reino Unido 29% y en Italia 28% (Geurden *et al.*, 2012).

El genotipo B se ha reportado en ovejas y cabras en diferentes estudios realizados en Noruega y España, utilizando la técnica de PCR, en el cual se amplificaron los genes  $\beta$ -giardin y glutamato deshidrogenasa (GDH) (Castro-Hermida *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2010).

Existe una posible transmisión zoonótica debido al estrecho contacto que puede existir entre animales de compañía como perros y gatos (Ponce-Macotela *et al.*, 2005). Un estudio realizado en Assam, India, proporcionó la primera evidencia directa de transmisión zoonótica entre los perros y los seres humanos, mediante la búsqueda del mismo genotipo de *Giardia duodenalis* en los seres humanos y perros, no sólo en el mismo pueblo, sino también en la misma casa. Los análisis se realizaron mediante la amplificación por PCR de los genes ribosomales (rRNA), el factor de elongación (ef1- $\alpha$ ) y la enzima triosa fosfato isomerasa (Traub *et al.*, 2004). Asimismo, en un estudio realizado en Alemania se encontró que de 60 perros pertenecientes al área urbana que resultaron positivos, el 60% estaba infectado con el genotipo A, 12% con el genotipo C o D (específicos del perro) y en el 28% restante se presentó una infección mixta (Leonhard *et al.*, 2007). En China se han realizado varios estudios donde se analizaron muestras de perros y se encontraron los genotipos A, C y D en la población (Li *et al.*, 2012a; Tan *et al.*, 2016).

Se sabe muy poco acerca de la prevalencia y la diversidad genética de las especies de *Giardia* en ambientes marinos y el papel que desempeña en la transmisión a los seres humanos. *Giardia* ha sido reportada en leones marinos, focas y ballenas (Olson *et al.*, 1997). El genotipo A y B se ha reportado en las heces de delfines, marsopas y tiburón mako (Bogomolni *et al.*, 2008; Lasek *et al.*, 2008; Lasek *et al.*, 2009; Appelbeea *et al.*, 2010).

Ha habido una serie de informes de transmisión de *Giardia lamblia* de los peces a los seres humanos. Casos reportados en Tailandia en la ciudad de Taipei y Laos, donde el consumo de pescado crudo de agua dulce provocó algunos casos positivos en la población (Cheng y Shieh, 2000; Soukhathammavong *et al.*, 2008). Poco se sabe, sobre la prevalencia y genotipos de *Giardia* en los peces, pero la evidencia preliminar sugiere que el pescado puede ser un reservorio potencial de los conjuntos de *Giardia duodenalis* (Yang *et al.*, 2010).

La caracterización genética de *Giardia* se ha utilizado ampliamente para evaluar el papel de los animales en la epidemiología de la infección humana por *Giardia lamblia* y para desarrollar herramientas para el seguimiento de las fuentes de infección (epidemiología), donde se estudia la transmisión de los animales a los seres humanos o de los seres humanos a los animales (Isaac-Renton *et al.*, 1993; Isaac-Renton *et al.*, 1994).

#### II.4. Medio acuático

La transmisión de *Giardia lamblia* a través del medio acuático se encuentra bien documentada. Los quistes pueden encontrarse en ríos, lagos, o embalses utilizados como fuentes de agua para consumo humano o de recreo (parques acuáticos, piscinas, etc.), en aguas residuales, aguas residuales tratadas y en aguas de uso agrícolas (Kudo, 1985).

La ocurrencia de *Giardia lamblia* aumenta en el verano y disminuye en el invierno (Appelbee *et al.*, 2005; Ajonina *et al.*, 2013; Taran *et al.*, 2015). El quiste es relativamente inerte, lo que le permite prolongar su supervivencia en diferentes condiciones ambientales y permanecen infecciosos durante meses en zonas frescas y húmedas. Resisten mejor las temperaturas templadas y pueden durar de 2 a 3 meses en el medio acuático bajo estas condiciones. A temperaturas de 21°C el quiste disminuye su viabilidad de infección a un mes y son extremadamente susceptibles a temperaturas superiores de 37°C, perdiendo totalmente su efectividad cuando son expuestos a temperaturas de 57°C por 10 min (Bingham *et al.*, 1975; Smith *et al.*, 2006).

Los quistes de *Giardia lamblia* en el agua del grifo pueden durar hasta 56 días a temperaturas de 0°C a 4°C y hasta 14 días a 20°C a 28°C. En lagos, se pueden encontrar hasta 56 días de supervivencia de 0°C a 7°C y 28 días a 17°C a 20°C. En ríos se ha encontrado que sobreviven hasta 84 días a temperaturas de 0°C a 4°C y 28 días a 20°C a 28°C. En el mar se pueden encontrar hasta 65 días a 4°C (Erickson y Ortega, 2006).

*Giardia* es sólo un tipo de protozoo patógeno transmitido por el agua. En la Tabla II se presentan diversos tipos y su ruta de transmisión (Carmena, 2010). Hasta la fecha, la principal fuente de contaminación del agua es de origen humano y, como tal, puede tener un impacto negativo en la salud de los ecosistemas que conduce a infecciones en la fauna acuática y terrestre (Hunter y Thompson, 2005).

Tabla II. Protozoos entéricos patógenos transmitidos por el agua.

Organismo	Síntomas	Distribución Geográfica	Estadio de transmisión y vía de infección.
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería, absceso hepático	Cosmopolita	Quiste (9 – 14.5 µm) ingestión
<i>Giardia intestinalis</i>	Diarrea, espasmos abdominales, anorexia, fatiga y náuseas	Cosmopolita	Quiste (8 – 12 µm) ingestión
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Diarrea	Cosmopolita	Quiste (4 – 6 µm) ingestión
<i>Balantidium coli</i>	Diarrea, disentería	Cosmopolita	Quiste (50 – 60 µm) ingestión
<i>Sarcocystis</i> sp.	Diarrea, espasmos abdominales	Cosmopolita	Quiste (7.5 – 17 µm) ingestión
<i>Toxoplasma gondii</i>	linfadenopatía, fiebre, infecciones congénitas	Cosmopolita	Quiste (10 – 12 µm) ingestión
<i>Neospora caninum</i>	Aborto, meningoencefalitis, miositis	Cosmopolita	Quiste (10 – 12 µm) ingestión
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Diarrea prolongada	Cosmopolita	Quiste (8 – 10 µm) ingestión
Microsporidia	enteritis, hepatitis, peritonitis, queratoconjuntivitis	Cosmopolita	Espora (1.8 – 5.0 µm) ingestión/ contacto con los ojos

(Fuente: (Soave, 1996; Mota *et al.*, 2000; Dowd *et al.*, 2003; Shields y Olson, 2003; Schuster y Visvesvara, 2004a; Schuster y Visvesvara, 2004b; Karanis, 2006)

## 11.5. Aguas residuales

A nivel mundial, se ha producido una creciente escasez de reservas de agua dulce, como resultado del crecimiento poblacional y del cambio climático. Debido a esta situación, se ha propuesto la utilización de aguas residuales tratadas con un bajo nivel de contaminantes químicos y microbiológicos (Karl y Knight, 1997). Para poder prevenir la transmisión de *Giardia* al medio ambiente, es necesario aplicar un tratamiento para reducir o inactivar estos organismos patógenos en los efluentes de las aguas residuales tratadas, antes de ser vertidos al ambiente (Plutzer *et al.*, 2010).

En México, en el 2014 sólo se trataron el 52.8% de las aguas residuales generadas, a pesar de la existencia de 2,337 plantas de tratamiento de aguas residuales en el país. (CONAGUA, 2014). A nivel mundial, el reuso del agua se encuentra en aumento especialmente en regiones áridas y semiáridas, que cuentan con una disponibilidad de agua menor a 1,700m<sup>3</sup>/habitantes/año (Falkenmark, 1989), como es en el caso de Baja California.

En las aguas residuales pueden encontrarse un gran número de patógenos incluyendo, virus, bacterias, hongos, protozoarios, helmintos (gusanos). En las Tablas III y IV se señalan a los organismos patógenos más comunes encontrados en las aguas residuales. Los patógenos son un reflejo de las enfermedades comunes en una comunidad y pueden estar presentes en números tan grandes como 100,000,000 organismos por mililitro (Gerardi y Zimmernan, 2005).

El tratamiento de las aguas residuales consiste en una serie de tratamientos físicos (sedimentación, retención, filtración, inactivación por radiación solar y luz UV), biológicos (lodos activados, asimilación de la materia orgánica y eliminación) y químicos (coagulación, inactivación por oxidación, desinfección) (Nasser *et al.*, 2012). En el tratamiento convencional para las aguas residuales que incluye desinfección mediante cloro, se pueden eliminar la mayoría de los patógenos gastrointestinales del ser humano.

*Giardia* es resistente a los desinfectantes a base de cloro en concentraciones y tiempos de exposición comúnmente utilizados en la industria del agua (Betancourt y Rose, 2004). Se ha demostrado que los quistes de *Giardia lamblia* son sensibles a la luz UV (Belosevic *et al.*, 2001; Hijnen *et al.*, 2006). El ozono es el químico más eficiente en la eliminación de protozoos, aunque la eficacia del ozono se reduce a temperaturas bajas y al tiempo de exposición (Finch *et al.*, 1993; Haas y Kaymak, 2003). Otros desinfectantes potencialmente útiles incluyen bromo, iodo ( $I_2$ ), permanganato de potasio ( $KMnO_4$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radiación ionizante (Gerardi y Zimmernan, 2005). Los desinfectantes químicos se requieren en concentraciones altas y, en algunos casos, los subproductos formados por la reacción de los compuestos en el agua son tóxicos, tales como los trihalometanos (THM) generados por el cloro, nitritos generados por la monocloramina, clorito de dióxido de cloro y bromato por el ozono (Von Gunten, 2003).

Tabla III. Microorganismos patógenos más comunes encontrados en las aguas residuales.

Tipo de microorganismos	Enfermedad
Adenovirus	Malestar de las vías respiratorias superiores e inferiores
Enterovirus	Trastornos del tracto respiratorio superior y gastroenteritis
HIV	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Poliovirus	Poliomelitis
Hepatitis	Hepatitis
<i>Aspergillus fumigatus</i>	"Pulmón del granjero" (enfermedad pulmonar alérgica)
<i>Candida</i> spp	Candidiasis
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Cryptosporidiosis</i>
<i>Entamoeba coli</i>	<i>Diarrea, úlceras</i>
<i>Balantidium coli</i>	<i>Balantidosis</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Actinomycosis</i>
<i>Brucella</i> spp.	Brucelosis
<i>Clostridium</i> spp	Gangrena gaseosa
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC)	Diarrea, gastroenteritis
<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia
<i>Leptospira interrogans icterohemorrhagiae</i>	Leptospirosis
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis
<i>Nocardia</i> spp.	Nocardiosis
<i>Salmonella</i> spp.	Salmonelosis
<i>Shigella</i> spp.	Shigelosis
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis

Fuente: (Gerardi y Zimmernan, 2005)

Tabla IV. Helmintos patógenos más comunes encontrados en las aguas residuales

Tipo de helmintos	Enfermedad que produce en el organismo
<i>Ancylostoma</i> spp.	Anemia
<i>Ascaris</i> spp.	Ascariasis
<i>Echinococcus granulosus</i>	Equinocosis
<i>Enterobius</i> spp.	Enterobiasis
<i>Necator americanus</i>	Anemia
<i>Schistomsoma</i> spp.	Esquistosomiasis
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Lombricosis
<i>Taenia</i> spp.	Teniasis
<i>Trichuris</i> spp	Anemia, diarrea

(Fuente: (Gerardi y Zimmernan, 2005)

El porcentaje de remoción de los quistes *Giardia* en las aguas residuales tratadas varía dependiendo de la capacidad de saneamiento y tecnología de tratamiento utilizada en las respectivas plantas (Roach *et al.*, 1993). En Noruega analizaron muestras provenientes de 6 plantas de tratamiento de agua residual, encontrando que el 95% de las muestras fue positiva para *Giardia lamblia*, además identificaron dos plantas que contaban con tratamiento secundario y que presentaron una remoción del 80% de los quistes de *Giardia lamblia* (Robertson *et al.*, 2006a). En Italia, se analizaron 4 plantas de tratamiento por un año, obteniendo remociones de quistes de *Giardia lamblia* mayor del 95%, en aquellas que contaron con tratamiento secundario de inactivación por oxidación seguido por la sedimentación (Caccio *et al.*, 2003).

Estudios realizados en dos plantas de tratamiento de agua residual situadas en Arizona, EUA, en donde se concentraron los quistes mediante un filtro electronegativo, seguido de un análisis de fluorescencia y PCR, se demostró que los tratamientos convencionales son ineficaces para la eliminación de *Giardia lamblia* (Kitajima *et al.*, 2014). En Sudáfrica se analizaron 6 plantas de tratamiento de agua residual. Las muestras fueron concentradas y analizadas mediante PCR demostrando la presencia de *Giardia lamblia* en 40% de los casos en plantas con filtros biológicos y en 20% en plantas con lodos activados, revelando una efectividad limitada en la remoción de este microorganismos (Samie y Ntekele, 2014).

Nasser y colaboradores (2012) analizaron la prevalencia de quistes de *Giardia* en los efluentes de descarga de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Tabla V), con el propósito de determinar los mejores procesos de eliminación de este patógeno. Encontraron que la utilización de filtros de arena lentos o rápidos, la ultrafiltración y la desinfección por luz UV fueron los métodos más eficaces de tratamiento para eliminación y desinfección de los quistes de *Giardia* en aguas residuales (Assavasilavasukul *et al.*, 2008; Nasser *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2013). Además estos procesos están siendo empleados en el tratamiento del agua para múltiples propósitos tales como la eliminación de patógenos, eliminación de productos químicos, entre otros (Taran *et al.*, 2015).

Tabla V. Remoción de quistes de *Giardia* spp en aguas tratadas.

Lugar	Tipo de tratamiento	Giardia (quiste/L)	Porcentaje de reducción log <sub>10</sub>
China	Secundario	0-32	1.68
	Filtro de arena	2.1-<0.2	0.89
Canadá	Tratamiento aeróbico	0.18-7.5	1.4
S. África	Secundario (AS)	0-35	99.96-868
Francia	Tanques de estabilización	0-30	100-99.7
Malasia	Tratamiento secundario	1-500	96
USA	Tratamiento secundario	4.4	99.51
Francia	Tanque de estabilización	0.2-16	99.1
USA	Humedales	<0.5-2.9	98
USA	Humedales	0.05-0.29	78.4-99.7
Irlanda	Humedales	11-111	0.95-4
China	Lodos activos	22	986
	Filtración por arena	0.4	99-97
USA	Lodos activos	23000	930
	Filtración por arena	18	990
Escocia	Lodos activos	354.3	75.3
	Filtración biológica	40	91.6
USA	Lodos activos	3	90-100
Italia	Ultrafiltración	0	100
Brasil	Lodos activos	1100	98.9%
Marruecos	Tanque de estabilización	0	99%
España	Tanque de estabilización	0-5.3	85

(Fuente: (Nasser *et al.*, 2012).

## II.6. Métodos de identificación

El diagnóstico tradicional de *Giardia* se realiza por los métodos microscópicos tras la aplicación de técnicas de concentración (Olivas, 2012). Los métodos comúnmente utilizados para la identificación de *Giardia* son por medio del análisis por microscopia de luz visible y colorantes, inmunofluorescencia (IF) y ELISA (por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay).

### II.6.1. Microscopia

La microscopia con merthiolate - yodo - formol (IMF) se basa en la fijación y coloración directa de los quistes y huevos de parásitos, permitiendo la observación inmediata de la muestra, en la cual los quistes se observan en el microscopio de un color amarillo oro (Figura 5) (Olivas, 2012).



Figura 5. Quiste de *Giardia lamblia* teñido con la técnica de IMF Fuente:(Lagana, 2010).

## II.6.2. Inmunofluorescencia

Esta técnica se basa en la reacción de un anticuerpo fluorescente específico de *Giardia lamblia* en contra de una proteína de membrana del quiste, con esta técnica se pueden identificar claramente la forma y tamaño característicos (Figura 6) (Rose *et al.*, 1989).

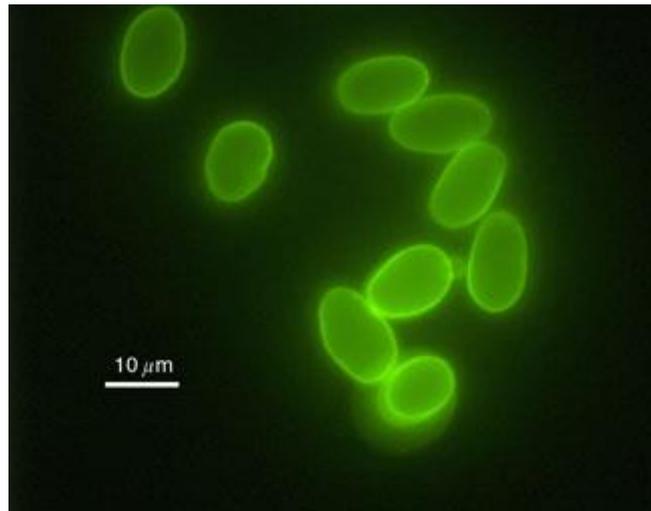


Figura 6. Quistes de *Giardia lamblia* identificados con Inmunofluorescencia.

## II.6.2. ELISA (por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked ImmuneSorbent Assay)

Por medio de esta técnica detecta los antígenos GSA-65 de la membrana del quiste de *Giardia lamblia*. Se basa en el uso de anticuerpos específicos acoplados a la enzima peroxidasa (HRP), de forma que una vez unidos el anticuerpo-HRP con el antígeno se revelará esta unión (conjugado) resultante mediante la adición de un sustrato específico de la enzima. La reacción positiva con la enzima producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro, mientras que la muestra negativa no presenta color (Calderón-Pascacio, 2007).

## II.7. Técnicas moleculares de diagnóstico

La aplicación de herramientas moleculares en los estudios de *Giardia* han permitido avanzar en el entendimiento de la biología básica de este protozoo. En varias partes del mundo se han incrementado los esfuerzos para desarrollar mejores métodos que permitan detectar *Giardia* en muestras de humanos, en diversos animales y en muestras ambientales, con miras a prevenir su difusión y a mejorar el diagnóstico para un tratamiento adecuado y oportuno. Las técnicas moleculares para la detección de *Giardia* spp. se basan particularmente en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que esta técnica cuenta con una mayor sensibilidad y especificidad que los diagnósticos "convencionales" que son dependientes de la cantidad de organismos presentes. Por el contrario, la técnica de PCR es capaz de detectar hasta 1 organismo. Además, pueden proporcionar información sobre el genotipo de *Giardia* spp presentes en las muestras (Morgan, 2000; Mcglade *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2010).

### II.7.1. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción ó RFLP

El método RFLP (por sus siglas en inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism) se basa en la utilización de enzimas de restricción que cortan en puntos específicos de acuerdo a la secuencia de bases del ADN. Aunque es rápido tiene la desventaja de requerir grandes cantidades de ADN y debe de ser de alta calidad para que la enzima trabaje correctamente (Kremer *et al.*, 1999).

### 11.7.2. Microarreglos

Los microarreglos de ADN se han utilizado con éxito para la detección de patógenos bacterianos y virales (Cherkasova *et al.*, 2003). La ventaja de este enfoque de detección es que combina potentes estrategias de amplificación de ADN, con sondas de oligonucleótidos específicas para múltiples secuencias diana. (Chizhikov *et al.*, 2001). Por lo tanto, produce una plataforma altamente sensible y específica con capacidad de alto rendimiento para la detección de patógenos y genotipado. Debido a la creciente dependencia de las pruebas genéticas para la identificación y la diferenciación, tales métodos son idealmente adecuados para la detección de parásitos protozoarios en muestras clínicas y ambientales sin embargo el costo de esta técnica es muy alto como para ser implementado en un laboratorio de diagnóstico (Wang *et al.*, 2004).

### 11.8. Características moleculares de *Giardia lamblia*

*Giardia* es un organismo poliploide, con un tamaño del genoma de 11,1075 Mb, con una gran cantidad de bases GC en el genoma de aproximadamente 47.75%, y con cinco cromosomas de un tamaño aproximado de 1.6 a 3.8 Mb (Adam *et al.*, 1988; Le Blancq y Adam, 1998) (Figura 7).

*Giardia lamblia* debe de ser considerada como un complejo de especies, cuyos miembros muestran poca variación morfológica (Monis *et al.*, 2003). Se ha confirmado la presencia de 8 genotipos los cuales se encuentran asignados de la A-H. Solamente los genotipos A y B se encuentran relacionados con infecciones a los seres humanos, como se puede observar en la Tabla VI. En la bibliografía se

describe que la infección causada por el genotipo A, causa menos síntomas de la enfermedad que el genotipo B (Homana y Mank, 2001; Thompson, 2004; Adam *et al.*, 2013).

En 1982 se logró aislar *Giardia lamblia* humana proveniente de un paciente asintomático que probablemente adquirió su infección en Afganistán, denominado P-1. El primer análisis de las diferencias moleculares de los aislamientos de *Giardia lamblia*, consistió en una tipificación de microorganismos provenientes de cinco aislados puros, tres de los cuales provenían de seres humanos. Se utilizaron seis enzimas metabólicas basándose en la migración en un campo eléctrico. Las diferencias entre estas enzimas reflejaron las diferencias en las secuencias de la codificación de los genes (Bertram *et al.*, 1983).

En 1985 se analizaron 15 aislados mediante la técnica de RFLP. Este estudio resultó en la descripción de tres grupos; el grupo 3 fue diferente a los grupo 1 y 2, los cuales se encontraron relacionados con la infección en los seres humanos (Nash, 1997). En India, se realizó un estudio similar donde se analizaron 12 muestras provenientes de pacientes, identificándose los genotipo AI, AII y B, concordando con estudios anteriores (Paintlia *et al.*, 1998). Por otro lado, un estudio 11 años en la ciudad de México, en él se tomaron pacientes asintomáticos y sintomáticos, determinó que el genotipo AI se encuentra ampliamente distribuido en esta población (Cedillo-Rivera *et al.*, 2003).

Tabla VI. Genotipos de *Giardia lamblia*

Genotipo	Hospedero
AI	Humano, gato, lémur, oveja, perro, alpaca, caballo, vaca, cerdo, chinchilla, castor, becerro
AII	Humano, becerro
B	Humano, becerro, mono, cerdo de nueva Guinea, perro, vaca, oveja, alpaca, gato, rata, cabra

Fuente: (Adam, 2001)

Las técnicas de genotipificación de *Giardia* spp. se basan, en su gran mayoría, en el análisis de los siguientes genes: la subunidad pequeña ribosomal (*SSU-rRNA*),  $\beta$ -giardin (*bg*), Glutamato deshidrogenasa (*gdh*), el Factor de elongación 1-alfa (*efl- $\alpha$* ), Triosa fosfato isomerasa (*tpi*), GLORF-C4 (*c4*) y la secuencia de la región espaciadora intergénica (ITS) (Caccio y Ryanb, 2008). En la Tabla VII. se pueden observar las ventajas que proporciona la utilización de cada gen.

Tabla VII. Genes utilizados en el análisis de *Giardia lamblia*.

Gen	Número de copias del gen	Diferencias entre especies y genotipo	Uso y beneficios
SSU-rDNA	Múltiple	Información de especies	Comúnmente utilizado Proporciona mayor éxito de amplificación
TPI	Uno	Información de especies y de sub-genotipos Utilización de cebadores específicos	Comúnmente utilizado El éxito de amplificación es variable Útil para infecciones mixtas
$\beta$ -giardin	Uno	Información de especies y de sub-genotipos	Comúnmente utilizado El éxito de amplificación es variable
GDH	Uno	Información de especies y de sub-genotipos	Comúnmente utilizado El éxito de amplificación es variable
ef1- $\alpha$	Uno	Información de especies y de sub-genotipos	No es comúnmente utilizada El éxito de amplificación es variable

Fuente: (Thompson y Ash, 2015).

El gen más utilizado en el análisis molecular ha sido la subunidad pequeña del gen ribosomal (*rRNA*), ya que este se encuentra altamente conservado en el genoma, lo que permite la identificación de las diferentes especies conocidas de *Giardia lamblia*. Cuenta con una naturaleza de múltiples copias, y el análisis se basa en la comparación de las secuencias de la subunidad pequeña *rRNA*, que contienen un 75% de G + C. Mediante este análisis es posible identificar las seis especies de

*Giardia* spp. (Sogin *et al.*, 1998; Stiller y Hall, 2000; Caccio *et al.*, 2010; Lebbad *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2012). Cabe señalar que este gen fue el utilizado en el presente estudio.

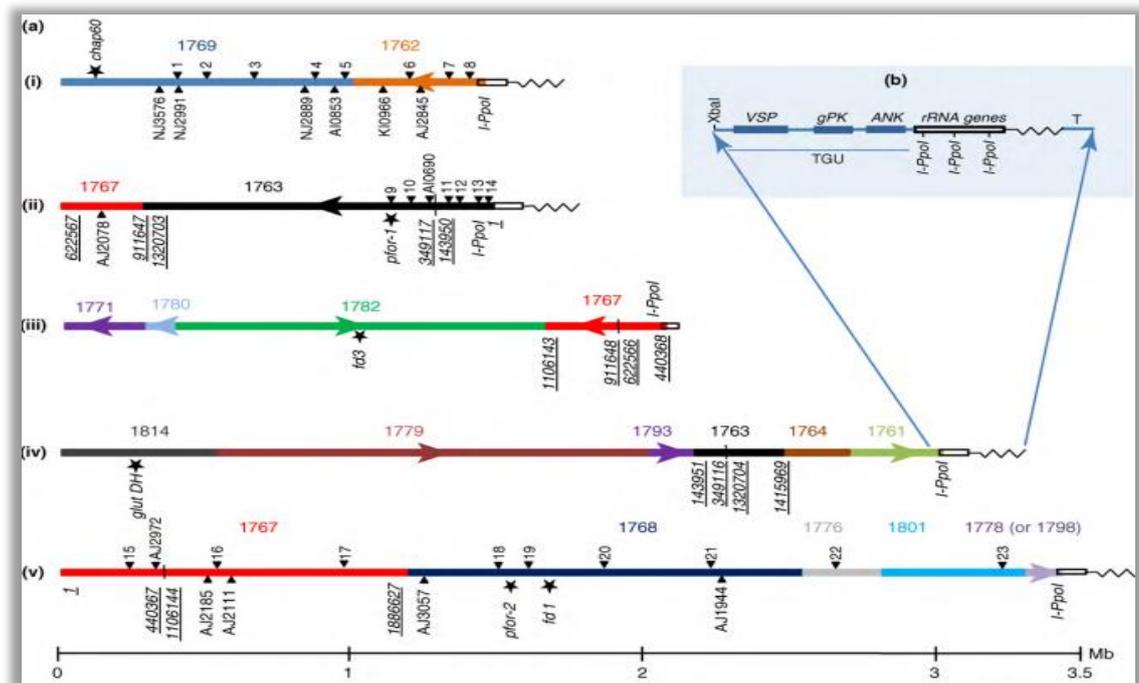


Figura 7. a) Mapa de los cromosomas de *Giardia lamblia*, b) región en el cromosoma IV, donde se encuentran los genes ribosomales (rRNA genes), ampliamente utilizados para la identificación de este organismo.

La Bahía de Todos Santos (BTS) recibe aportes de agua continental por los efluentes de arroyos naturales, sin embargo, se descargan también las aguas residuales provenientes de las plantas de tratamiento y del sector industrial. Estudios previos de detección de microorganismos relacionados a la contaminación antropogénica en la BTS han señalado que las concentraciones de coliformes fecales y estreptococos

detectados superan los límites permisibles para aguas de recreación, principalmente enfrente de la salida del arroyo El Gallo, el cual lleva consigo las aguas residuales de la planta de tratamiento aledaña a esta, se hace notar también que la contaminación se dispersa hacia el centro y sur de la BTS (Morales, 1984; Peña, 1987; Portillo y Lizárraga, 1997; Tanahara, 1996). Otro estudio más reciente señala que la mayor contaminación en la BTS fue adyacente a la descarga de las plantas de tratamiento El Naranja y El Gallo (González, 2003; Pérez, 2004). Estas concentraciones de contaminantes varían a lo largo de los meses del año, ya que dependen del aporte que hagan las plantas de tratamiento, su eficiencia de desempeño y al drenaje pluvial. Cabe destacar que en los estudios hechos en aguas costeras de la BTS no se reporta en ninguno de ellos la detección de Giardia, por lo cual este estudio contribuye con este nuevo conocimiento.

### **III JUSTIFICACIÓN**

La importancia de la realización de este estudio radica en la necesidad de evaluar la presencia de *Giardia lamblia* en las aguas residuales de las plantas de tratamiento de la ciudad de Ensenada, Baja California y el agua de la presa Emiliano López Zamora, con la finalidad de complementar información sobre la calidad de estas aguas.

#### **IV HIPÓTESIS**

El análisis molecular mediante la técnica de PCR e Inmunofluorescencia demostrará la presencia del protozooario *Giardia lamblia* en las aguas residuales tratadas de la ciudad de Ensenada, Baja California, México y de la presa Emiliano López Zamora.

## V OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar la presencia del protozooario *Giardia lamblia* en aguas residuales tratadas provenientes de las plantas de tratamiento del Noreste, El Sauzal, El Gallo, El Naranja y la Presa Emiliano López Zamora de la ciudad de Ensenada, Baja California, México.

### Objetivos Específicos

1. Detectar *Giardia lamblia* por el método directo de inmunofluorescencia, el cual utiliza anticuerpos anti-*Giardia* marcados con Isotocianato de Fluorosceína.
2. Detectar *Giardia lamblia* por la técnica de PCR utilizando el gen ribosomal de la subunidad 16s.
3. Determinar coliformes totales y fecales en las muestras de agua por la técnica del número más probable (NMP, Norma Oficial Mexicana: NMX-AA-42)

## VI METODOLOGÍA

### VI.1. Área de estudio

Se tomó una muestra mensual de 1 galón agua de cada estación de muestreo por un periodo de 6 meses (junio a noviembre de 2016). La muestra de agua fue tomada directamente de la salida de los efluentes, a excepción de la planta El Naranja que se tomó de la pila 97, localizada en la localidad de Maneadero. En el caso de la presa Emiliano López Zamora se adquirió de un punto de acceso en la región noreste. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio en una hielera con hielo, para procesarse en no más de 6 h (Tabla VIII, Figura 8).

Tabla VIII. Estaciones de muestreo

Nombre de la planta de tratamiento:	Toma de muestra:
Noreste 31°54'16''N, 116°36'34''O	Efluente de salida hacia el arroyo del cañón de Doña Petra
Planta de tratamiento El Sauzal 31°53'06''N, 116°41'074''O	Efluente de salida hacia el mar en el Sauzal hacia el arroyo Cuatro Milpas
Planta de tratamiento El Gallo 31°50'51''N, 116°36'42''O	Efluente de salida hacia el mar sobre Playa Hermosa
Planta de tratamiento El Naranja 31°48'36''N, 116°34'31''O	Agua proveniente de la planta descargada en la Pila de la parcela 97 en la localidad de Maneadero
La Presa Emiliano López Zamora	Punto con acceso localizado en la zona noreste cerca de a cortina de la presa.

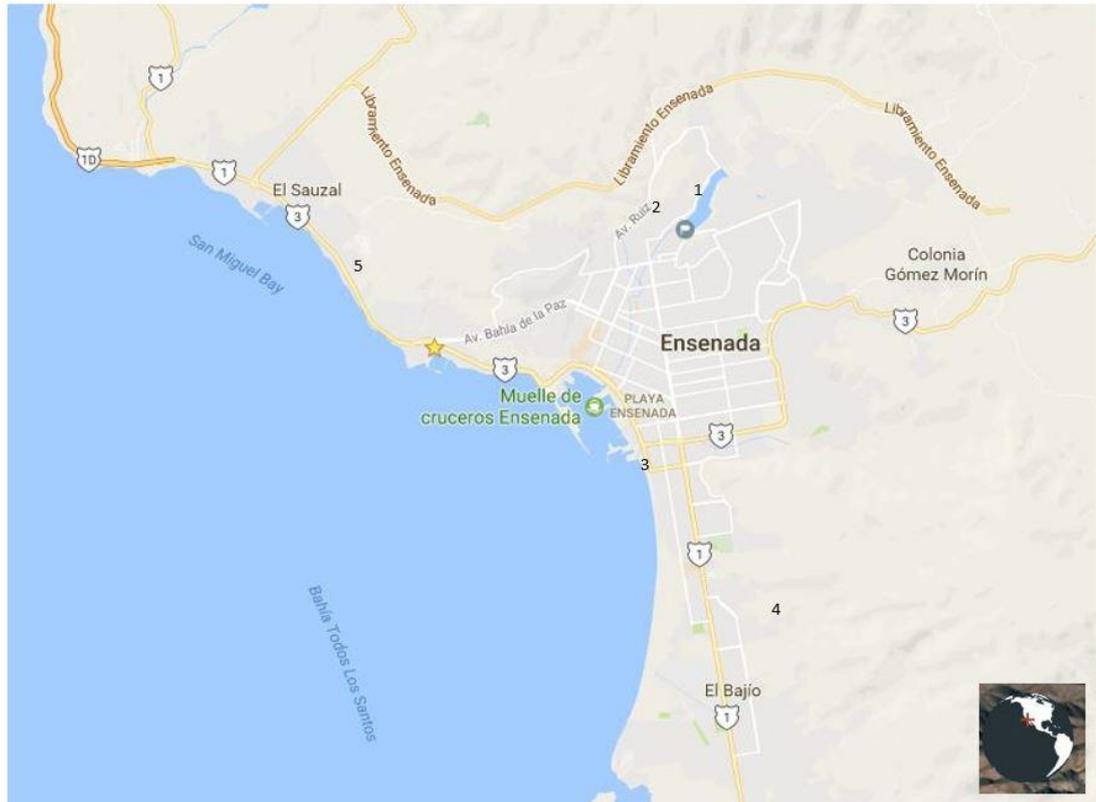


Figura 8. Mapa donde se señalan las Plantas de tratamiento de aguas residuales y fotografías de donde se realizaron las tomas de muestras: 1 La Presa ELZ, 2 El Noreste, 3 El Gallo, 4 El Naranjo, 5 Sauzal. Estaciones de muestreo: a) La presa Emiliano López Zamora; b) efluente de la planta de tratamiento El Sauzal; c) Efluente planta de tratamiento El Noroeste; d) efluente de la planta El Naranjo.

## VI.2. Recuperación de quistes y trofozoítos de aguas residuales

Para la recuperación de quistes y trofozoítos de *Giardia lamblia* en las muestras de aguas residuales se utilizó el método de concentración mediante centrifugación. Se tomaron 500 mL de cada muestra en 10 tubos de 50 mL, los cuales fueron centrifugados a 4,000 rpm por 10 min (centrífuga SORVALL, modelo: RC-5C PLUS). Posterior al centrifugado, el sobrenadante fue descartado y el botón fue recolectado y colocado en un tubo limpio de 50 mL; enseguida se homogenizó el botón con 50 mL de agua destilada esterilizada y de nuevo fueron centrifugados por 10 min. Posteriormente se realizó un último lavado con 25 mL de amortiguador de fosfato salino esterilizado (NaCl 0.130 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.005 M, KHPO<sub>4</sub> 0.001 M, pH 7.4) después se homogenizó cuidadosamente la muestra y de nuevo se centrifugó por 10 min. El botón formado se guardó a -20 °C hasta su posterior uso para la extracción de ADN y para la técnica de fluorescencia (Samie y Ntekele, 2014).

## VI.3. Extracción de ADN

Una submuestra de 50 mg del botón fue resuspendido en 400 µL TE buffer, adicionándole 2.5 µl de proteinasa K, enseguida se incubó 1 h a 37°C, posteriormente se añadió 60 µl de SDS al 10%, 77 µl de NaCl 5 M, 60 µl CTAB/NaCl, y se incubó por 1 h a 65°C, se añadió 600 µl de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1). Los tubos fueron centrifugados durante 10 min a 12, 000 rpm (micro centrifuga Eppendorf modelo 5417R), se removió la fase líquida a un tubo nuevo, se añadió 60% de su volumen de Isopropanol, se mezcló y se incubó 15 min a -20 °C. Enseguida se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, se

decantó el sobrenadante y se dejó escurrir por 5 min. El botón formado fue resuspendido en 30 µl de agua libre de DNAsas, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para observar la calidad del ADN (Ausubel *et al.*, 2002).

#### VI.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación por PCR se preparó la reacción en un volumen final de 15µL, con 25-50 ng de DNA, 10 pmol de cada cebador, 1X de la mezcla de PCR (Gotaq Green Master mix, PROMEGA®). En la Tabla IX se describen los cebadores utilizados para la amplificación.

Tabla IX. Cebadores para la amplificación del gen ribosomal subunidad pequeña.

Cebadores (5' a 3' )	Tamaño del amplicón	Referencia
RH11 (CATCCGGTCGATCCTGCC) RH4 (AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG)	292 pb	(Hopkins <i>et al.</i> , 1997)
F9 (GCGGAGAATCAGGGTTCGAC) R9 (ATTGACAGAGGCGGTCTTGG)	428 pb	Este estudio
RH11 (CATCCGGTCGATCCTGCC) R9 (ATTGACAGAGGTCTTGG)	719 pb	Este estudio
F125 (CGGACACCGCTGGCAACCC) R9 (ATTGACAGAGGTCTTGG)	593 pb	(Hopkins <i>et al.</i> , 1997) y este estudio

El termociclador (LABNET ®) se programó de la forma siguiente: un ciclo, 94°C durante 5 min, 30 ciclos de: 95°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min y una elongación final a 72°C durante 10 min. El producto obtenido se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y TBE 1X, teñido con Bromuro de Etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (Bench Top ladder Promega®). La electroforesis se llevó a cabo a 80 V por 30 min.

#### VI.5. Control positivo de *Giardia*

Se obtuvo la secuencia de DNA del banco de genes NCBI de un tamaño de 719 pb, subunidad pequeña ribosomal ARN, secuencia parcial regiones intergénica y una secuencia parcial de la subunidad mayor de *Giardia lamblia* (Número de acceso del genbank: DQ157272.1). Parte de esta secuencia se envió a sintetizar y clonar a la compañía GenScript, en Estados Unidos. El plásmido se transformó por electroporación en *E. coli*, enseguida se sembraron diluciones en cajas de Petri con el medio LB con ampicilina ( $50\mu\text{g mL}^{-1}$ ) Estas se incubaron a 37°C por 24 h, después se seleccionaron clonas positivas y se aislaron en caldo LB con ampicilina, para posteriormente purificar el ADN plasmidico con la técnica miniprep, ADN que fue utilizado como control para la técnica de PCR.

#### VI.6. Detección de *Giardia* por Inmunofluorescencia

Se utilizó el kit comercial de inmunofluorescencia directa para la detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* (IVD Research INC®, *Direct Fluorescent Antigen Assay*).

Se tomaron 10 µl del botón de cada muestra, después de haberla concentrado de un volumen de 500 mL, estas se colocaron en portaobjetos provistos en el kit, las muestras fueron secadas por 30 a 60 min a 37°C. Enseguida se adicionaron 10 µL del conjugado y 10 µL del contrateñido, ambos fueron homogenizadas con movimiento circulares. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente en total oscuridad por 30 min. Las muestras fueron lavadas con unas gotas de la solución de lavado 1X y después se escurrieron en un papel secante. Se les adicionó una gota del conservador e inmediatamente se procedió a observar en el microscopio de epifluorescencia a una excitación de 490-500 nm con un filtro de 510-530 nm, propio del colorante fluorescente FITC (microscopio OLYMPUS BX61 motorized system de SUBNARGENA, CICESE).

#### VI.7. Detección de coliformes totales y fecales por el número más probable

Esta metodología fue hecha siguiendo el protocolo establecido en la norma oficial mexicana de calidad de Análisis de agua- enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli*. Método del número más probable en tubos múltiples (NMX-AA-042-SCFI-2015, 2015).

## VII RESULTADOS

### VII.1. Calidad microbiológica de las aguas tratadas

Los resultados de coliformes obtenidos de cada sitio de muestreo fueron analizados individualmente como se presenten enseguida, estos son expresados como el número más probable (NMP) por cada 100 mL de muestra.

En la Figura 9 se muestran los resultados del efluente de la planta de tratamiento de agua residual de El Sauzal, donde se observa que en el mes de julio se obtuvo una mayor presencia de coliformes totales con valores de 1600 NMP/100 mL y coliformes fecales de 5 NMP/100 mL, mientras que en demás meses se obtuvieron concentraciones menores.

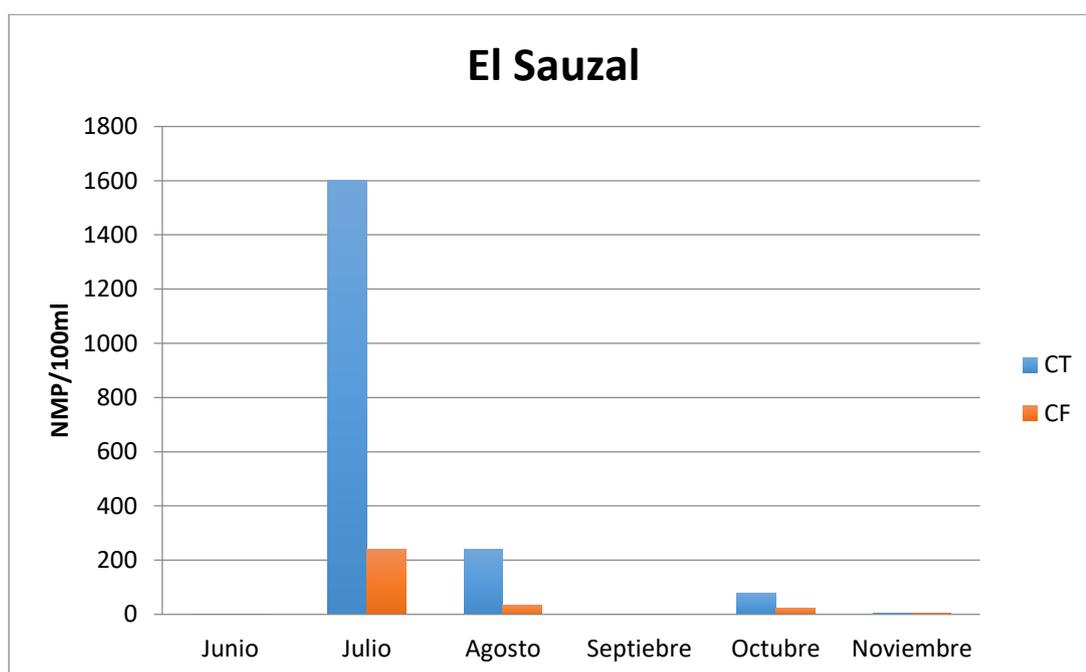


Figura 9. Valores de coliformes totales y fecales del efluente de salida de la planta de tratamiento de agua residual el Sauzal durante 6 meses muestreados en el año 2016.

En la Figura 10. se muestran los resultados del efluente de salida de la planta de tratamiento de agua residual El Gallo donde se observa que durante los meses muestreados las coliformes totales y fecales estuvieron por debajo de 7 NMP/100 mL.



Figura 10. Valores de coliformes totales y fecales del efluente de salida de la planta de tratamiento de agua residual El Gallo durante los 6 meses muestreados en el año 2016.

En la Figura 11 se muestran los resultados del efluente de salida de la planta de tratamiento de agua residual Noreste, donde se observa que en el mes de septiembre se obtuvo una mayor presencia de coliformes totales con valores de 920 NMP/100 mL, mientras que en los demás meses fueron mínimas las concentraciones de coliformes totales y fecales.

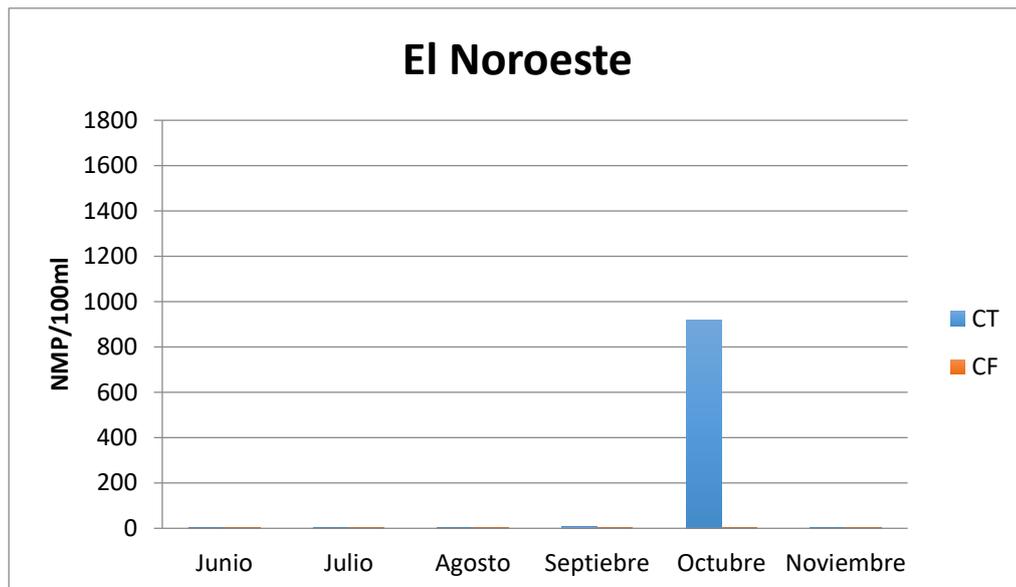


Figura 11. Valores de coliformes totales y fecales del efluente de salida de la planta de tratamiento de agua residual el Noroeste durante los 6 meses muestreados en el año 2016.

En la figura 12 se muestran los resultados de la presa Emilio López Zamora, donde se observa que en el mes de agosto se obtuvo una mayor presencia de coliformes totales con valores superiores a 1800 NMP/100 mL en el mes de agosto, mientras que las coliformes fecales estuvieron por debajo de 920 NMP/100 mL en todos los meses muestreados.

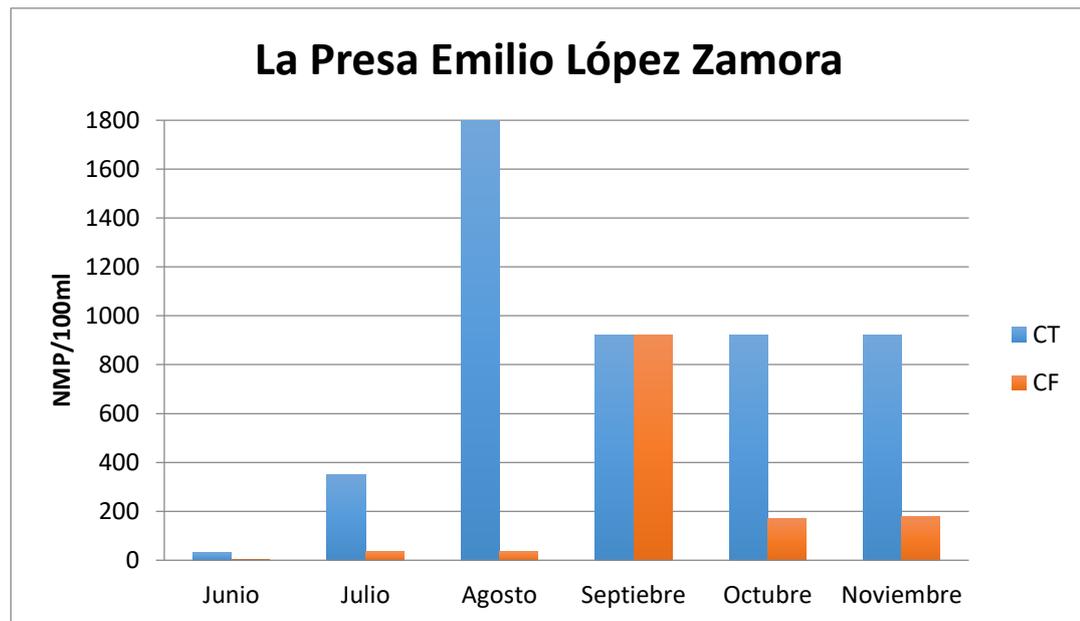


Figura 12. Valores de coliformes totales y fecales de la Presa Emilio López Zamora durante los 6 meses muestreados en el año 2016.

En la figura 13 se muestran los resultados del efluente de la planta de tratamiento El Naranjo que desemboca en la pila 97 en Maneadero, para ser empleada en irrigación. Se observa que en el mes de septiembre se obtuvo una mayor presencia de coliformes totales y fecales con valores superiores a 1800 NMP/100 mL en el mes de Septiembre. El resto de los meses muestreados presentó valores de coliformes fecales por debajo de 540 NMP/100 mL.

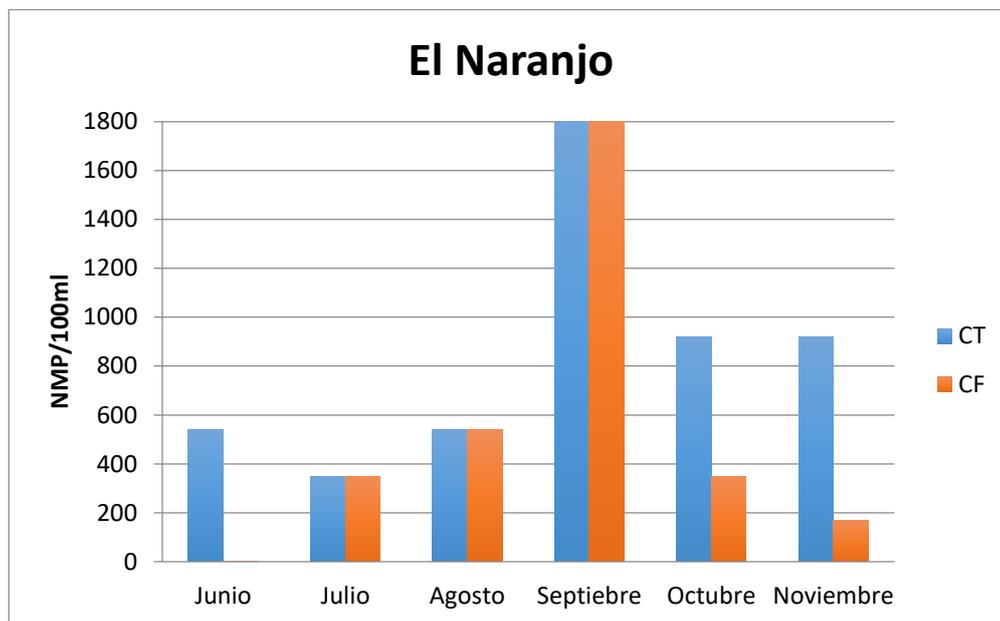


Figura 13. Valores de coliformes totales y fecales de la planta de tratamiento de aguas residuales El Naranjo durante los 6 meses muestreados en el año 2016.

## VII.2. Inmunofluorescencia

La detección de *Giardia lamblia* mediante el uso de la técnica de inmunofluorescencia se muestra en la figura 13. En la figura 14 se observan el número de quistes presentes por litro de muestra de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales de El Sauzal, El Gallo y El Naranjo. Se presentaron una mayor cantidad quistes de *Giardia* en la planta de tratamiento El Gallo en el

mes septiembre y una disminución en el mes de octubre, mientras que en la Pila 97 tuvo mayor número de quistes durante los meses de julio y una disminución en su concentración en el mes de noviembre. Las aguas residuales de El Sauzal fluctuaron durante los meses de muestreo, siendo el mes de julio se observó la de mayor concentración y disminución en el mes de agosto y septiembre, seguida de un pico en el mes de octubre y nuevamente disminuye en el mes de noviembre. El agua residual de la planta Noreste y de la presa no presentaron quistes de *Giardia* durante todo el estudio (Figuras 14 y 15).

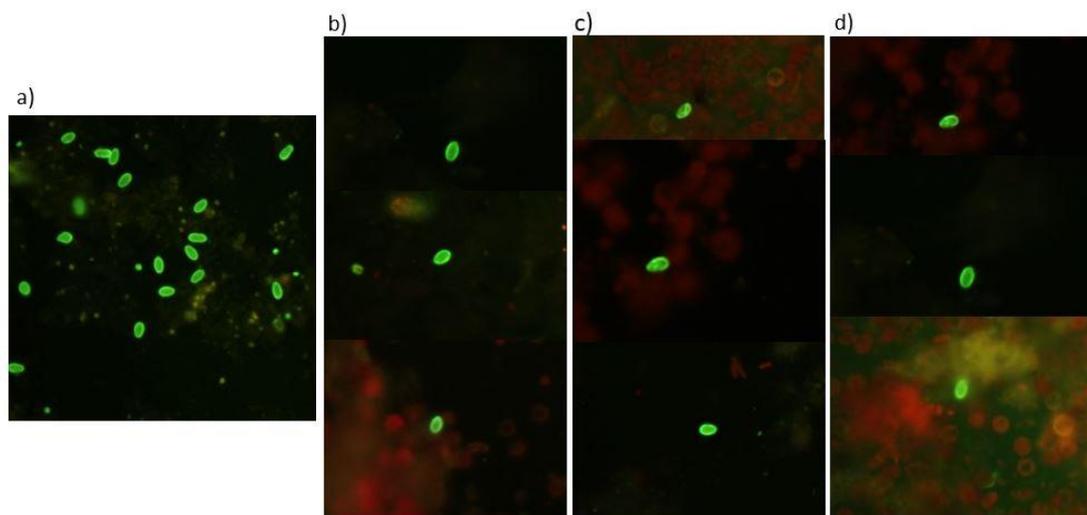


Figura 14. Fotografías de quistes de *Giardia lamblia* en muestras de los efluentes de las plantas de tratamiento, tomadas a 40X de aumento en un microscopio óptico. a) control positivo, b) El Gallo, c) El Sauzal, d) El Naranja.

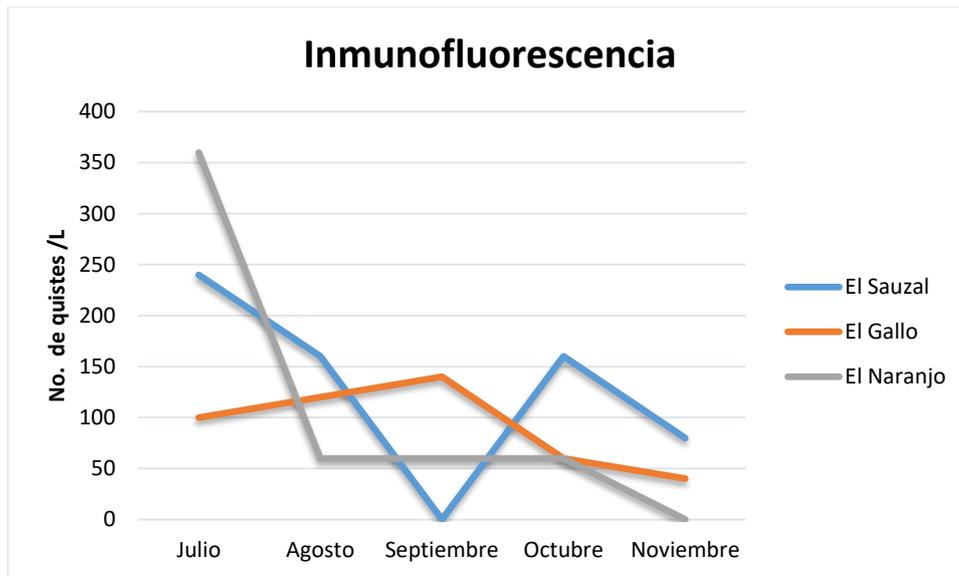


Figura 15. Número de quistes de *Giardia lamblia* en los efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual durante los seis meses de muestreo en el año 2016.

### VII.3 Clonación y transformación del control positivo

Se obtuvo el plásmido pUC57 (Figura 15) de la compañía GeneScript, Estados Unidos con la secuencia clonada del gen ribosomal 16S de *Giardia intestinalis* (small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, GenBank: DQ157272.1). El segmento a amplificar en la reacción de PCR se muestra en amarillo en la siguiente secuencia de ADN.

```

1 catccggtcg atcctgccgg agcgcgacgc tctcccaag gacgaagcca tgcattgccg
61 ctaccccgga acgcgccgga cggctcagga cgacggttgc accccccgcg gcggtccctg
121 ctagccggac accgctggca acccggcgcc aagacgtgcg cgcaagggcg ggcgcccgcg
181 ggcgagcagc gtgacgcagc gacggccccg cggggttcc ggggcatcac ccggtcggcg
241 cggtcgcgcc gcgccgaggg cccgacgctt ggcggagaat cagggttoga ctccggagag
301 cgggctcgcg agacggcccg cacatccaag gacggcagca ggcgcggaac ttgcccaatg
361 cgcggcgcgc gaggcagcga cggggagcgc ggcgagcagc cggggcccaca gccccgcgcg
421 cggagccgag ggcaaggtct ggtgccagca gccgcggtaa ttccagctcg ggcgagctcg
481 cgcggcgcct ctgcagttaa aacgcccgta gttggcctcc cgccgccacg aggaaacggg
541 agcgtctccag gcaggcccgt tggaccgccg gctgtggacc ggcgagcggg cgaggcgcgc
601 cgcggcagcc ccgaggagag cgggcggggg caccggtacc ggcgggggac ggtgaaaca
661 ggatgatccc gccgagaccg cgggcccgcg aggcgcctgc caagaccgcc tctgtcaatc
721 aagggcgaag gccgggggct agaaggggat cagacaccac cgtattcccg gccgtaaacc
781 gtgccgcccc ggggcccgcg cgcgcgtccc gccggccgcc cagggaaacc gggaggtccc

```

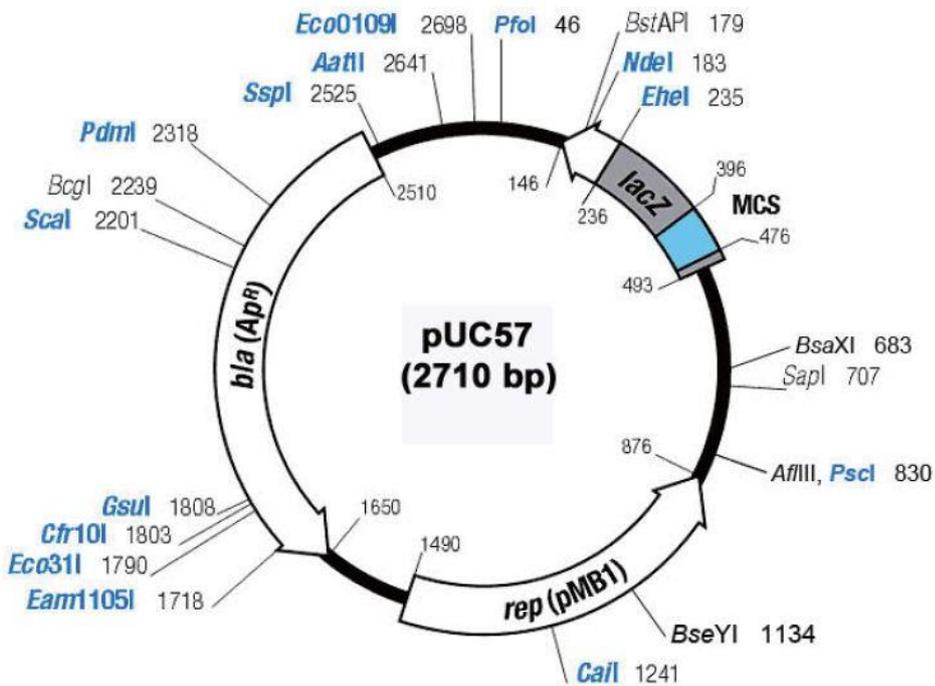


Figura 16. Mapa del plásmido pUC57 el cual contiene la secuencia de ADN usada como control positivo de *Giardia intestinalis*.

El plásmido fue transformado en *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) como se muestra en las cajas de Petri con crecimiento de clones positivos (Figura 16), que a partir de seleccionar unas clonas se extrajo el ADN plasmídico para ser utilizado en el PCR.

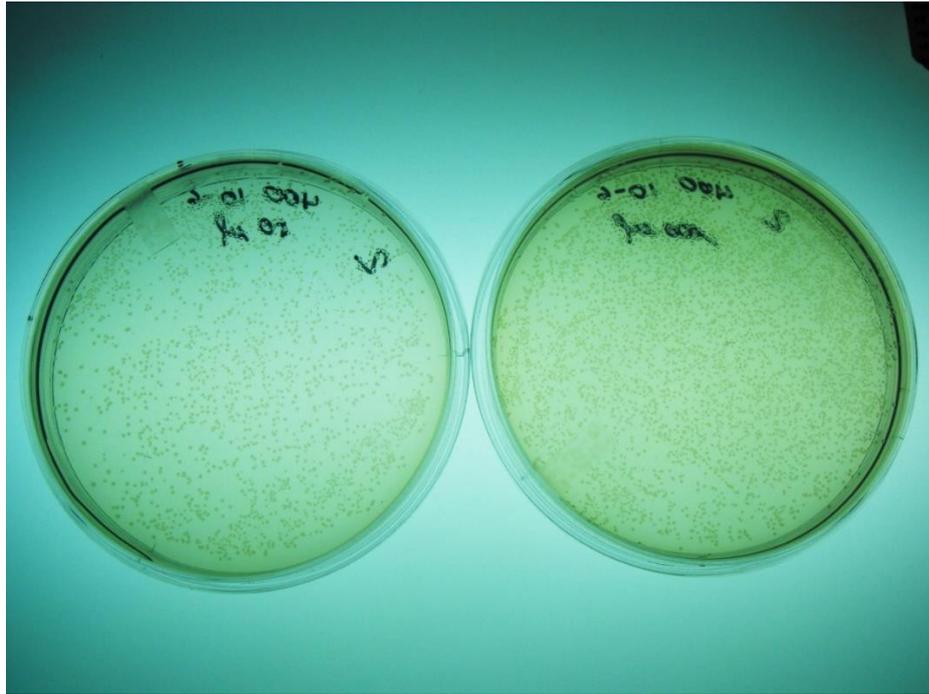


Figura 17. Crecimiento de clonas positivas en cajas de Petri después de ser transformadas con el ADN plasmídico pUC57.

#### VII.4. Estandarización de la extracción de ADN de las muestras de aguas residuales

Se llevó a cabo la metodología tradicional de Fenol-Cloroformo-Isoamil Alcohol en todas las muestras, sin embargo, la forma de tratamiento de las muestras fue variable. En primer lugar, se concentró un litro de muestra a través de filtrarlo por una membrana con tamaño de poro de  $0.45\ \mu\text{m}$ , el cual se colmato muy rápido. Los filtros se colocaron en una caja de Petri estéril y se enjuagaron con agua estéril, después se colectó el agua con las partículas y se centrifugó para obtener un botón, del cual se tomaron  $50\ \mu\text{L}$  para la extracción de ADN. De estas muestras el ADN obtenido estaba muy degradado como se muestra en la Figura (18). Siguiendo la metodología de Samie & Ntekele en el 2014 y el método de detección de *Giardia lamblia* en agua potable EPA 1623, se procedió a centrifugar  $500\ \text{mL}$  distribuidos en

10 tubos de centrifuga de 50 mL, posteriormente se decantó el sobrenadante y los botones se lavaron con agua esterilizada y se volvió a centrifugar, por último, se juntaron los botones de los 10 tubos en uno solo. De este último botón se tomaron 50  $\mu$ L, los cuales se congelaron para liofilizarse y continuar con el método tradicional de purificación de ADN. Esta última metodología fue la mejor ya que se obtuvo mejor calidad de ADN (Figura 19).



Figura 18. Gel de agarosa (1%) mostrando la calidad de la purificación de ADN utilizando filtraciones de las muestras y la técnica tradicional de Fenol-cloroformo-Isoamil Alcohol. Carril 1 y 2: La planta Noreste; 3: El Sauzal; 4: El Gallo; 5: La presa; 6: El Naranjo.

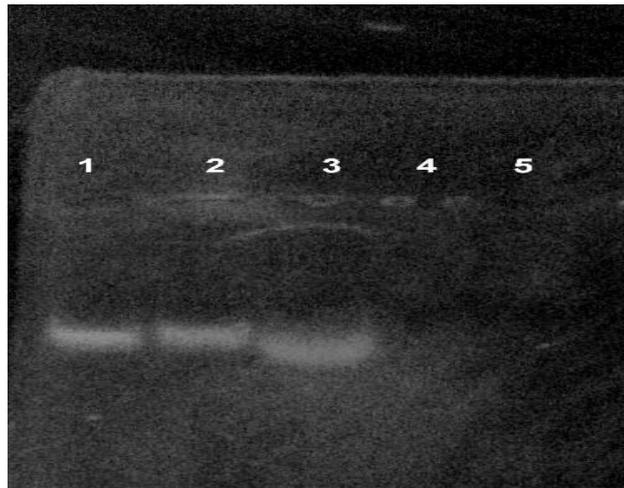


Figura 19. Gel de agarosa (1%) mostrando la calidad de la purificación de ADN utilizando liofilización de las muestras y la técnica tradicional de Fenol-cloroformo-Isoamil Alcohol. Carril 1: El Gallo; 2: El Sauzal; 3: El Naranjo; 4: La presa; 5: El Noroeste.

#### VII.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis molecular mediante el uso de la técnica de PCR no arrojó resultados positivos para todas las muestras analizadas en todas las estaciones de muestreo, aun utilizando los cebadores mayormente citados en la literatura científica. En la Figura 20 se pueden observar los resultados de una reacción de PCR. Los carriles 3-5 muestran un barrido de ADN y nada en los carriles 6 y 7. Cabe señalar que en el carril 2 se observa la amplificación de la banda esperada del control positivo (713 pb)

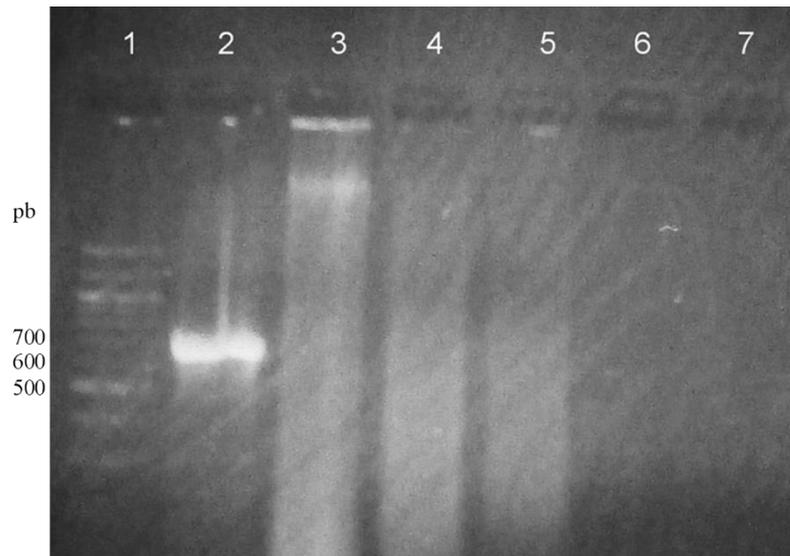


Figura 20. PCR hecho con los cebadores RH11 y R9, mostrando en el carril 1 el marcador molecular de escalera de 100 pb; carril 2, control positivo (banda de 713 pb); carril 3, la muestra de El Sauzal; carril 4, El Gallo; carril 5, El Naranjo; carril 6, Presa ELZ.

## VIII.- DISCUSIÓN

Las concentraciones de coliformes fecales (CF) registradas en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales y en la presa durante los meses de junio-noviembre del 2016 sugieren que existe un buen sistema de tratamiento. Casi todas las muestras satisfacen los parámetros de las normas oficiales mexicanas para la descarga de aguas residuales en aguas y bienes nacionales según la norma oficial mexicana: NOM-001-SEMARNAT-1996, donde se consideran aceptables los valores de coliformes fecales menores a 2,000 NMP/100 mL. Sin embargo, la NOM-003-SEMARNAT-1997, establece que el agua para servicios al público con contacto directo deberá tener un máximo de coliformes fecales de 240 NMP/100 mL y para servicios al público con contacto indirecto u ocasional el límite máximo es de 1,000 NMP/100 mL.

Los análisis realizados del agua descargada del efluente El Sauzal satisfacen los parámetros de las normas oficiales mexicanas, concordando con otros estudios realizados en el 2008 y 2013 donde el efluente fue utilizado para riego agrícola en el valle de Guadalupe (Mendoza-Espinosa *et al.*, 2008; Acosta-Zamorano *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos de las dos plantas de tratamiento El Gallo y Noreste concuerdan con los datos proporcionados por CESPE y González-Moreno (2003) donde establecen que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por las normas nacionales antes mencionadas (CESPE, 2012; CESPE, 2016).

En la presa Emilio López Zamora se encontró presencia de coliformes fecales, pese a que se encuentra dentro de los parámetros establecidos por las normas mexicanas. Esto indica que se encuentra contaminada con materia fecal, probablemente proveniente de filtraciones de las viviendas que se encuentran cercanas a esta zona o a escurrimientos naturales por lechos contaminados con materia fecal de animales o humana. Según menciona Sardiñas-Peña en la presa del Cacao en Cuba, sus resultados microbiológicos obtenidos concuerdan con los resultados encontrados en este estudio, ya que este cuerpo de agua recibe vertimientos de las localidades aledañas (Sardiñas-Peña *et al.*, 2006). En un estudio similar en Nayarit, México, se analizaron muestras provenientes de la presa San Rafael encontrando que existió presencia de coliformes, al igual que este estudio (Avilés-Osuna *et al.*, 2013).

En la planta de tratamiento El Naranjo se observaron variaciones en los resultados, siendo que en el mes de septiembre se obtuvo concentraciones arriba de lo establecido por las normas oficiales mexicanas a comparación de los otros meses. Estos datos concuerdan con los análisis realizados por González-Moreno donde analizó muestras de efluentes de las plantas de El Gallo y El Naranjo obteniendo resultados muy similares en cuanto a la concentración de coliformes fecales (González-Moreno *et. al.* 2003). Cabe señalar que cuando se colectó en el mes de septiembre la muestra de agua de la pila 97 en Maneadero (efluente proveniente del Naranjo) tenía muy poca agua, quizá es por ello que presentó mayor número de coliformes fecales (> 1800 NMP/100 mL), además contenía una alta proporción de materia orgánica precipitada, lo que pudo aumentar el número de bacterias, aunque no se puede asegurar como se encontraban las bacterias con la pila llena de agua. Por ello se hace necesario tomar agua del efluente directamente en la planta El

Naranja para su análisis. Es importante contar con un monitoreo constante de las descargas de aguas residuales ya que algunas de estas aguas son utilizadas para el riego restringido de alfalfa, cebada, avena, flores, maíz y árboles frutales en el municipio de Ensenada, Baja California.

De acuerdo a Mendoza-Espinosa y colaboradores (2008) los resultados altos de coliformes observados en algunas estaciones de muestreo pueden ser causados por una cloración ineficiente. Metcalf & Eddy (1996) mencionan que la falta de calidad en una planta de tratamiento que lleve al incumplimiento de las diferentes normatividades, se puede deber a: 1) problemas provocados por fallas mecánicas como son los errores de diseño y fallas operativas, 2) problemas provocados por las cambiantes características del agua residual.

Por otro lado, es importante destacar que los efluentes de las aguas residuales de El Sauzal, Noreste y El Gallo van y desembocan al océano, donde el público realiza actividades recreativas y estos están expuestos a altas concentraciones de bacterias. Aunque se ha señalado que el agua de mar posee acción bactericida con respecto a *E. coli* (Carlucci et al., 1961) existen trabajos que señalan sobrevivencia de cepas de esta especie resistentes a antibióticos (Smith, 1974).

En el caso del agua de la presa que presentó coliformes totales y fecales es importante su monitoreo constante ya que en ocasiones es utilizada por la CESPE para proporcionar agua al público. Si bien dicha agua pasa por un proceso de

potabilización antes de ser enviada a los usuarios, es importante estar evaluando este cuerpo de agua y tomar algunas medidas con respecto a los efluentes de la población aledaña.

La detección de quistes de *Giardia lamblia* en los efluentes de las plantas de tratamiento estudiadas y el número de quistes cuantificados por la técnica de IFD osciló de 0 a 240 quistes/L para los efluentes con tratamiento secundario por lodos activados (El Gallo y El Sauzal) y de 0 a 360 quistes/L en el efluente de tratamiento terciario por filtración rápida por arena y antracita (El Naranjo). Estas concentraciones de quistes fueron variables en las estaciones de muestreo y en los meses de estudio, observándose el mayor número en el mes de julio (360 quistes/L) en el efluente de El Naranjo. Previos estudios realizados en plantas de tratamiento de Canadá, España e Italia determinaron que la mayor concentración de quistes de *G. lamblia* fue a finales de verano y principios de otoño y las concentraciones más bajas se observaron en invierno (Wallis *et al.*, 1996; Caccio *et al.*, 2003; Castro-Hermida *et al.*, 2008; Taran *et al.*, 2015).

Los resultados de las concentraciones de los quistes en los efluentes están de acuerdo con reportes en varias partes del mundo tales como en Brasil donde la concentración de quistes en el efluente de tratamiento secundario tratado con lodos activados varió entre 2-898 quistes/L y 1100 quistes/L (Urbano-Santos *et al.*, 2004; Cantusio-Neto *et al.*, 2006) y en África donde se reportan concentraciones de quistes de *G. lamblia* entre 100-240 quistes/L en aguas con tratamiento secundario de lodos activados (Khouja *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en el efluente de El Naranjo, con tratamiento terciario con filtración rápida por arena y antracita fueron mayores a los obtenidos en otros estudios realizados en Israel donde se utilizó el mismo tratamiento terciario obteniendo 0,02-7,75 quistes/L (Taran *et al.*, 2015) a los obtenidos en este estudio de 0-360 quistes/L. En general los valores reportados de número de quistes/L en aguas residuales varía mucho, quizá pueda deberse a los cuidados en el tipo de tratamiento, número de habitantes de la población, localidad, condiciones de la planta, parámetros ambientales y físico-químicos, etc. Ya que podemos observar que en los diferentes tratamientos como es el tratamiento secundario se reportan desde 0-500 quistes/L, con tanques de estabilización de 0-30 quistes/L, lodos activados de 22-2300 quistes/L, con filtros biológicos 40 quistes/L, con filtros de arena 2-18 quistes/L. Siendo los lodos activados los de mayor número de quistes (Naser *et al.*, 2012).

La detección de *Giardia lamblia* mediante la técnica de inmunofluorescencia (IFA) ha demostrado una mayor identificación de quistes en comparación con los ensayos basados en el ADN en aguas residuales, según estudios realizados en Alemania, Estados Unidos, Italia, Noruega, Portugal e Irán (Caccio *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2006a; Bertrand y Schwartzbrod, 2007; Katajima *et al.*, 2014; Gallas-Lindemann *et al.*, 2016; Hatam *et al.*, 2016). Estos datos concuerdan con un estudio en Hungría en muestras de aguas residuales en la que IFA reveló quistes de *Giardia* en el 67% de las muestras y de *Cryptosporidium* en el 42%, mientras que con técnicas de ADN se detectó *Giardia* en el 36% de las muestras y *Cryptosporidium* en 28% (Plutzer *et al.*, 2008). Otro estudio comparativo determinó que de 185 muestras analizadas de

aguas residuales de efluentes de plantas de tratamiento se detectó *Giardia* en un 92% por IFA y 39.7% por PCR anidado (Gallas-Linderman *et al.*, 2016).

El caso de la técnica de PCR, se ha señalado que es una técnica capaz de detectar un patógeno sea bacteria o protozoario, así como que es capaz de amplificar una sola cadena de ADN y que se ha reportado tener ventajas sobre la técnica de inmunofluorescencia, por su sensibilidad y de tener la capacidad de diferenciar las especies o genotipos (especificidad) sin embargo, presenta ciertas desventajas, ya que puede ser susceptible al efecto de diversos inhibidores presentes en las muestras tales como ácido fulvicos, húmico, polisacáridos de cianobacterias y el reducido número de quistes presentes en las muestras, todo ello ocasiona una disminución en la efectividad de esta técnica (Tebbe y Vahjen, 1993; Loge *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2005; Plutzer *et al.*, 2010).

Los métodos utilizados en el presente estudio para eliminar o reducir las sustancias inhibitoras en el PCR, fueron la utilización de lavados de las muestras con amortiguador de fosfatos y agua esterilizada (Guy *et al.*, 2003). Además, se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) durante la reacción de PCR, ya que mejora la sensibilidad de la taq polimerasa, sin lograr resultados positivos (Kreader, 1996; Robertson *et al.*, 2006b; Kitajima *et al.*, 2014).

Para la purificación de ADN se trataron métodos de liofilizado de las muestras, ciclos de congelamiento a -80°C y descongelamiento por 5 min a 56°C para romper

la membrana del quiste de *Giardia lamblia* y el uso de polivinil pirrolidona (PVP) durante la extracción de ADN. Aunque se logró extraer ADN de calidad no se logró amplificación por PCR (Sulaiman *et al.*, 2004; Plutzer *et al.*, 2008; Sroka *et al.*, 2013).

Pese a la utilización de diferentes técnicas de eliminación de inhibidores de la reacción de PCR, como se señaló en párrafos anteriores, no se obtuvieron resultados positivos en las muestras ambientales utilizadas en este estudio, sin embargo, es muy probable que algún inhibidor haya estado presente ya que otros estudios han utilizado los mismos cebadores de Hopkins para la región pequeña ribosomal 16 SSU rDNA (RH11 y RH4) con resultados positivos, mismos que se utilizaron en este trabajo. Utilizando estos cebadores se diferenciaron los genotipos de *Giardia lamblia* A y B (Plutzer *et al.*, 2008). En Canadá se detectó *Giardia* en muestras provenientes de aguas residuales, heces humanas, perros, gatos, animales de granja y salvajes, de todos estos análisis encontraron la presencia de los genotipos A y B (Van Keulen *et al.*, 2002). Otro factor que pudiera haber afectado en la amplificación de PCR fue que el fragmento amplificado era muy rico en las bases nucleotídicas guanina y citosina (G-C) con un 75.55%, haciendo ello que la desnaturalización del ADN no se hiciera correctamente, impidiendo que los cebadores no se unieran al ADN para que la polimerasa amplificará las cadenas.

Algunos investigadores recomiendan para la purificación de ADN de aguas tratadas, la utilización de perlas inmuno-magnéticas (IMS) que eliminan o reducen en gran medida las sustancias que podrían ser inhibidores de la amplificación por PCR y permiten la concentración específica de los microorganismos de interés (Rochelle *et*

*al.*, 1997), además de utilizar el PCR recomiendan usar la técnica de inmunofluorescencia directa (FITC) para obtener mejores resultados (Mccuin y Clancy, 2003; Plutzer *et al.*, 2008; Khouja *et al.*, 2010).

La transmisión de *Giardia lamblia* a través de los suministros de agua potable que no cumplen con las normas de calidad demuestra que las tecnologías de tratamiento del agua son inadecuadas. Además el encontrar resultados de coliformes fecales negativos no garantiza que el agua esté libre de patógenos para el ser humano (Carraro *et al.*, 2000). La EPA (Environmental Protection Agency, USA) señala que no existe una correlación entre la concentración de coliformes fecales y los quistes de *Giardia*, además reporta que los niveles de *Giardia* en aguas de drenaje sin tratar oscila entre 10,000 a 100,000 quistes/L, mientras que en las aguas de drenaje tratadas oscila entre 10 a 100 quistes/L y de 10 quistes o menos en aguas superficiales o agua entubada del servicio público (EPA, 2000). Sin embargo, otros estudios si relacionan la presencia de quistes de *Giardia* con coliformes fecales, enterococos y *E. coli* (Coupe *et al.*, 2006).

Se ha reportado la presencia de *Giardia* en agua de mar (Graczyk *et al.*, 2010) sin embargo, no se encontró información que señale la capacidad de sobrevivencia de los quistes en estas aguas. Se sabe que *Giardia* en su forma de quiste es capaz de sobrevivir de 2 a 3 meses en agua con temperatura menor a 10°C y un mes en agua a 21°C. Por otro lado, se han encontrado quistes de *Giardia* en mejillones y en áreas de leones marinos en costas de California, Estados Unidos (E.U.) (American Society for Microbiology, 2014). Asimismo, Adell *et al.*, 2016, reportan *Giardia* en la costa

de Santa Cruz California, E.U. y en nutrias que nadan en diferentes zonas de esta costa, relacionando mayor incidencia en donde se descargan aguas residuales.

Se ha encontrado que en zonas donde se descargan aguas tratadas o parcialmente tratadas se encuentran bacterias y parásitos de origen antropogénico, así podemos citar al estudio realizado en el mar mediterráneo donde plantas de tratamiento descargan a la costa 89 millones de litros por día, las plantas están sobresaturadas debido a que provienen de una población de 1.6 millones de habitantes de la ciudad de Gaza. En este estudio se encontraron a los parásitos de *Giardia*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Hymenolepis nana*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium parvum* (Hilles et al., 2014).

El estudio de *Giardia* en aguas costeras es importante, debido a que se ha demostrado que en aguas contaminadas los bañistas son susceptibles a una infección. Inclusive se ha encontrado que, en playas muy concurridas sin efluentes de aguas continentales, es el mismo bañista quien contribuye a la contaminación de patógenos de origen humano (Graczyk et al., 2010).

El presente estudio es importante debido a que demuestra la presencia de *Giardia* en los efluentes de las plantas de tratamiento de la ciudad de Ensenada Baja California que descargan a la zona costera o que son reusadas para otros fines, sin embargo, es necesario hacer muchos más muestreos para evaluar la calidad del agua, además se recomienda que se monitoreen constantemente las zonas costeras donde concurren los bañistas.

## IX.- CONCLUSIÓN

1. Se detectaron quistes de *G. lamblia* por el método de inmunofluorescencia directa (IFD) en los efluentes de las plantas de tratamiento de El Gallo, El Naranjo y El Sauzal los meses de julio a noviembre de 2016.
2. El mayor número de quistes correspondió al mes de julio en el efluente de El Naranjo con 360 quistes/L.
3. No se logró la detección de *Giardia lamblia* por la técnica de PCR utilizando el gen ribosomal de la subunidad 16s en las muestras provenientes de los efluentes de las plantas de tratamiento y de la presa, posiblemente debido a inhibidores presentes en las muestras ó a que el fragmento a amplificar contenía un 75.55% de G-C.
4. La técnica de IFD resultó más sensible para la detección y cuantificación de *G. lamblia* que la técnica de PCR.
5. Las concentraciones de coliformes totales y fecales por la técnica del número más probable en las muestras provenientes de los efluentes de las plantas de tratamiento estuvieron dentro de los valores que establece la norma oficial mexicana (NOM-003-SEMARNAT-1997) de menor a 1000 CF/100 mL para aguas que tendrán un contacto indirecto u ocasional con el ser humano, excepto en el efluente de El Naranjo, que en el mes de septiembre presentó coliformes fecales y totales por arriba de 1800 NMP/100 mL.
6. El efluente de El Naranjo presentó coliformes fecales y totales por arriba de 1800 NMP/100 mL.
7. La presencia del protozooario *G. lamblia* en los efluentes de aguas residuales indica que los tratamientos no son eficaces en su eliminación, sin embargo, los valores bajos de coliformes nos indica que en cuanto a control bacteriológico si es suficiente.

## X.- BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Zamorano D, Macías-Carranza V, Mendoza-Espinosa L, Cabello-Pasini (2013). Efecto de las aguas residuales tratadas sobre el crecimiento, fotosíntesis y rendimiento en vides tempranillo (*Vitis vinifera*) en Baja California, México. *Agrociencia*, 47: 753-766
- Adam R (1991). The biology of *Giardia* spp. *Microbiological Rev*, 55: 706-732
- Adam R (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology*, 14: 447-475
- Adam R, Dahlstrom E, Martens C, Bruno D, Barbian K, Ricklefs S, Hernandez M, Narla N, Patel R, Porcella S, Nash T (2013). Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biology*, 5: 2498-2511
- Adam R, Nash T, Wellems T (1988). The *Giardia lamblia* trophozoite contains sets of closely related chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 16: 4555-4567
- Adell AD, McBride G, Wuertz S, Conrad PA and Smith WA. (2016). Comparison of human and southern sea otter (*Enhydra lutris bereis*) health risks for infection with protozoa in nearshore waters. *Water Res*, 104: 220-230
- Aggarwal A, Nash T (1988). Antigenic variation of *Giardia lamblia* in vivo. *Infection and Immunity*, 56: 1420-1423
- American Society for Microbiology, news. (2014) California mussels contaminated with *Giardia*. *Marine Pollution Bull*, 89: 1-4

- Ajonina C, Buzie C, Otterpohl R (2013). The detection of *Giardia* cysts in a large-scale wastewater treatment plant in Hamburg, Germany. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 76: 509-514
- Appelbee A, Thompson A, Olson M (2005). *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife – current status and future needs. *Trends in Parasitology*, 21: 370-375
- Appelbee A, Thompson A, Measures M, Olson M (2010). *Giardia* and *Cryptosporidium* in harp and hooded seals from the Gulf of St. Lawrence, Canada. *Veterinary Parasitology*, 173: 19-23
- Assavasilavasukul P, Lau B, Harrington G, Hoffman R, Borchardt M (2008). Effect of pathogen concentrations on removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* by conventional drinking water treatment. *Water Research*, 42: 2678-2690
- Ausbel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K (2002). Short protocols in molecular biology, 1: 11.
- Avilés-Osuna C, Sánchez-Rodríguez M, Calvario-Martínez O (2013). Evaluación microbiológica del agua y su impacto sobre el cultivo de tilapia (*Oreochromis nilotiucs*) en la presa San Rafael, Nayarit. XX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar, 1-9
- Barigye R, Dyer N, Newell T, Khaita M, Trout J, Santin M, Fayer R (2008). Molecular and immunohistochemical detection of assemblage E, *Giardia duodenalis* in scouring North Dakota calves. *Veterinary Parasitology*, 157: 196-202
- Barrientos-Galarza P, Cruz-Torrico M, Suárez-Barrientos E (2008). Detección de *Cryptosporidium* spp y *Giardia lamblia* en niños inmunodeprimidos del hospital del

niño Manuel Ascencio Villarreal de Cochabamba en agosto del 2007. Gaceta Médica Boliviana, 45-49

Beck R, Sprong H, Pozio E, Caccio S (2012). Genotyping *Giardia duodenalis* isolates from dogs: Lessons from a multilocus sequence typing study. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 12, 206-213

Belosevic M, Craik S, Stafford J, Neumann N, Kruithof J, Smith D (2001). Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation. Microbiology Letters, 24: 197-203

Bertram M, Meyer E, Lile J, Morse S (1983). A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. The Journal of Parasitology, 69: 793-801

Bertrand I, Schwartzbrod J (2007). Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: Relation between assemblages and fecal contamination origin. Water Research, 41: 3675– 3682

Betancourt W, Rose J (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Veterinary Parasitology, 126: 219-234

Bingham A, Jarroll E, Meyer E, Radulescu S (1975). *Giardia* spp. physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. Experimental Parasitology, 47: 284-291

Bogomolni A, Gast R, Ellis J, Dennett M, Pugliares K, Lentell B, Moore M (2008). Victims or vectors: a survey of marine vertebrate zoonosis from coastal waters of the Northwest Atlantic. Diseases of Aquatic Organisms, 81: 13-28

- Byrd L, Conrad J, Nash T (1994). *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infection and Immunity*, 62: 3583-3585
- Cabello R (2007). *Microbiología y parasitología humana*. México, Editorial Médica Panamericana. 3 ed.
- Caccio S, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E (2008). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal of Parasitology*, 38: 1523-1531
- Caccio S, Beck R, Almeida A, Bajer A, Pozio E (2010). Identification of *Giardia* species and *Giardia duodenalis* assemblages by sequence analysis of the 5.8S rDNA gene and internal transcribed spacers. *Parasitology*, 137: 919-925
- Caccio S, Giacomo M, Aulicino F, Pozio E (2003). *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3393-3398
- Caccio S, Ryanb U (2008). Review molecular epidemiology of Giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160: 75-80
- Calderón-Pascasio R (2007). *Curso de Inmunoquímica*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 57 p
- Cantusio-Neto R, Santos J, Franco R (2006). Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and *Cryptosporidium* oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. *Water Science and Technology*, 54: 89-94
- Carlucci AF, Scarpino PV, Pramer D. Evaluation of factors affecting survival of *Escherichia coli* in sea water. *Appl Microbiol*, 9: 400-404

- Carmena D (2010). Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: Detection, surveillance and implications for public health. Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 3-14
- Carranza P, Feltes G, Ropolo A, Quintana S, Touz M, Luján H (2002). Simultaneous Expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. Infection and Immunity, 70: 5265-5268
- Carraro E, Fea E, Salva S, Gilli G (2000). Impact of a wastewater treatment plant on *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts occurring in a surface water. Water Science and Technology, 41: 31-37
- Castro-Hermida J, Almeida A, González-Warleta M, Correia da Costa J, Rumbo-Lorenzo C, Mezo M (2007). Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. Parasitol Res, 101: 1443-1448
- Castro-Hermida J, García-Preedo I, Almeida A, González-Warleta M, Correia Da Costa J, Mezo M (2008). Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. Water Research, 42: 3528-3528
- Cedillo-Rivera R, Darby J, Enciso-Moreno A, Ortega-Pierres G, Ey P (2003). Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. Parasitol Res, 90: 119-123
- CESPE (2012). Saneamiento en Ensenada, Baja California. VIII Encuentro Nacional de playas limpias: 18 p

- CESPE (2016). Infraestructura. <http://www.cespe.gob.mx/index.php/cespe/infraestructura/>.
- Cheng H, Shieh Y (2000). Investigation on subclinical aspects related to intestinal parasitic infections among Thai Laborers in Taipei. *Journal of Travel Medicine*, 7: 319-324
- Cherkasova E, Laassri M, Chizhikov V, Korotkova E, Dragunsky E, Agol V, Chumakov K (2003). Microarray analysis of evolution of RNA viruses: Evidence of circulation of virulent highly divergent vaccine-derived polioviruses. *PNAS*, 100: 9398-9403
- Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov K, Levy D (2001). Microarray analysis of microbial virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3258-3263
- CONAGUA (2014). Inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales en operación. SEMARNAT, 308 p
- Cotton J, Beatty J, Buret A (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology*, 41: 925-933
- Coupe S, Delabre K, Pouillot R, et al. (2006). Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon* *bieneusi* in surface water, including recreational areas; a one-year prospective study. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 47:351-359
- Dobell C (1920). The discovery of the intestinal protozoa of man. *Proc R Soc Med*, 13: 1-15
- Dowd S, John D, Eliopolus J, Gerba C, Naranjo J, Klein R, López B, Mejía M, Mendoza C, Pepper I (2003). Confirmed detection of *Cyclospora cayetanesis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used for drinking. *Journal of Water and Health*, 117-123
- Environmental Protection Agency, USA (2000). *Giardia*: Drinking water fact sheet. Office of Water (4304), 1-5

- Environmental Protection Agency, USA (2005). Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. Office of Water (4607) EPA 815-R-05-002: 76 p
- Erickson M, Ortega I (2006). Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection*, 69: 2786-2808
- Erlandsen S, Bemrick W, Pawley J (1989). High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *Journal of Parasitology*, 75: 787-797
- Erlandsen S, Bemrick W, Schupp D, Shields J, Jaerroll E, Sauch J, Pawley J (1990). High-resolution immune gold localization of *Giardia* cyst walls antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 38: 625-632
- Erlandsen S, Macechko P, Van Keulen H, Jarroll E (1996). Formation of the *Giardia* cyst wall: Studies on extracellular assembly using immune gold labeling and high resolution field emission SEM. *Journal Eukaryote Microbiology*, 43: 416-429
- Falabi J, Gerba C, Karpiscak M (2002). *Giardia* and *Cryptosporidium* removal from wastewater by a duckweed (*Lemna gibba* L.) covered pond. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 34: 384–387
- Falkenmark M (1989). The massive water scarcity now threatening Africa. *Royal Swedish Academy of Sciences*, 18: 112-118
- Feng Y, Xiao L (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* spp and giardiasis. *Clinical Microbiology*, 24: 110-140

- Finch G, Black E, Labatiuk C, Gyurek L, Belosevic M (1993). Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3674-3680
- Fraser D, Bilenko N, Deckelbaum R, Dagan R, El-On J, Naggan L (2000). *Giardia lamblia* carriage in Israeli Bedouin infants: Risk factors and consequences. *Clinical Infections Diseases*, 30: 419-424
- Fricker C, Medema G, Smith H (2002). Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. World Health Organization, 70-118
- Fu C, Xie X, Huang J, Zhang T, Wu Q, Chen J, Hu H (2013). Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. *Water Science & Technology*, 1589-1600
- Gallas-Lindemann C, Sotiriadou I, Plutzer J, Noack M, Mahmoudi M, Karanis P (2016). *Giardia* and *Cryptosporidium spp.* dissemination during wastewater treatment and comparative detection via immunofluorescence assay (IFA), nested polymerase chain reaction (nested PCR) and loop mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Tropica*, 158: 43-51
- Gerardi MH & Zimmernan MC (2005). Wastewater pathogens, Wastewater Microbiology series. Editorial Wiley-Interscience. 190 p
- Geurden T, Vanderstichel R, Pohle H, Ehsan A, Von Samson-Himmelstjerna G, Morgane E, Camuset P, Capelli G, Vercruyse J, Claerebout E (2012). A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Veterinary Parasitology*, 190: 383-390

- Gillin F, Reiner D, McCaffery M (1996). Cell Biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol*, 50: 679-705
- Glynn H, Gary H, Burton I, Hare K, Hutchinson T, Mackay D, Moroz W, Munn R, Runnalls O (1999). *Ingeniería Ambiental*. 2da ed, Editorial Pearson, México.
- González Moreno L (2003). Contaminación microbiológica en la zona costera adyacente a la descarga El Naranjo/El Gallo en Bahía Todos Santos, B.C. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Tesis de Oceanología. 60 p.
- Graczyk TK, Sunderland D, Awantang GN, et al. (2010). Relationships among bather density, levels of human waterborne pathogens, and fecal coliform counts in marine recreational beach water. *Parasitol Res*, 106:1103-1108.
- Guy R, Payment P, Krull U, Horgen P (2003). Real-Time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5178-5185
- Haas C, Kaymak B (2003). Effect of initial microbial density on inactivation of *Giardia muris* by ozone. *Water Research*, 37: 2980-2988
- Hatam K, Mohebbali M, Mahvi A, Keshavarz H, Mirjalali H, Rezaei S, Meamar A, Rezaeian M (2016). Subtype analysis of *Giardia duodenalis* isolates from municipal and domestic raw wastewaters in Iran. *Environ Sci Pollut Res*, 1-8
- Hijnen W, Beerendonk E, Medema G (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan oocysts in water: A review. *Water Research*, 40: 3-22

- Hilles AH, Al Hindi AI and Abu Safieh YA. (2014). Assessment of parasitic pollution in the coastal seawater of Gaza city. *J Environ Health Sci & Eng*, 12 (26): 1-10
- Homana W, Mank T (2001). Human giardiasis: Genotype linked differences in clinical symptomatology. *International Journal for Parasitology*, 31: 822-826
- Hopkins R, Meloni B, Groth D, Wetherall J, Reynoldson J, Thompson A (1997). Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *American Society of Parasitology*, 83: 44-51
- Huntera P, Thompson R (2005). The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 35: 1181-1190
- Isaac-Renton J, Cordeiro C, Sarafis K, Shahria H (1993). Characterization of *Giardia duodenalis* Isolates from a Waterborne Outbreak. *Infection Diseases*, 167: 431-440
- Isaac-Renton J, Lewis L, Ong C, Nulsen M (1994). A second community outbreak of waterborne giardiasis in Canada and serological investigation of patients. *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 395-399
- Jiang J, Alderisio K, Singh A, Xiao L (2005). Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1135-1141
- Johnston A, Gillespie T, Rwego I, Tranby T, Kent A, Goldberg T (2010). Molecular epidemiology of cross-species *Giardia duodenalis* transmission in Western Uganda. *Plos ONE*, 4: 1-7

- Kabnick K, Peattie D (1990). In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *Journal of Cell Science*, 95: 353-360
- Karanis P (2006). A review of an emerging waterborne medical important parasitic protozoan. *Japanese Journal of Protozoology*, 39: 5-19
- Karl T, Knight R (1997). Secular trends of precipitation amount, frequency, and intensity in the United States. *American Meteorological Society*, 231-241
- Khana S, Debnath C, Pramani A, Xiao L, Nozaki T, Ganguly S (2011). Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Veterinary Parasitology*, 178: 342-345
- Khouja L, Cama V, Xiao L (2010). Parasitic contamination in wastewater and sludge samples in Tunisia using three different detection techniques. *Parasitol, Res* 107: 109-116
- Kitajima M, Haramoto E, Iker B, Gerba C (2014). Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Science of the Total Environment*, 484: 129-136
- Kofoid C, Christiansen E (1915). On binary and multiple fission in *Giardia muris* (Grassi). *University of California Publications in Zoology*, 16: 30-54
- Kofoid C, Christiansen E (1920). A critical review of the nomenclature of human intestinal *Flagellates*, *Cercomonas*, *Chilomastix*, *Trichomonas*, *Tetratrichomonas*, and *Giardia*. *University of California Publications in Zoology*, 20: 142-168
- Kreader C (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1102-1106

- Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, Haas W, Hermans P, Martín C, Palittapongarnpim P, Plikaytis B, Riley I, Yakrus M, Musser J, Van embden J (1999). Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 2607-2618
- Kudo R (1985). *Protozoología*. Editorial Continental, México, DF. 905 p
- Lagana S (2010). *Atlas of human intestinal protozoa microscopic identification*. Medical ITC
- Lasek E, Bogomolni A, Gast R, Mark D, Ellis J, Sogin M, Moore M (2008). Molecular characterization of *Giardia intestinalis* haplotypes in marine animals: variation and zoonotic potential. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81: 39-51
- Lasek E, Mark D, Sogin M (2009). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of population biology in marine systems. *International Journal for Parasitology*, 40: 1063-1074
- Le Blancq S, Adam R (1998). Structural basis of karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 97: 199-208
- Lebbad M, Mattson J, Christenson B, Ljungstromd B, Backhans A, Anderson J, Svard G (2010). From mouse to moose: Multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary Parasitology*, 168: 231-239
- Lee G, Nama S Chae J, Lee C (2009). *Giardia duodenalis*: Improved detection of viable cysts by reverse transcription-PCR of heat shock-inducible hsp70 gene. *Experimental Parasitology*, 123: 377-380

- Leonhard S, Pfister K, Beelitz P, Wielinga P, Thompson P (2007). The molecular characterization of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Veterinary Parasitology*, 150: 33-38
- Li J, Zhang P, Wang P, Alsarakibi M, Zhu H, Liu Y, Meng X, Li J, Guo J, Li G (2012a). Genotype identification and prevalence of *Giardia duodenalis* in pet dogs of Guangzhou, Southern China. *Veterinary Parasitology*, 188: 368-371
- Li N, Xiao L, Wang L, Zhao S, Zhao X, Duan L, Guo M, Liu L, Feng Y (2012b). Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* by genotyping and subtyping parasites in wastewater. *Plos ONE*, 6: 1-11
- Loge F, Thompson D, Call D (2002). PCR detection of specific pathogens in water: A risk-based analysis. *Environmental Science & Technology*, 36: 2754-2759
- Mahbubani M, Schaefer F, Jones D, Bej A (1998). Detection of *Giardia* in environmental waters by immuno-PCR amplification methods. *Current Microbiology*, 36: 107-113
- Maldonado R, Mercedes E Jiménez E (1998). *Biología molecular en medicina*. Editorial Limusa, México, DF,
- McCuin R, Clancy J (2003). Modifications to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 267-274
- McGlade T, Robertson I, Elliot A, Thompson A (2003). High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Veterinary Parasitology*, 110: 197-205

- Mendoza-Espinosa L, Cabello-Pasini A, Macias-Carranza V, Daessle W, Orozco-Borbón M, Quintanilla-Montoya A (2008). The effect of reclaimed wastewater on the quality and growth of grapevines. *Water Science & Technology*, 57.9: 1445-1450
- Metcalf and Eddy (1998). *Ingeniería de aguas residuales tratamiento vertido y reutilización*. Editorial Mc Graw-Hill. 3ra ed.
- Mintz E, Hudso M, Mshar P, Cartter Matthew, Hadler J (1993). Foodborne Giardiasis in a corporate office setting. *The Journal Infectious Diseases*, 167: 250-253
- Monis P, Andrews R, Mayrhofer G, Ey P (2003). Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 3: 29-38
- Morales Chavez R. (1984). *Colimetría en descargas de aguas industriales, domésticas y en la zona de rompientes de la bahía de Todos Santos, B.C.* Tesis de Oceanología, FCM-UABC. 42 p.
- Morgan U (2000). Detection and characterization of parasites causing emerging zoonosis. *International Journal for Parasitology*, 30: 1407-1421
- Mota P, Rauch C, Edberg S (2000). Microsporidia and cyclospora: epidemiology and assessment of risk from the environment. *Critical Reviews in Microbiology*, 26: 69-90
- Nash T (1997). Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *The Royal Society*, 352: 1369-1375
- Nasser A, Vaizel D, Aharoni A, Revhun M (2012). Prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants. *Applied Microbiology*, 1-8

- Norma Oficial Mexicana (NMX-AA-042-SCFI-2015). Análisis de agua - enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* – método del número más probable en tubos múltiples (cancela a la NMX-AA-42-1987). Secretaria de Salud, 1-29
- Olivas E (2012). Manual de prácticas laboratorio de parasitología clínica. Universidad Autónoma de Cd Juárez, 1-29
- Olson M, Roach P, Stabler M, Chan W (1997). Giardiasis in Ringed Seals from the Western Artic. *Journal of Wildlife Diseases*, 33: 646-648
- Paintlia A, Descoteaux S, Spencer B, Chakraborti A, Ganguly N, Mahajan R, Samuelson J (1998). *Giardia lamblia* groups A and B among young adults in India. *Clinical Infections Diseases*, 26: 190-191
- Peña Manjarrez JL. (1987). Contribución al estudio de fuentes de contaminación por materia orgánica y sus aportes a la bahía de Todos Santos, B.C. Tesis de Oceanología. 69 p.
- Pérez Morga, N. (2004). Características de la circulación y dispersión de contaminantes frente al arroyo El Gallo, en la Bahía de Todos Santos, B.C., México. Tesis de Maestría, FCM-UABC. 123 p
- Plutzer J, Ongerth J, Karanis P (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal for Hygiene and Environmental Health*, 213: 321-333
- Plutzer J, Karanisb P, Domokosa K, Torokne A, Márialigetid K (2008). Detection and characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and

- sewage water samples by IFT, PCR and sequence analysis of the SSUrRNA and GDH genes. *International Journal Hygiene and Environmental Health*, 211: 524-533
- Ponce-Macotella M, Peralta-Abarca G, Martínez-Gordillo M (2005). *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: Prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. *Veterinary Parasitology*, 131: 1-4
- Rangel L, Kattenbach W, Diniz J, De Souza W (1999). Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. *FEMS Microbiology Letters*, 181: 245-251
- Reiner D, Douglas H, Gillini F (1989). Identification and localization of cyst-specific antigens of *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity*, 57: 963-968
- Roach D, Olso M, Whitley G, Wallis P (1993). Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 67-73
- Robertson L, Forberg T, Hermansen L, Hamnes I, Gjerde B (2007). *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: Genetic characterization by PCR-RFLP and sequence analysis at two genes. *Journal of Wildlife Diseases*, 43: 576-585
- Robertson L, Gjerde B, Furuseth E (2010). The zoonotic potential of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian sheep: A longitudinal investigation of 6 flocks of lambs. *Veterinary Parasitology* 171: 140-145
- Robertson L, Hermansen L, Gjerde B (2006a). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5297-5303

- Robertson L, Hermansen L, Gjerde B, Strand E, Alvsvag J, Langeland N (2006b). Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during Autumn and Winter 2004. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2212-2217
- Rochelle P, Leon R, Stewart M, Wolfe R (1997). Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 106-114
- Rose J, Landeen L, Riley K, Geba C (1989). Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 3189-3196
- Samie A, Ntekele P (2014). Genotypic detection and evaluation of the removal efficiency of *Giardia duodenalis* at municipal wastewater treatment plants in Northern South Africa. *Tropical Biomedicine*, 31: 122-133
- Sardiñas-Peña O, Chiroles-Rubalcaba S, Fernández-Novo M, Hernández-Rodríguez Y, Pérez-Cabrera A (2006). Evaluación físico-química y microbiológica del agua de la presa El Cacao (Cotorro, Cuba). *Higiene y sanidad ambiental*, 6: 202-206
- Schuster F, Visvesvara G (2004a). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34: 1001-1027
- Schuster F, Visvesvara G (2004b). Review opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug resistance updates*, 7: 41-51
- Secretaria de Salud (2015). Notificación de casos nuevos de enfermedades. 1-165

- Shields J, Olson B (2003). Review article *Cyclospora cayetanensis*: A review of an emerging parasitic coccidian. *International Journal for Parasitology*, 33: 371-391
- Smith H, Caccio S, Tait A, McLauchlin J, Thompson A (2006). Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology*, 22 (4): 160-167.
- Smith W (1974). Survival of R+ *Escherichia coli* in sea water. *Appl. Microbiol*, 27 (5):983-984.
- Soave R (1996). *Cyclospora*: An overview. *Oxford Journals*, 23: 429-435
- Sogin M, Gunderson J, Elwood H, Alonso R, Peattie D (1998). Phylogenetic meaning of the kingdom concept: An unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*, 243: 75-77
- Soltys B, Falah M, Gupta R (1996). Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to BiP. *Journal of Cell Science*, 109: 1909-1917
- Soukhathammavong P, Sayasone S, Nirina A, Akkhavong A, Thammasack S, Phoumindr N, Choumlivong K, Choumlivong K, Keoluangkhot V, Phongmany S, Akkhavong K, Hatz C, Strobel M, Odermatt P (2008). Case report: three cases of intestinal capillariasis in Lao Peoples Democratic Republic. *Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 735-738
- Sroka J, Stojacki K, Zdybel J, Karamon J, Cencek T, Dutkiewicz J (2013). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in effluent from sewage treatment plant from Eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*, 1: 57-62

- Stiles CW. (1902). The type-species of certain genera of parasitic flagellates, particularly Grassi's genera of 1879 and 1881. *Zoologischer Anzeiger*, 25: 689-695.
- Stiller J, Hall B (2000). Long-branch attraction and the rDNA model of early eukaryotic evolution. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16: 1270-1279
- Sulaiman I, Jiang J, Singh A, Xiao L (2004). Distribution of *Giardia duodenalis* genotypes and subgenotypes in raw urban wastewater in Milwaukee, Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3776-3780
- Svard S, Meng T, Hetsko M, McCaffery M, Gillin F (1998). Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular Microbiology*, 30: 979-989
- Tan L, Wu S, Yusuf A, Yu X, Hu W, Song M, Shi X, Li G (2016). PCR-RFLP method to detect zoonotic and host-specific *Giardia duodenalis* assemblages in dog fecal samples. *Parasitol Res*, 1-6
- Tanahara Romero TYA (1996). Variabilidad espacio temporal de bacterias coliformes en la bahía de Todos Santos, B.C. Tesis de Oceanología, FCM-UABC. 71p.
- Taran M, Ofer N, Dalit V, Aharoni A, Rebhun M, Nitzan Y, Nasser A (2015). *Cryptosporidium* and *Giardia* removal by secondary and tertiary wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health*, 50: 1265-1273
- Tebbe C, Vahjen W (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2657-2665

- Thompson A (2004). Review the zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 126: 15-35
- Thompson R, Ash R (2015). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetic and Evolution*, 40: 315-323
- Tibayrenc M, Ayala F (2014). *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* genetic variability: cryptic biological species or clonal near-clades. *Plos ONE* 10: 1-6
- Traub R, Monis P, Robertson I, Irwin P, Mencke N, Thompson R (2004). Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitology*, 128: 253-262
- Uehlinger F, Barkema H, Dixon B, Coklin T, O'Handley R (2006). *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a veterinary college bovine teaching herd. *Veterinary Parasitology*, 142: 231-237
- Urbano-Santos L, Rondello T, Cantusio R, Bueno-Franco R (2004). Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, sp, Brazil. *Revista Instituto Medico Tropolitano de Sao Pablo*, 46: 309-313
- Van Keulen H, Macechko T, Wade S, Schaaf S, Wallis P, Erlandsen S (2002). Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 108: 97-107
- Von G (2003). Ozonation of drinkingwater: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research* 37: 1469-1487

- Wallis P, Erlandsen S, Isaac-Renton J, Olson M, Robertson W, Van keulen H (1996). Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. Isolated from drinking water in Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2789-2797
- Wang Z, Vora G, Stenger D (2004). Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by oligonucleotide microarray. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3262-3271
- Xiao L, Fayer R (2008). Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38: 1239-1255
- Yang R, Reid A, Lyubery AJ, Ryan U. (2010). Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish. *International Journal for Parasitology*, 40: 779-785