



Solutions for environment and development
Soluciones para el ambiente y desarrollo

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE
INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
ESCUELA DE POSGRADO

**Evaluación del uso de fagos de *Bacteroides* como indicadores
para la discriminación de la fuente de contaminación de origen
fecal del agua, en la cuenca del río Bogotá, Colombia**

Por:

Angela María Sastoque

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado
como requisito para optar por el grado de

Magister Scientiae en Manejo y Gestión Integral de Cuencas Hidrográficas

Turrialba, Costa Rica, 2010

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de

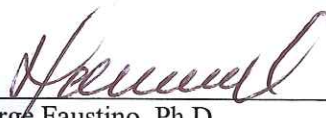
**MAGISTER SCIENTIAE EN MANEJO Y GESTIÓN INTEGRAL
DE CUENCAS HIDROGRÁFICAS**

FIRMANTES:

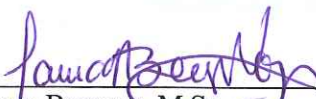


Francisco Jiménez, Dr.Sc.
Co-Director de tesis

María Claudia Campos, Ph.D.
Co-Directora de tesis

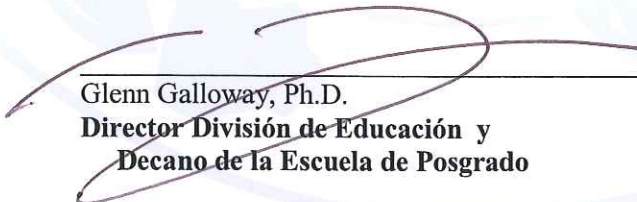


Jorge Faustino, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

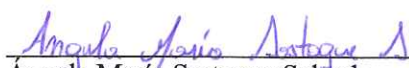


Laura Benegas, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Carmen Isabel Valiente, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
**Director División de Educación y
Decano de la Escuela de Posgrado**



Angela María Sastoque Salcedo
Candidata

DEDICATORIA

Le dedico esta tesis a Dios por ser mi fortaleza, guía y alegría para seguir cada día de mi vida de la mejor manera, dejándome llevar por el camino que Él tiene preparado para mí.

A mis padres Victoria y Germán, que siempre han sido mi apoyo y han estado conmigo en todos los momentos y decisiones que he tomado en mi vida.

A mis hermanas Mónica y Nidia, y mi sobrino Juan David, por sus valiosos consejos, apoyo y de cierta manera complicidad que hacen más fácil mi vida.

A la familia Arguedas Mora de Costa Rica, que son también mi familia, sin su apoyo, cariño y valiosísima amistad habría sido más complicado sacar adelante esta nueva etapa en mi vida.

A mis amigas y amigos, que son parte esencial de mi vida, al ofrecerme de manera incondicional su amistad, cariño y todo su apoyo en los momentos que más lo necesite, les retribuyó de igual manera todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Claudia Campos, por su paciencia y buena orientación en este trabajo.

Al Profesor Francisco Jiménez, Director de la maestría de Manejo y Gestión Integral de Cuencas Hidrográficas por su gran apoyo e interés durante todo el desarrollo de este trabajo, su buena actitud y perseverancia hicieron muy fácil la finalización de la tesis de grado.

A los miembros del comité consejero, Doctora Carmen Isabel Valiente, Doctor Jorge Faustino y MSc. Laura Benegas, por su disposición para orientar la investigación, sus comentarios y acertadas sugerencias.

A los miembros del Laboratorio de indicadores de calidad de agua de la Pontificia Universidad Javeriana en Bogotá, Colombia, por su buena disposición y ayuda en toda la fase de campo del proyecto; en especial a Milena Beltrán, que además de brindarme su ayuda incondicional, me ofreció su experiencia, conocimiento y tiempo para sacar adelante esta tesis, además de su linda amistad que valoró y apreció mucho.

Al personal que labora en el Matadero de Villapinzón, Finca ganadera San José en Nemocón, Planta de Tratamiento de Aguas Residuales El Salitre en Bogotá, Represa del Muña y Matadero de La Mesa, por su colaboración, disposición y tiempo prestado para tomar muestras en cada una de estas estaciones.

A mis compañeros de promoción y amigos, en especial a Patricia Rojas, Jhenny Salgado, Lorena Coronel, Gicela Maldonado y Diana García por ser amigas incondicionales, únicas y personas realmente valiosas que nunca olvidaré. Y a mis amigos Adriano Rosa Cruz, Wladimir Illescas, Ariel Amoroso, Edison Pimentel, Bill Miller, por estar siempre presentes cuando necesite de su amistad y hacer el paso por el CATIE más divertido y especial de lo que ya es.

A Mauricio Alejandro Jiménez, por ser mi amigo, mi apoyo y mi todo, no sólo en este proceso por el CATIE, sino en muchos momentos de mi vida y espero que siga siendo así.

Al personal de la Escuela de Postgrado por su permanente ayuda. Al personal de la Biblioteca Conmemorativa Orton por su constante colaboración.

Y finalmente, agradecer a todas las personas que de manera directa o indirecta hicieron posible que llegará alcanzar esta meta. A todos y cada uno de ustedes mil gracias.

CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	VII
SUMMARY	X
ÍNDICE DE CUADROS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	4
1.1.1. <i>Objetivo general</i>	4
1.1.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
1.2. Hipótesis del estudio	4
2. MARCO REFERENCIAL	5
2.1. Cuenca hidrográfica	5
2.2. Gestión integral de cuencas hidrográficas	6
2.3. Plan de gestión de cuencas hidrográficas	8
2.4. El agua como recurso integrador de la cuenca hidrográfica	8
2.5. Contaminación del agua	10
2.5.1. <i>Contaminación por fuentes no puntuales</i>	10
2.5.2. <i>Contaminación por fuentes puntuales</i>	11
2.6. Determinación de la calidad del agua	12
2.6.1. <i>Indicadores bacteriológicos</i>	13
2.7. Parámetros indicadores de calidad microbiológica	14
2.8. Fagos de Bacteroides como indicadores de contaminación fecal	16
2.9. Discriminación de la fuente microbiana de contaminación (Microbial Source Tracking)	19
2.9.1. <i>Métodos dependientes de bases de datos usando cultivos</i>	22
2.9.1.1. <i>Resistencia antibiótica</i>	22
2.9.1.2. <i>Otros métodos fenotípicos</i>	23
2.9.1.3. <i>Huella de DNA: ribotipificación, REP-PCR, PFGE y métodos relacionados</i>	23
2.9.2. <i>Métodos independientes de bases de datos usando cultivos</i>	24
2.9.2.1. <i>Bacteriófagos</i>	24
2.9.2.2. <i>Bacterias</i>	24
2.9.3. <i>Métodos independientes de bases de datos sin usar medios de cultivos</i>	25
2.9.3.1. <i>Métodos químicos</i>	25
2.9.3.2. <i>Métodos moleculares</i>	26
2.10. Problemática de la calidad de agua de la cuenca del río Bogotá	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Caracterización y ubicación de la cuenca del río Bogotá	29
3.1.1. <i>Características generales de la cuenca alta del río Bogotá</i>	30
3.1.2. <i>Características generales de la cuenca media del río Bogotá</i>	34
3.1.3. <i>Características generales de la cuenca baja del río Bogotá</i>	41
3.2. Selección de puntos de muestreo	45
3.3. Fase de campo	52

3.3.1.	<i>Toma de muestras</i>	52
3.4.	Fase de laboratorio	53
3.4.1.	<i>Pase y recuperación de Bacteroides RYC 2056, GA 17 y HB 13</i>	53
3.4.2.	<i>Curva de crecimiento de los Bacteroides</i>	54
3.4.3.	<i>Recuperación de los fagos de Bacteroides</i>	56
3.4.4.	<i>Análisis de coliformes fecales</i>	57
3.4.5.	<i>Análisis de Clostridium perfringens</i>	58
3.4.6.	<i>Análisis de fagos somáticos</i>	59
3.4.7.	<i>Análisis de fagos de Bacteroides RYC 2056, GA 17 y HB 13.</i>	61
3.5.	Caracterización molecular de los fagos de Bacteroides	63
3.6.	Análisis estadístico.....	64
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1.	Objetivo 1: Comparar el uso de indicadores tradicionales (coliformes fecales, Clostridium perfringens y fagos somáticos) y nuevos indicadores como fagos de las cepas RYC 2056, GA17 y HB13 de Bacteroides para diferenciar el origen de la contaminación de origen fecal.....	66
4.1.1.	<i>Cuenca alta.</i>	66
4.1.1.1.	<i>Estación de muestreo Matadero Villapinzón</i>	67
4.1.1.2.	<i>Estación de muestreo puente centro Villapinzón</i>	68
4.1.1.3.	<i>Estación de muestreo salida Villapinzón</i>	70
4.1.2.	<i>Cuenca media</i>	72
4.1.2.1.	<i>Estación de muestreo pozo estercolero Nemocón</i>	73
4.1.2.2.	<i>Estación de muestreo río Bogotá PTAR</i>	74
4.1.2.3.	<i>Estación de muestreo planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) El Salitre</i>	76
4.1.3.	<i>Cuenca baja</i>	79
4.1.3.1.	<i>Estación de muestreo matadero La Mesa</i>	79
4.1.3.2.	<i>Estación de muestreo Represa del Muña</i>	81
4.1.3.3.	<i>Estación de muestreo aguas abajo de la represa del Muña</i>	82
4.2.	Objetivo 2: Realizar extracción y amplificación de DNA para comprobar a nivel molecular la presencia y/o ausencia del origen de la contaminación en la cuenca del río Bogotá.....	84
4.2.1.	<i>Identificación con “primers” específicos del género bacteriano Bacteroidetes para discriminar contaminantes de origen humano y animal.</i>	84
4.3.	Objetivo 3: Proponer estrategias y acciones para la toma de decisiones y la implementación de medidas sobre la contaminación fecal del agua en la cuenca del río Bogotá.....	87
4.3.1.	<i>Estrategias y acciones para la toma de decisiones e implementación de medidas para disminuir la contaminación en la cuenca del río Bogotá</i>	87
5.	CONCLUSIONES	92
6.	RECOMENDACIONES	95
7.	LITERATURA CITADA	96
8.	ANEXOS	106
8.1.	ANEXO 1.....	106
8.2.	ANEXO 2.....	108
8.3.	ANEXO 3.....	110

RESUMEN

SASTOQUE SALCEDO, AM. Evaluación del uso de fagos de *Bacteroides* como indicadores para la discriminación de la fuente de contaminación de origen fecal del agua, en la cuenca del río Bogotá, Colombia.

Palabras claves: Cuenca hidrográfica, calidad del agua, contaminación fecal, discriminación de la fuente microbiana de contaminación (Microbial Source Tracking), indicadores bacterianos, fagos de *Bacteroides*, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se hizo una evaluación de los fagos de *Bacteroides* de las cepas RYC 2056, propias de muestras con contaminación de origen animal, GA 17 propias de contaminación de origen humano y en menores concentraciones de origen animal y HB13 que se encuentran en muestras de origen humano. Se evaluó su concentración y se comparó con bacterias indicadoras de contaminación fecal, como lo son coliformes fecales, *Clostridium perfringes* y fagos somáticos, esto con el fin de determinar cual de estos dos grupos bacterianos es mejor en cuanto a su capacidad de discriminar la fuente de la contaminación de origen fecal. El sitio de estudio fue la cuenca del río Bogotá, en donde para cada una de sus partes (alta, media y baja) se tomaron tres estaciones de muestreo; una con contaminante de origen animal, otra de origen doméstico y otra con aguas mixtas (mezcla de agua doméstica, de origen animal o industrial). En total se evaluaron nueve estaciones de muestreo a lo largo de toda la cuenca del río Bogotá, en donde se tomaron muestras entre los meses de abril y septiembre del año 2009, siendo en total 27 muestras analizadas. Cada muestra se analizó para cada uno de los indicadores propuestos (coliformes fecales, fagos somáticos, *Clostridium perfringes*, *Bacteroides* RYC 2056, *Bacteroides* GA 17 y *Bacteroides* HB13). También se hizo la identificación a nivel molecular con “primers” específicos del género bacteriano *Bacteroidetes* para discriminar contaminantes de origen humano y animal, por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para ver que indicador mostraba mayor concentración en la cuenca, se realizó un análisis de varianza ANOVA como un diseño en bloque, bajo la teoría de los modelos lineales mixtos. Los bloques en el modelo representan las partes de la cuenca (alta, media y baja), y se declaró como efecto aleatorio el tipo de contaminante para descontar la

variación producto de esta. Las concentraciones de bacterias y fagos de *Bacteroides* fueron las variables de respuesta.

Se encontró que los fagos que infectan *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 y HB 13, propios de muestras de origen animal y humano, respectivamente, no se presentaron en altas concentraciones en la cuenca del río Bogotá, con lo que se puede pensar que este microorganismo no es tan efectivo discriminando la fuente de contaminación de origen fecal dentro de las condiciones socioeconómicas y biofísicas propias de la cuenca del río Bogotá en Colombia. Además las cepas de *Bacteroides* evaluadas, solo presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las concentraciones encontradas en los puntos donde se presentaba contaminación de origen animal ($P < 0,05$), lo que lleva a concluir que son más específicas para evaluar y determinar la presencia de este tipo de contaminantes.

Respecto a los resultados encontrados en el análisis molecular (PCR) se observó que el contaminante fecal bovino tiene un comportamiento similar al de los recuentos bacterianos de fagos de *Bacteroides*, pero el contaminante fecal humano no presentó igual comportamiento, con lo que se debería analizar si no es un buen marcador, o si debido al alto grado de contaminación del agua hay sustancias interferentes con el proceso de amplificación de ADN.

Se pudo concluir finalmente con este estudio que el uso de indicadores tradicionales de contaminación fecal como coliformes fecales, *Clostridium perfringes* y fagos somáticos, siguen siendo de gran utilidad para la evaluación de diferentes muestras de aguas, sin embargo, no se lograron establecer diferencias en cuanto a su concentración en cada una de las estaciones de muestreo con diferente origen de contaminación, por lo que su uso sigue siendo sólo como indicadores y no discriminadores de contaminación fecal, permitiendo sugerir la necesidad de hacer estudios nuevos con cepas de *Bacteroides*, que son conocidas como bacterias discriminadoras de la fuente de contaminación, pero que sean aisladas del sitio donde se desee hacer el análisis de discriminación, ya que así se daría una mejor recuperación de estos, al evaluarse con los requerimientos nutricionales y ambientales propios de la zona a estudiar.

SUMMARY

SASTOQUE SALCEDO AM. Use of bacteriophages of *Bacteroides* as indicators of the source of origin of fecal contamination in the Bogotá river basin, Colombia.

Keywords: Watershed, water quality, fecal contamination, Microbial Source Tracking (MST), bacterial indicators, bacteriophages, Polimerase Chain Reaction (PCR).

An assessment was developed with bacteriophage strains RYC 2056, typical of contaminated samples of animal origin; GA 17 indicator of both human and animal contamination from and HB13, a strain found only in human origin samples. The concentration for each strain was evaluated and compared with fecal bacterial indicators, (e.g.) fecal coliforms, *Clostridium perfringens* and somatic phages, all these in order to determine which of the two bacterial groups is better in terms of their ability to discriminate the source of fecal contamination. The study site was located at the Bogotá river basin, where three sampling stations were implemented on the three parts of the basin (high, medium and low). The samples taken were: one with an animal contaminant, other with domestic contaminants and the other with water mixed contaminant (a mixture of domestic water, animal and/or industrial). A total of nine sampling stations throughout the Bogotá River Basin were evaluated; those samples were collected between April and September of 2009, totaling 27 samples to be analyzed. Each individual sample was analyzed for each of the proposed indicators (fecal coliforms, somatic phages, *Clostridium perfringes*, *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 and HB13). Also, the identification at the molecular level was made with bacterial genus-specific “Bacteroidetes” primers to discriminate human and animal, using Polimerase Chain Reaction (PCR) method. In order to evaluate which indicator showed higher concentrations at the basin, an ANOVA block design was made, under the theory of linear mixed models. The blocks in the model represent the parts of the basin (high, medium and low), and the type of contaminant was declared as random effect to balance the total variation. The concentrations of bacteria and Bacteriophages were the response variables.

It was found that phages that infect *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 and HB 13, were not present in high concentrations at the Bogotá river basin, which may be due to the

microorganism inefficacy discriminate the source of origin of fecal contamination or due to socioeconomic and biophysical characteristics of the Bogotá river basin in Colombia. Last but not least *Bacteroides* strains tested, had a statistically significant difference, only where the as an animal source of contamination ($P < 0.05$), so that it can be concluded that *Bacteroides* RYC 2056 are more specific to assess and evaluate the presence of such contaminants.

Regarding the findings of the molecular analysis (PCR), it was shown that bovine fecal pollution has a similar behavior to bacterial counts of Bacteriophages, but human fecal pollution does not present the same behavior, which should let us examine whether or not is a good marker, or possibly DNA amplification was interfered.

It was finally concluded in this study that the use of traditional indicators of fecal contamination as fecal coliforms, *Clostridium perfringens* and somatic phages, are still useful in order to evaluate water quality samples, however, those are not able to establish differences in their concentration in each of the sampling stations with different pollution source, so its use remains only as indicators but not fecal contamination discriminators, this suggests the need for more studies with new strains of *Bacteroides*, known to discriminate source of pollution, but these have to be isolated from the site where we want to make the discrimination analysis, as this would give a better recovery rate, together with the particular nutritional and environmental requirements inherent to the area of the study.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados del Índice de Calidad de Agua para la cuenca del río Bogotá.....	27
Cuadro 2. Cubrimiento de servicios públicos en el sector urbano y rural de la cuenca alta del río Bogotá	34
Cuadro 3. Cubrimiento de servicios públicos de la cuenca media del río Bogotá	41
Cuadro 4. Cobertura de energía, teléfono y gas en la cuenca baja del río Bogotá	45
Cuadro 5. Promedios y unidades logarítmicas de las concentraciones microbianas encontradas en las estaciones de muestreo de la cuenca alta del río Bogotá.....	66
Cuadro 6. Promedios y unidades logarítmicas de las concentraciones microbianas encontradas en las estaciones de muestreo de la cuenca media del río Bogotá.....	73
Cuadro 7. Promedios y unidades logarítmicas de las concentraciones microbianas encontradas en las estaciones de muestreo de la cuenca baja del río Bogotá	79
Cuadro 8 . Resultados de PCR cualitativa de cada una de las estaciones de muestreo de la cuenca del río Bogotá	85
Cuadro 9. Absorbancia y número de células viables por cada hora de crecimiento de Bacteroides RYC 2056	111
Cuadro 10. Absorbancia y número de células viables por cada hora de crecimiento de Bacteroides RYC 2056	112
Cuadro 11. Absorbancia y número de viables de Bacteroides RYC 2056, mayo 2009.	113
Cuadro 12. Absorbancia y número de células viables de Bacteroides RYC 2056, agosto 2009.	114
Cuadro 13. Absorbancia y número de células viables de Bacteroides GA 17, marzo 2009....	115
Cuadro 14. Absorbancia y número de células viables de Bacteroides GA 17, abril 2009.	116
Cuadro 15. Absorbancia y número de células viables de Bacteroides GA 17, agosto 2009. .	117
Cuadro 16. Absorbancia y número de células viables de Bacteroides HB 13, marzo 2009...	119
Cuadro 17. Absorbancia y número de células viables de Bacteroides HB 13, mayo 2009. ...	120
Cuadro 18. Absorbancia y número de células viables de Bacteroides HB 13, agosto 2009 ..	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cuenca del Río Bogotá.....	30
Figura 2. Estación de muestreo denominada matadero Villapinzón.....	47
Figura 3. Estación de muestreo denominada puente centro Villapinzón.....	47
Figura 4. Estación de muestreo denominada salida Villapinzón.....	48
Figura 5. Estación de muestreo denominada pozo estercolero Nemocón.....	49
Figura 6. Estación de muestreo denominada como río Bogotá PTAR.	49
Figura 7. Estación de muestreo denominada como PTAR El Salitre.	50
Figura 8. Estación de muestreo denominada matadero La Mesa.....	51
Figura 9. Estación de muestreo denominada represa del Muña.....	51
Figura 10. Estación de muestreo denominada aguas abajo de la represa del Muña.	52
Figura 11. Comparación entre concentraciones de bacterias en la cuenca alta del río Bogotá	71
Figura 12. Comparación entre concentraciones de Bacteroides en la cuenca alta del río Bogotá	72
Figura 13. Comparación entre concentraciones de bacterias en la cuenca media del río Bogotá.	77
Figura 14. Comparación entre concentraciones de Bacteroides en la cuenca media del río Bogotá.....	78
Figura 15. Comparación entre concentraciones de Bacteroides en la cuenca baja del río Bogotá	81
Figura 16. Diferencia estadística entre bacterias en la cuenca del río Bogotá.....	83
Figura 17. Diferencia estadística entre Bacteroides en la cuenca del río Bogotá.	84
Figura 18. Curva de crecimiento de Bacteroides RYC 2056, marzo2009.....	111
Figura 19. Curva de crecimiento de Bacteroides RYC 2056, abril 2009.....	112
Figura 20. Curva de crecimiento de Bacteroides RYC2056, mayo 2009.....	113
Figura 21. Curva de crecimiento de Bacteroides RYC 2056, agosto 2009.	114
Figura 22. Curva de crecimiento Bacteroides GA 17, marzo 2009.	115
Figura 23. Curva de crecimiento Bacteroides GA 17, abril 2009.....	116
Figura 24. Curva de crecimiento de Bacteroides GA 17, agosto 2009.....	117
Figura 25. Curva de crecimiento de Bacteroides HB13, marzo 2009.....	119
Figura 26. Curva de crecimiento de Bacteroides HB 13, mayo 2009.....	119
Figura 27. Curva de crecimiento de Bacteroides HB 13, agosto 2009.	120

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

APHA: American Public Health Association
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AFLP: Amplified Fragment Length Polymorfism (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados)
BPRM: Bacteroides phage recovery médium
BPRMA: Bacteroides phage recovery médium agar
BPRMB: Bacteroides phage recovery medium broth
CAR: Corporación Autónoma Regional
CSR: Clostridios sulfito reductores
CONPES: Consejo Nacional de Política Económica y Social
CUP: Perfil de la utilización de la fuente de Carbono
DBO: Demanda Biológica de Oxígeno
EAAB – ESP: Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá.
FAME: Ácidos Grasos Metil Ester
ICA: Índice de Calidad del Agua
ISO: Internacional Organization for Standarization
MSA: Agar Scholtens Modificado
MSB: Caldo Scholtens Modificado
MSAss: Agas semisólido Scholtens Modificado
MICH: Manejo Integrado de Cuencas Hidrográficas
MST: Microbial Source Tracking
NT: Nitrógeno Total
PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes)
REP-PCR: Repetitive Extragenic Palindromic PCR (Amplificación por PCR de Elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos)
ARN: Ácido Ribonucleico
TFSPW: Tracking the origin of faecal Pollution in Surface Water
TCMD: Total de Carga Máxima Diaria

1. INTRODUCCIÓN

Como parte de la sostenibilidad del proceso de manejo integrado de cuencas hidrográficas es de vital importancia sustentar las acciones a realizar en los resultados de las etapas de planificación e implementación, para justificar así la continuidad de dichas acciones y fortalecer las inversiones, tanto a mediano como largo plazo. Para lograr esta justificación se debe generar una interpretación de los impactos, diseñando un plan de monitoreo y evaluación de las acciones ejecutadas. Para ello se deben definir los aspectos claves o indicadores explicativos de los efectos e impactos específicos e integradores que se producen por la intervención en una cuenca hidrográfica (Faustino 2008).

En el caso específico de la cuenca del río Bogotá, ubicada en el Departamento de Cundinamarca, Colombia, se presentan diversas problemáticas a nivel de contaminación, dentro de las cuales, la que más preocupa es el alto contenido de microorganismos y metales que superan los niveles permisibles para el consumo humano. Actualmente, según lo expuesto en el Plan de Ordenación y Manejo de la Cuenca del Río Bogotá, realizado por la Corporación Autónoma Regional (CAR), en el año 2006, un 35,58% del área total de la cuenca se dedica a cultivos, en su mayoría de flores en invernadero, que generan gran cantidad de contaminación por uso excesivo de agroquímicos; los pastos representan el 36,95% del área, usada principalmente para el desarrollo de actividades ganaderas y mineras; y finalmente, la zona urbanizada representa un 2,80% del área total de la cuenca y se encuentran mayoritariamente en la parte media y baja de la misma, generando la mayor cantidad de vertimientos de residuos domésticos e industriales.

Debido a que el agua que se encuentra dentro de esta cuenca es reutilizada para el riego de ciertos cultivos y consumida por la población, el mayor factor de riesgo de salud pública está asociado con la exposición a agentes biológicos que incluyen bacterias patógenas, helmintos, protozoos y virus entéricos. El riesgo de contaminación, tanto a nivel humano como ambiental, debido a este grupo de microorganismos, hace necesario el control de la presencia de patógenos en el agua.

Determinar el tipo de microorganismos presentes y su concentración, genera información indispensable para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en

relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas. Entre estos microorganismos indicadores de calidad del agua, son ampliamente usados los coliformes fecales y la bacteria *Escherichia coli*, los cuales están asociados con los contaminantes fecales, que provienen de fuentes tanto de animales como de humanos. Cuando son encontrados en el agua, indican la presencia potencial de patógenos entéricos de la familia de las Enterobacterias como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y serovariedades de *Escherichia coli*, los que pueden causar graves enfermedades en las personas que consumen el agua contaminada. Sin embargo, el problema no solo se encuentra a nivel de riesgo humano, también a nivel económico, ya que se pueden llegar a presentar deficiencias en los cuerpos de agua usados para fines recreacionales (EPA 2005).

De esta manera, para poder implementar un tratamiento de depuración de las aguas que presentan contaminación fecal, es importante, en principio, identificar la fuente de contaminación y así erradicar el problema desde su causa. Para poder implementar tratamientos específicos de reducción de la contaminación ha surgido un nuevo método para discriminar la fuente de contaminación, denominada “*Microbial Source Tracking*” (discriminación de la fuente microbiana de contaminación), el cual permite definir, a través de dicha discriminación, el riesgo, el tipo de tratamiento y el tipo de sanciones que se deben aplicar, dependiendo del origen del vertido, discriminando entre animal y humano específicamente (EPA 2005).

Para lograr un resultado eficaz a partir de la discriminación de la fuente microbiana de contaminación, se plantea con este estudio hacer uso de fagos de *Bacteroides*, los cuales son virus que causan la lisis o ruptura de la bacteria huésped, que en este caso son bacterias propias del tubo digestivo humano y de los animales, y que pueden servir para determinar la calidad del agua (Shanks 2005). Estos fagos son encontrados en diversas poblaciones de bacterias, tanto en la flora intestinal como en el suelo, y en mayor cantidad en el agua; por esto se convierten en una herramienta fácil de usar, que además de evaluar la cantidad de contaminante presente en el área de estudio, también indicará su origen y determinará la mejor manera de tratarlo.

Este estudio cuenta con el soporte científico y metodológico de la Universidad de Barcelona, por tanto se plantea el uso de bacteriófagos que infectan *Bacteroides fragilis* RYC2056 que son específicos para identificar heces animales, *Bacteroides thetaiaomicron*

GA17 y *Bacteroides* HB13, para identificar excrementos humanos y en menor concentración animales. Según estudios realizados por TFSPW (2004), estas especies de *Bacteroides* han manifestado ser propicias para discriminar el origen de la contaminación en cuerpos de agua.

Esto serviría de base para valorar lo expuesto en los últimos estudios, como el realizado por Jofre et ál. (2006), en donde plantean que los bacteriófagos pueden ser indicadores útiles de contaminación fecal en muestras de agua de origen superficial sin tratamiento, incluso llegan a sugerir de acuerdo a los resultados que obtuvieron que los bacteriófagos son mejores indicadores del riesgo de enfermedad que las bacterias. Sin embargo, aún existen algunas dudas en cuanto la superioridad indicadora de los bacteriófagos sobre las bacterias respecto a la discriminación de la fuente de contaminación fecal; es por esta razón que surge la necesidad de realizar la comparación entre estos dos tipos de microorganismos y evaluar su eficacia como indicadores de la discriminación de contaminación fecal, teniendo en cuenta que cada uno de estos grupos de indicadores tienen comportamientos y funciones diferentes.

Este estudio tiene como objetivo principal evaluar el uso de fagos de *Bacteroides* como indicadores para la discriminación de la fuente de contaminación de origen fecal en la cuenca del río Bogotá y comparar su efectividad respecto al uso de indicadores tradicionales, como lo son los coliformes fecales, *Clostridium perfringens* y fagos somáticos, los cuales serán evaluados a partir de muestras de agua superficial representativas de la cuenca del río Bogotá. Esto se hará con el objetivo final de comparar los datos obtenidos en este estudio, con los estudios realizados por Araujo et al. (2001), Balanche-Muñoz et al. (2008), Blanch et al. (2004,2006), Bonjoch et al. (2005), Cárdenas y Guerrero (2000), Durán et al. (2006), Field et al. (2007), Griffith et al. (2003), Jofre y Lucena (2006), Leclerc et al (2000), Lucena et al (2006, 2003), McDonald et al. (2006), Payán et al. (2005), Shanks (2005), TFSPW (2004); dado que se presentan en condiciones biofísicas y socioeconómicas diferentes, y así verificar si los fagos de *Bacteroides*, pueden efectivamente ser usados como indicadores universales que ayudan a diferenciar la fuente de contaminación fecal, dentro del marco del plan de manejo integrado de cuencas hidrográficas.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Evaluar el uso de fagos de las cepas de *Bacteroides* RYC 2056, GA17 y HB13 como indicadores para la discriminación de la fuente de contaminación de origen fecal en la cuenca del río Bogotá.

1.1.2. Objetivos específicos

- 1) Comparar el uso de indicadores tradicionales (coliformes fecales, *Clostridium perfringens* y fagos somáticos) y nuevos indicadores como fagos de las cepas RYC 2056, GA17 y HB13 de *Bacteroides* para diferenciar el origen de la contaminación fecal.
- 2) Realizar extracción y amplificación de DNA para comprobar a nivel molecular la presencia y/o ausencia de bacterias indicadoras que ayudan a la discriminación del origen de la contaminación en la cuenca del río Bogotá.
- 3) Proponer estrategias y acciones para la toma de decisiones y la implementación de medidas sobre la contaminación fecal del agua en la cuenca del río Bogotá.

1.2. Hipótesis del estudio

El uso de fagos de *Bacteroides* como un nuevo indicador permite evaluar y diferenciar la fuente de contaminación de origen fecal dentro de la cuenca del río Bogotá, comparado con el uso de indicadores tradicionales (coliformes fecales, *Clostridium perfringens* y fagos somáticos).

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Cuenca hidrográfica

La cuenca hidrográfica es una unidad natural, morfológicamente superficial, cuyos límites quedan establecidos por la división geográfica de las aguas, también conocida como “parteaguas”. El parteaguas es la línea imaginaria que une los puntos de mayor altura relativa entre dos laderas adyacentes pero de exposición opuesta, desde la parte alta de la cuenca hasta su punto de emisión, en la zona hipsométricamente más baja (Jiménez 2005). Son unidades territoriales donde funciona la combinación de un sistema hídrico, simultáneamente con un subsistema económico y social, activado por la acción humana, el capital, el trabajo y la tecnología. En ellas se producen bienes y servicios (agrícolas, pecuarios, forestales y recreativos) que demandan principalmente las poblaciones. Las acciones del manejo de cuencas son fundamentales para el manejo de los recursos hídricos en estas zonas, ya que son parte del proceso de la gestión para contrarrestar los efectos ambientales negativos y favorecer los positivos; por ello es de suma importancia delimitar áreas que producen mayor presión hacia los recursos, cuantificarlos y evaluarlos para proponer alternativas que permitan detener el acelerado proceso de contaminación (Robledo 2001).

De esta manera se reconoce a la cuenca hidrográfica como una de las mejores áreas geográficas en donde se puede lograr la planeación para el mejoramiento y recuperación de los recursos naturales. De esta afirmación nace entonces el manejo integrado de cuencas hidrográficas (MICH), la cual se define como la gestión para manejar, aprovechar y conservar los recursos naturales en las cuencas hidrográficas en función de las necesidades humanas, buscando un balance entre equidad, sostenibilidad ecológica, social, económica y desarrollo sostenible (Jiménez 2005). Este proceso provee la oportunidad de tener un balance entre los diferentes usos que se puede dar a los recursos naturales y los impactos que estos tienen en la sostenibilidad de los mismos (García et ál. 2005).

2.2. Gestión integral de cuencas hidrográficas

Es el conjunto de acciones que se realizan para proteger, conservar, utilizar, aprovechar, manejar y rehabilitar adecuadamente los recursos naturales en las cuencas hidrográficas de acuerdo a los enfoques sistémico, socioambiental, integral, multi e interdisciplinario, multi e intersectorial y del agua como recurso integrador de la cuenca.

Promueve y busca la sostenibilidad ecológica, social y económica de los recursos naturales y el ambiente en el contexto de la intervención humana, sus necesidades y responsabilidades y del riesgo y la ocurrencia de desastres, principalmente de origen hidrometeorológico.

Enfatiza en los procesos y acciones (la gestión) necesarias para lograr los recursos humanos, económicos, logísticos y administrativos requeridos para lograr ese manejo integral o manejo de la cuenca. La gestión tiene como base un conjunto de procesos y acciones, denominado ciclo de la gestión de cuencas que incluye el reconocimiento de la cuenca, la identificación y análisis de los actores e informantes claves, el diagnóstico, el ordenamiento del territorio, el establecimiento de la línea base, la elaboración e implementación del plan de gestión de la cuenca, los mecanismos de gestión financiera y administrativa, el sistema de monitoreo y evaluación, así como la sistematización y comunicación de las experiencias.

Si bien la gestión integral considera como un elemento fundamental la participación de diferentes actores claves de la cuenca, el fortalecimiento de su capacidad de gestión y la formación de capital humano, no implica estricta y necesariamente una participación plena en la toma de decisiones y en asumir responsabilidades por parte de todos los actores claves (Jiménez 2008).

En la práctica existen dos enfoques en los cuales se realiza el manejo de cuencas, el primero apoyado generalmente por las instituciones gubernamentales, como es el caso de grandes cuencas, que tiene muchas dificultades para ser operativizado al nivel de campo; una segunda en la cual pequeñas cuencas o microcuencas son implementadas con iniciativas locales, comunitarias y participativas, que han sido mucho más exitosas, y que mediante el proceso del escalamiento espacial puede ir buscando el objetivo de gestionar cuencas grandes.

Un aspecto clave que se debe considerar en la planificación de cuencas, es que para lograr la gestión de esta unidad territorial se requiere de “procesos”, cuyos mayores logros se producen cuando se aplican métodos con base “participativa”, por lo tanto, para lograr buenos resultados se requiere tomar en cuenta recomendaciones como las siguientes (Jiménez 2008):

- a) Todos los actores o pobladores de la cuenca son importantes, hay que tomar en cuenta sus opiniones, demandas y necesidades (grandes, pequeños, pobres, sin tierra).
- b) Cada actor tiene una responsabilidad, aunque existen niveles de responsabilidad diferentes, y por lo tanto su cooperación debe valorarse en toda su dimensión.
- c) La unión de esfuerzos, la colectividad, la integración, la colaboración y el trabajo solidario son principios que harán viables las actividades que demanda la gestión de una cuenca.
- d) La replicación, la multiplicación y la divulgación son elementos que se deben considerar en todas las actividades de productores, familias, grupos y comunidades.
- e) La coordinación es un principio base para una labor eficiente de las organizaciones que participan en la gestión de la cuenca.

El enfoque central, debe ser integral e integrado, con base al análisis de sistemas y la generación de externalidades para la cuenca, fuera de ella, aguas abajo o para áreas vecinas. Se requiere de un enfoque socioambiental, con base al rol y participación de los actores locales, las familias y sus organizaciones. El factor social y bienestar humano deben ser la base del diseño del plan de gestión de la cuenca, pero el planteamiento debe ser que las externalidades se internalicen mediante mecanismos sostenibles, transparentes, equitativos y expeditos.

El enfoque metodológico, debe expresar la visión prospectiva para aprovechar las potencialidades y solucionar los problemas; el equipo de trabajo interdisciplinario y de participantes locales, debe integrar y correlacionar la información con el conocimiento de la realidad. Por tanto es de vital importancia, conocer inicialmente la situación en la que se encuentra el recurso agua, en el caso de las cuencas hidrográficas, y a partir de esta generar un plan de gestión basándose en los resultados obtenidos en cuanto a su calidad y disponibilidad (Jiménez 2008).

2.3. Plan de gestión de cuencas hidrográficas

La elaboración de un plan de gestión de cuencas es una actividad de planificación que puede realizarse de diferentes maneras, dependiendo de la naturaleza o problemática, tamaño de la cuenca, nivel de detalle, propósito específico, el tipo de donante o cooperante, la metodología de planificación, etc. (Jiménez 2008).

Para la planificación también es importante el conocimiento de la realidad y el trabajo conjunto de un equipo multidisciplinario que tenga la capacidad para desarrollar el enfoque integral que requiere el análisis de cuencas. Este equipo debe identificar a los actores claves de las cuencas que pueden apoyar la planificación y ser parte permanente de todo el proceso.

Un plan de gestión de cuencas *“es un instrumento orientador y directriz que señala un conjunto de actividades ordenadas y planificadas, para resolver la problemática y aprovechar las potencialidades de la cuenca en forma sostenible y que provea bienestar a las poblaciones”* (Jiménez 2008).

La práctica actual sobre elaboración de planes de gestión de cuencas trata de proveer un instrumento directriz, práctico, comprensible y sustentado en la viabilidad de actividades, para promover su implementación.

Debe ser flexible, dinámico, proyectivo y comprensible por cada uno de los actores de la cuenca y de quienes van a participar en las actividades identificadas. La importancia del plan de gestión radica en que mediante el mismo se sabe qué es lo que se debe hacer para lograr un buen manejo de la cuenca. También se puede tener claridad de las actividades más importantes y de la prioridad. El plan presenta el ordenamiento más apropiado para beneficio de sus habitantes y quién o quiénes son los responsables de la gestión.

2.4. El agua como recurso integrador de la cuenca hidrográfica

El agua actúa como recurso integrador de la cuenca hidrográfica, que es la principal forma terrestre dentro del ciclo hidrológico, que capta y concentra la oferta del agua que proviene de las precipitaciones (Dourojeanni y Jouravlev 2002).

Además de esta condición física y biológica básica, cabe mencionar por lo menos las siguientes razones que explican este hecho. La principal es que las características físicas del agua generan un grado extremadamente alto, y en muchos casos imprevisible, de interrelación e interdependencia (externalidades o efectos externos) entre los usos y usuarios de agua en una cuenca. Las aguas superficiales y subterráneas, sobretodo ríos, lagos y fuentes subterráneas, así como las cuencas de captación, las zonas de recarga, los lugares de extracción de agua, las obras hidráulicas y los puntos de evacuación de aguas servidas, incluidas las franjas costeras, forman, con relación a una cuenca, un sistema integrado e interconectado (Dourojeanni y Jouravlev 2002).

En la abrumadora mayoría de los usos llamados “consuntivos” (como riego y abastecimiento de agua potable), sólo una pequeña parte del agua inicialmente extraída de una corriente se consume. El agua que no se consume (es decir, que no se evapora o evapotranspira o que no es transferida a otra cuenca) retorna a la corriente en cierto punto aguas abajo, ya sea en forma directa, mediante escorrentía superficial, o indirecta, mediante el agua subterránea, y en consecuencia puede aprovecharse reiteradamente. Como resultado, los usos y usuarios situados aguas abajo dependen de manera crítica de la cantidad, calidad y tiempo de los sobrantes, caudales de retorno o pérdidas de los usos y usuarios situados aguas arriba (Dourojeanni y Jouravlev 2002).

En cuanto a los usos en el propio caudal o “no consuntivos” (como generación hidroeléctrica, recreación y acuicultura), aunque normalmente no existe rivalidad entre los usuarios por la cantidad de agua utilizada, también se da un alto grado de interrelación, interdependencia y afectación recíproca entre usos en el propio caudal entre sí y entre usos consuntivos y en el propio caudal. Los distintos usos en el propio caudal poseen requisitos de atributos físicos, biológicos y químicos diferentes, pero interdependientes del caudal que varían en el tiempo y el espacio. Todos estos atributos son afectados por usos de agua y tierra realizados aguas arriba de la cuenca. Estas interrelaciones e interdependencias, tanto en el caso de los usos consuntivos como los que se realizan en el propio caudal, se internalizan dentro de la cuenca (Dourojeanni y Jouravlev 2002).

Un aspecto por recalcar es la naturaleza unidireccional, asimétrica y anisotrópica de las interrelaciones e interdependencias entre los usos y usuarios de agua en una cuenca. Los efectos externos, tanto positivos como negativos, causados por las interrelaciones e

interdependencias entre los múltiples usos y usuarios de agua, siempre se propagan desde los usos y usuarios situados aguas arriba hacia los usos y usuarios ubicados aguas abajo. En otras palabras, lo que ocurre aguas arriba casi siempre tiene algún efecto en los usos y usuarios de agua ubicados aguas abajo, mientras que lo que ocurre aguas abajo difícilmente puede tener influencia en los usuarios situados aguas arriba (Dourojeanni y Jouravlev 2002).

Ello convierte a la cuenca en la unidad territorial apropiada de análisis para la toma de decisiones de gestión del agua, especialmente en cuanto a su uso múltiple, su asignación, el control de su contaminación y la aplicación de los caudales ecológicos. Por tanto, hace que el agua se convierta en el recurso integrador de todos los factores existentes dentro de esta, beneficiando al uso y adecuado manejo de sus recursos naturales.

2.5. Contaminación del agua

La contaminación está dada por la acción y el efecto de introducir materias o diversas formas de energía, o inducir condiciones en el agua, de manera directa o indirecta, dando lugar a una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función en un ecosistema (Gallego 2000).

Como el agua rara vez se encuentra en estado puro, su contaminación comprende cualquier organismo vivo, mineral o compuesto químico cuya concentración limite o impida los usos benéficos de esta (Ongley 1997). Los efectos de una contaminación dependen del tipo y concentración de los agentes contaminantes, por ejemplo los compuestos orgánicos solubles con una alta demanda de oxígeno ocasionan la reducción del oxígeno en el agua superficial, lo que puede provocar la muerte de peces, la desaparición de organismos acuáticos con metabolismos oxidativos, también algunos microorganismos pueden utilizar su metabolismo facultativo y generar un cambio de flora bacteriana a anaerobia originando olores indeseables.

2.5.1. Contaminación por fuentes no puntuales

Se define como fuentes de contaminación no puntuales o no localizadas, aquellas fuentes contaminantes que no tienen un punto claro de ingreso en los cursos de agua que los

reciben (Ongley 1997), es decir, están distribuidas irregularmente en toda la cuenca y las descargas no se realizan de manera directa.

La contaminación no puntual o difusa es causada por fuentes generalmente asociadas con escorrentía agrícola, silvicultural y urbana. Esta no se produce por la descarga desde un lugar único y específico, sino que generalmente resulta de la escorrentía, precipitación y percolación; la contaminación de fuentes no puntuales se presenta cuando la tasa de los materiales contaminantes que entran en el cuerpo de agua o agua subterránea, exceden los niveles naturales (Villegas 1995).

En Colombia, las prácticas agrícolas y formas de utilización de la tierra, incluidas las operaciones de alimentación animal, se consideran como fuentes no localizadas. Las características principales de las fuentes no puntuales se deben a que responden a las condiciones hidrológicas, presentan dificultades para su medición o control directo (por ello son difíciles de regular) y se concentran en las prácticas de ordenación de la tierra y otras afines (Ongley 1997).

Según Córdoba (2002) los contaminantes de fuentes no localizadas, cualquiera que sea su origen, se desplazan por la superficie terrestre o penetran en el suelo, transportados por el agua de lluvia. Estos contaminantes consiguen llegar hasta las aguas subterráneas, humedales, ríos, lagos y finalmente hasta los océanos en forma de sedimentos y cargas químicas. La repercusión ecológica de estos contaminantes puede ir desde pequeños trastornos hasta graves catástrofes ecológicas, sobre los peces, aves, mamíferos y la salud humana.

2.5.2. Contaminación por fuentes puntuales

Se consideran como fuentes puntuales de contaminación las descargas directas de aguas residuales a los cuerpos de agua, sean estos de origen domiciliario o industrial (Basterrechea et ál. 1987). La contaminación por medio de fuentes puntuales esta asociada a las actividades en que el agua residual va a parar directamente a las masas receptoras, un caso típico son las cañerías de descargas, las que se pueden fácilmente cuantificar y controlar (Ongley 1997).

La contaminación por fuentes puntuales se subdivide a su vez en dos tipos de contaminación dependiendo de su origen, entre estas se encuentra la contaminación por actividades industriales, la cual depende del tipo de producción, ya que se pueden generar debido a la materia inorgánica que se encuentra en suspensión y en solución, como también a sustancias orgánicas, desechos tanto químicos, fenólicos, orgánicos fermentables y tóxicos (Repetto y Morán, citado por Meneses 2003).

Y también se encuentra la contaminación de origen doméstico, causado principalmente por las heces humanas, y una mezcla de compuestos orgánicos y minerales no disueltos. Los compuestos orgánicos son las grasas, jabones, proteínas, glúcidos y los productos provenientes de su descomposición, detergentes, aceites, minerales y otros desperdicios de origen animal.

Cuando las aguas de origen doméstico contaminadas entran en contacto con agua destinada para uso potable, pueden transmitir su carga de bacterias y virus eventualmente presentes y causar enfermedades (Repetto y Morán, citado por Meneses 2003).

Para el caso específico de este estudio las fuentes de contaminación que se evaluaron son puntuales, ya que provienen específicamente de zonas donde se da actividad doméstica, industrial o mixta y de afluyente generado por mataderos, que llegan de forma directa a las aguas de la cuenca del río Bogotá.

2.6. Determinación de la calidad del agua

Según Mendoza (1996) la calidad del agua se define como las características del agua que pueden afectar su adaptabilidad a un uso determinado, es decir, la relación entre la calidad del agua y las necesidades del usuario. Otra definición de la calidad del agua toma en cuenta su contenido de sólidos y gases, ya sea que estén presentes en suspensión o en solución.

El estudio de la calidad del agua es un proceso de enfoque múltiple para evaluar la naturaleza física, química y biológica de esta en relación a su calidad natural, efectos humanos, usos propuestos, especialmente usos humanos y acuáticos relacionados con la salud (FAO 1993).

El análisis del agua revela la presencia de gases, elementos minerales y elementos orgánicos en solución o en suspensión, los cuales pueden tener un origen natural, rocas, suelo y aire o proceder de las actividades de producción y consumo humano, que originan una serie de productos de desecho que son vertidos, depurados o no, a las aguas para su eliminación. Es la naturaleza y la cantidad de estos elementos constituyentes los que definen un agua y precisan y limitan su empleo para los diversos usos: agua potable, industrial, agrícola o recreativo (Seoáñez 1999).

Este mismo autor describe dos tipos de métodos o indicadores para medir la calidad del agua, los cuales son los *métodos físico-químicos* y los *métodos biológicos*. Los primeros se basan en el estudio de los factores físico-químicos del agua y se llevan a cabo mediante una toma de muestras de agua, con la determinación de sus características físicas y con análisis de sus componentes químicos. Los métodos biológicos para medir la calidad del agua para consumo humano se fundamentan en el estudio de microorganismos, comunidades de macroinvertebrados y de plantas acuáticas. Como cada comunidad responde a las condiciones físico-químicas del medio donde vive, toda alteración en éstas induce cambios que se manifiestan en el reemplazo de unas especies por otras o por la variación del número y proporción de cada una de ellas (Seoáñez 1999). En este contexto la caracterización biológica del agua parte de la determinación del grado de alteración de la condición biológica de la misma cuando se introducen sustancias tóxicas, microorganismos y materia orgánica que pueda descomponerse o cualquier forma de energía.

2.6.1. Indicadores bacteriológicos

La contaminación directa o indirecta representa el peligro más común y más difundido en lo que concierne al agua potable, debido al efecto de las aguas servidas, otros desechos o de la excreta del hombre o de los animales, sucede cuando la contaminación es reciente y entre los factores que contribuyeron a ella se encuentran agentes productores de enfermedades entéricas transmisibles.

La contaminación fecal del agua potable puede darse debido a una variedad de organismos patógenos intestinales bacterianos, virales y parasitarios (Protozoarios y

Helmintos), cuya presencia está relacionada con enfermedades que pueden existir en determinado momento en la comunidad. Las bacterias patógenas intestinales se encuentran diseminadas en todo el planeta, entre las detectadas en agua potable contaminada se incluyen: *Salmonella* spp., *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter fetus* y *Clostridium perfringens* y enterovirus, entre otros. Todos estos organismos pueden ser causantes de enfermedades cuyo nivel de gravedad va desde una ligera gastroenteritis hasta casos graves y a veces fatales de disentería, cólera o tifoidea (OPS 1987).

2.7. Parámetros indicadores de calidad microbiológica

La calidad microbiológica de un agua se suele evaluar a partir de la determinación de las concentraciones de microorganismos indicadores de contaminación fecal, aunque a veces también se determina directamente mediante las concentraciones de microorganismos patógenos. Un microorganismo indicador de contaminación fecal idealmente debe reunir las siguientes características (Yates y Yates 1988):

- Ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos.
- Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales homeotérmicos.
- Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están.
- Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.
- Debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos.
- Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas (su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal).
- Debe ser fácil de aislar y cuantificar.
- No debe ser patógeno.

No existe ningún microorganismo que reúna todos los criterios de un indicador ideal y apenas algunos grupos satisfacen algunos de estos requisitos.

Llorente et ál. (2006) definieron como características y propiedades de los principales microorganismos indicadores las siguientes:

- Coliformes fecales: son bacterias aerobias y anaerobias facultativas Gram negativas, no formadoras de esporas, oxidasa negativas, con forma de bacilos y que fermentan la lactosa (a través de la enzima β -galactosidasa) con formación de ácido y de gas, en un período de 24 a 48 horas y a una temperatura de $44,5 \pm 2$ °C. Son indicadores no específicos de contaminación fecal.
- Clostridios sulfito reductores (CSR): son bacilos grampositivos, formadores de esporas, inmóviles, anaerobios estrictos que reducen el sulfito a sulfuro de hidrógeno. *Clostridium perfringens* pertenece al grupo de los CSR, pero también fermenta lactosa, la sucrosa y el inositol con producción de gas, reduce el nitrato, hidroliza la gelatina y produce la lecitinasa y el ácido fosfatasa.
- Fagos somáticos: son virus que infectan bacterias. Los fagos que infectan determinadas bacterias propias del tubo digestivo humano y de los animales pueden servir para determinar la calidad del agua. En ciertas ocasiones se usan como microorganismos modelo de los virus entéricos humanos. Son de interés para esta finalidad los colifagos somáticos, los colifagos F-específicos RNA (fagos F-RNA) y los fagos que infectan *Bacteroides fragilis*.
- Bacteriófagos de *Bacteroides* ssp.: estos fagos infectan una de las bacterias más abundantes de las heces como es *Bacteroides*. Los más abundantes pertenecen a la familia Siphoviridae con cola flexible. Algunas cepas huésped, por ejemplo *Bacteroides fragilis* RYC2056, detectan fagos en las heces humanas y de otros animales, mientras que otras detectan sólo fagos en las heces humanas, como *Bacteroides fragilis* HSP40 o *Bacteroides tethaiaicron* GA17.

Es importante tener en cuenta que estos dos últimos han sido añadidos como microorganismos indicadores, principalmente debido a que son más resistentes a la mayoría de tratamientos terciarios de aguas residuales y sus factores inactivantes. Por lo que, pueden llegar a ser un riesgo potencial para la salud, en el caso donde haya un mal tratamiento de aguas residuales crudas en plantas de tratamiento (Jofre y Lucena 2006).

Para el caso específico de indicadores microbianos de contaminación fecal, es importante hacer una detección de estos, especialmente si no se maneja un buen sistema de tratamiento del agua antes de ser usada bien sea como recreación o para su consumo.

La contaminación fecal es determinada usualmente por medio del uso de cierto tipo de bacterias indicadoras, como lo son los coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringes*, entre otros (Lecker et ál. 2001).

De esta manera, y para el caso específico de este estudio se evaluaron coliformes fecales, teniendo en cuenta que son los usados universalmente; *Clostridium perfringes*, por ser una bacteria propia del tracto gastrointestinal de humanos y animales, además que es formador de endoesporas que le permite sobrevivir por mucho tiempo en suelos y aguas; fagos somáticos por ser similares a los virus entéricos patógenos humanos, que infectan específicamente a *E. coli* y son propios del tracto intestinal de animales de sangre caliente; y por último se evaluarán los fagos de Bacteroides de las cepas RYC 2056, GA 17 y HB 13, teniendo como objetivo principal diferenciar la fuente de contaminación, al ser *Bacteroides* HB 13 y GA 17 de origen fecal humano y *Bacteroides* RYC 2056 de origen animal (Araujo et al, 2001; Balanche-Muñoz et al, 2008; Blanch et al, 2004,2006; Bonjoch et al, 2005; Cárdenas y Guerrero 2000; Durán et al, 2006; Field et al, 2007; Griffith et al, 2003; Jofre y Lucena, 2006; Lecker et al, 2000; Lucena et al, 2006, 2003; McDonald et al, 2006; Payán et al, 2005; Shanks, 2005 y TFSPW, 2004).

2.8. Fagos de Bacteroides como indicadores de contaminación fecal

El incremento en el vertido de contaminantes al agua, ha generado problemas de graves implicaciones, tanto a nivel ambiental como sanitario. La mayoría de estos vertidos se caracterizan por tener altas concentraciones de microorganismos patógenos que pueden alterar las condiciones de equilibrio de los ecosistemas y generar riesgo en salud pública. En los últimos años se ha podido avanzar de manera importante en la determinación de los indicadores de contaminación fecal de origen humano, con microorganismos como coliformes fecales, bacteriófagos y huevos de helminto, los cuales son específicos de contaminación de origen fecal; no todos tienen las mismas implicaciones a nivel de salud pública y no se

comportan de manera similar en los sistemas de depuración. Más recientemente ha cobrado importancia el estudio de la discriminación del origen de la contaminación; ya sea humana o animal (Seguimiento de la fuente microbiana de contaminación o Microbial Source Tracking), pues a través de dicha discriminación se puede determinar el uso de nuevos indicadores que diferencien el origen de la contaminación. Con ayuda de este nuevo método de discriminación se puede llegar a definir riesgo sanitario, posibles sistemas de tratamiento de agua y normativa para el control, mejorando las condiciones ambientales, sanitarias y la conservación el recurso hídrico. Además se pueden llegar a definir las temporadas donde se presentan mayor cantidad de contaminantes en el cuerpo de agua, y a su vez las fuentes puntuales; como lo demostró el estudio realizado por McDonald *et al.* (2006), en donde por medio de diferentes métodos de identificación de contaminantes de origen fecal, se llegaron a caracterizar sus fuentes puntuales durante temporadas secas y de lluvia, en la playa de Jekyll y Sea Islands ubicadas en Georgia, Estados Unidos, concluyendo así que con cada uno de los diferentes métodos disponibles para discriminación de origen de la contaminación se puede llegar a un conocimiento más aproximado del origen y condiciones ambientales propicias para la generación de contaminación.

Uno de estos métodos está basado en la identificación de los fagos que infectan bacteroides (bacteriófagos), siendo en la actualidad una de las herramientas más usadas para el estudio de esta discriminación del origen de la contaminación fecal en aguas.

Bacteriófago es un virus que ataca directamente a las bacterias; por lo tanto sus características se corresponden con las de este grupo. Estos son ubicuos (se pueden encontrar en todas partes) y pueden ser encontrados en diversas poblaciones de bacterias, tanto en el suelo como en la flora intestinal de los animales. Uno de los ambientes más poblados por fagos y otros virus es el agua de mar, donde se estima que puede haber en torno a 10^9 partículas virales por mililitro, pudiendo estar infectadas por fagos el 70% de las bacterias marinas (USEPA 2000).

Tienen una estructura muy simple, a veces sólo una molécula de ácido nucleico recubierta de proteínas, en los bacteriófagos es muy frecuente que dispongan de estructuras complementarias como la cola y las espículas, también proteicas, que les permiten inyectar su ácido nucléico al interior de las bacterias. Según Jofre y Lucena (2006) los bacteriófagos sólo se pueden multiplicar en el interior de una bacteria y en general son muy específicos, es decir

solo se pueden multiplicar en bacterias de una determinada especie o en algunas cepas de bacterias de una determinada especie, por lo tanto se convierten en un buen indicador de contaminación fecal en aguas, además de poder discriminar entre residuo de origen fecal humano o animal. Esto se pudo comprobar con el estudio realizado por Tartera et ál. (1987), en donde haciendo uso de *Bacteroides fragilis* HSP 40 como microorganismo indicador de contaminación fecal y huésped del bacteriófago, se pudo evidenciar la eficiencia de la detección de fagos humanos en muestras de agua de río, de mar y lagunas: ya que este microorganismo demostró ser específico para muestras de agua con contaminación fecal humana, pues los fagos detectados en estas nunca fueron igualmente detectados en muestras contaminadas con heces de otros animales.

De igual manera, en el estudio realizado por Lucena et al. (2003) se evidencia la especificidad de los fagos a diferentes tipos de bacterias, que para el caso específico de este estudio fueron las especies de *Bacteroides* sp. Se realizó una comparación de *Bacteroides fragilis* RYC 2056 con otros tipos de indicadores, obteniendo como resultado que en los ríos donde se presentan mayor cantidad de microorganismos indicadores tradicionales como coliformes fecales y diversos tipos de Bacteroides, también aumentan el número de bacteriófagos encontrados en dicha área, y por lo tanto, su determinación se hace más sencilla, haciendo del uso de bacteriófagos, un método indicador eficaz, más específico y con la misma credibilidad y certeza que cualquier otro indicador tradicional.

En general los bacteriófagos suelen ser bastante persistentes en el ambiente y a su vez bastante resistentes a desinfectantes tanto físicos como químicos. A diferencia de las bacterias, que suelen presentar estados que se definen como no cultivables (estresadas, lesionadas, etc.) pero aún viables, lo que a veces complica la interpretación de algunos resultados referentes a la eliminación de las mismas en diversos sistemas de tratamiento de aguas residuales, los bacteriófagos son infecciosos o no lo son.

Los bacteriófagos que infectan a ciertas bacterias entéricas, bacterias que habitan en el tubo digestivo, se originan en el tubo digestivo de las especies animales en que se encuentran las bacterias en cuestión y por lo tanto se encuentran en los excrementos. De esta manera, se han propuesto tres grupos de bacteriófagos como posibles indicadores de contaminación fecal y de calidad microbiológica del agua. Estos son: 1) los fagos somáticos, que infectan *E. coli* a través de la pared celular; 2) los bacteriófagos F-específicos RNA que infectan *E. coli* y otras

enterobacterias a través de los pelos sexuales codificados por el plásmido F, y 3) los bacteriófagos que infectan Bacteroides, que es el grupo bacteriano más abundante en el tubo digestivo de los animales homeotermos (Jofre y Lucena 2006), haciéndolos más específicos para determinar el origen de la fuente de contaminación de origen fecal.

Dada esta especificidad, se puede valorar entonces el tipo de Bacteroide típico del tracto humano o animal, y de igual manera, el fago que lo infectó, dando así claves para tomar decisiones racionales en cuanto al manejo y las políticas del agua. Esto fue confirmado en el estudio realizado por Payan et ál. (2005), en donde se evaluaron diferentes tipos de Bacteroides, provenientes de diferentes partes del mundo y se determinó la especificidad de *Bacteriodes fragilis* RYC 2056 para la identificación de fagos existentes en heces animales, GA17 y HB 13 para identificar fagos en heces humanas y en menor concentración para identificar fagos en excrementos de animales (Araujo et al, 2001; Balanche-Muñoz et al, 2008; Blanch et al, 2004,2006; Bonjoch et al, 2005; Cárdenas y Guerrero 2000; Durán et al, 2006; Field et al, 2007; Griffith et al, 2003; Jofre y Lucena, 2006; Leclerc et al, 2000; Lucena et al, 2006, 2003; McDonald et al, 2006; Payán et al, 2005; Shanks, 2005 y TFSPW, 2004). Estos mismos tipos de bacteroides serán los utilizados para este estudio.

2.9. Discriminación de la fuente microbiana de contaminación (Microbial Source Tracking)

El deterioro microbiológico del agua se evalúa mediante el control de las concentraciones de bacterias indicadoras de contaminación fecal, tales como coliformes fecales y enterococos (USEPA 2000). Estos microorganismos se asocian con la materia fecal de los seres humanos y otros animales de sangre caliente y su presencia en el agua se utiliza para indicar potencial presencia de agentes patógenos entéricos que pueden causar enfermedad en las personas expuestas (Dufour 1984).

Para realizar una gestión eficaz de la contaminación fecal de los sistemas de agua, las fuentes deben ser identificadas con anterioridad a la aplicación de prácticas de remediación. Esta identificación debe ser fiable, por lo tanto, los métodos de determinación de la fuente son imprescindibles para el desarrollo de mejores prácticas de gestión para el control de la

contaminación fecal, bien sea de origen humano o animal, y así proteger a los usuarios de aguas de una posible enfermedad causada por microorganismos patógenos, e igualmente preservar la integridad del suministro de la fuente de agua potable.

La demanda inmediata de métodos de seguimiento de la fuente microbiana de contaminación se ha visto estimulado por la corriente Total de Carga Máxima Diaria (TCMD), la cual se basa específicamente en las normas de calidad que debe cumplir el agua, en términos de la cantidad máxima de un contaminante que un cuerpo de agua puede recibir, sin afectar la calidad de la misma.

Este método es válido para estudiar los residuos procedentes de fuentes puntuales como las plantas de tratamiento de aguas residuales o industriales. Sin embargo, en el caso de las fuentes no puntuales, es complicado aplicar esta metodología, ya que la mayoría de estas están asociadas con operaciones agrícolas, contaminación urbana, desarrollo industrial, utilización del estiércol como fertilizante, persistencia de los desbordamientos de alcantarillado combinado con el mal funcionamiento de los sistemas sépticos, lo cual hace imposible llevar a cabo mediciones de TCMD en cada uno de estos puntos. De esta manera y debido a la variedad de potenciales fuentes fecales de contaminación que afectan a las cuencas hidrográficas, la determinación de la fuente es una tarea difícil que requiere a menudo equipos multidisciplinarios para aplicarla efectivamente.

Los primeros intentos para clasificar las fuentes de materia fecal sobre la base de los identificadores de origen microbiano se centró en la discriminación de las fuentes de contaminación en una forma amplia (es decir, los no humanos vrs. otras categorías) sobre la base de los coliformes fecales y estreptococos fecales (EPA 2005).

Más recientemente, el enfoque del seguimiento de la fuente microbiana de contaminación o Microbial Source Tracking (MST) se ha desarrollado para asociar diversos animales con la contaminación fecal de las aguas naturales. MST se basa en el supuesto de que, dado el método adecuado de identificación y conocimiento de la fuente, el microorganismo indicador de contaminación fecal puede ser detectado.

Además de tener este objetivo, se encuentran otros tres objetivos para tener en cuenta en la discriminación de la fuente microbiana de contaminación. Según Field (2007) el primero de estos y principal es para investigar la fuente donde se encuentran altas concentraciones de bacterias indicadoras de contaminación fecal, que desde el punto de vista de regulaciones

medioambientales, es primordial, ya que identificando la fuente de contaminación fecal se puede eliminar. El segundo objetivo es identificar patógenos particulares en el agua, pues ciertas fuentes de contaminación fecal pueden estar asociadas con patógenos específicos (por ejemplo *E. coli* O157:H17 con heces ruminales). Este último está relacionado con el tercer objetivo, el cual es la estimación del riesgo a la salud pública asociada con la exposición al agua contaminada de los individuos a estudiar.

En términos generales, según EPA (2005), los métodos de MST podrían agruparse en *métodos dependientes de bases de datos* y *métodos independientes de bases de datos*:

- *Métodos dependientes de bases de datos*: requiere del desarrollo de bases de datos genotípicas o fenotípicas de las cepas bacterianas asociadas con las fuentes sospechosas de contaminación fecal. Las cepas aisladas de las aguas contaminadas se comparan con estas bases de datos para su clasificación. Indicadores bacterianos de contaminación fecal (por ejemplo, *E. coli* y enterococos) son comúnmente utilizados para el desarrollo de este método.
- *Métodos independientes de bases de datos*: no dependen del aislamiento de determinados microorganismos indicadores, ya que la detección se realiza a través de la amplificación de un marcador genético de una Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), entre otros. Sin embargo, algunos métodos a menudo requieren un pre-enriquecimiento para aumentar la sensibilidad de este enfoque.

Varios métodos de discriminación de la fuente microbiana de contaminación están siendo aplicados en el desarrollo de planes y TCMD en la evaluación de las mejores prácticas de gestión. Sin embargo, debido al reciente desarrollo de MST, los gestores y los científicos tienen poca formación y experiencia en la aplicación de métodos para aplicar planes basados en TCMD, pues hasta la fecha no existe un único método que podría aplicarse a todos los tipos de sistemas de abastecimiento de agua contaminados fecalmente. Esto se debe, en parte, al hecho de que varios factores pueden controlar el nivel de complejidad de un sistema de abastecimiento de agua, lo cual tiene un impacto directo en la elección del mejor método para la identificación de las principales fuentes de contaminación. Dado estos inconvenientes se debe reconocer la importancia de las medidas de gestión efectivas que disminuyan la

contaminación fecal y se plantea la necesidad de desarrollar, evaluar, validar, y normalizar métodos que podrían ayudar a los gestores a plantear planes de manejo del agua contaminada de una manera segura y con bases científicas válidas.

Así se presentó en el estudio realizado en Virginia, Estados Unidos, por Hyer y Mayer (2004), donde se evaluó el Total de Carga Máxima Diaria (TCMD), para una serie de arroyos y ríos, obteniendo información relativa a las principales fuentes de coliformes fecales que llegaron a perjudicar la calidad de las aguas superficiales, aumentando así el desarrollo de modelos eficaces de cuencas hidrográficas y mejoramiento de la TCMD.

De esta manera, este estudio pretende hacer un acercamiento a la discriminación del origen microbiano de contaminación, evaluando el método propuesto por TFSP (2004), donde se estudiaron varias especies de Bacteroides como indicadores de contaminación fecal, entre estas las cepas RYC 2056, GA 17 y HB 13, comparándolas con bacterias indicadoras tradicionales (coliformes fecales, *Clostridium perfringens* y fagos somáticos), a lo largo de la cuenca del río Bogotá en Colombia.

2.9.1. Métodos dependientes de bases de datos usando cultivos.

2.9.1.1. Resistencia antibiótica

Muchos de los métodos de resistencia antibiótica como lo son MAR (Resistencia Múltiple a Antibióticos), ARA (Análisis de Resistencia Antibiótica) y ARP (Patrones de Resistencia Antibiótica) evalúan *E. coli* o Enterococos comparándolos con diferentes tipos de antibióticos conocidos; de esta manera se logra discriminar si dichos microorganismos provienen de fuentes humanas o animales. Estos métodos se basan en la teoría que los humanos, animales domésticos y salvajes han sido expuestos a diferentes tipos de bacterias, por lo tanto cuando las bacterias encontradas en sus heces se enfrentan con antibióticos, la resistencia de cada uno estas bacterias fecales difiere en tipos y cantidades para cada uno de ellos, bien sea en animales o en humanos.

Sin embargo, esta teoría es incierta ya que se ha detectado que cuando se usan antibióticos de la misma clase para humanos y animales domésticos, comparten los mismos mecanismos de resistencia, es decir las bacterias fecales pueden verse afectadas por los

mismos antibióticos tanto en humanos y animales, lo que lo hace un método poco preciso para discriminar el origen de la contaminación entre humano y animal.

Otro inconveniente de este método es que no es geográfica ni temporalmente estable (Ebdon y Taylor 2006), y se ha demostrado además que para estudios de discriminación de fuente de contaminación fecal no presenta resultados reproducibles y no pueden identificar con certeza la fuente de contaminación (Griffith et al. 2003).

2.9.1.2. Otros métodos fenotípicos

Entre estos se encuentran CUP (Perfil de la Utilización de la fuente de Carbono), también llamada huella genotípica o fenotípica, encontrado comercialmente como un sistema de microcajas de petri que contienen sustratos de carbono para ayudar al crecimiento bacteriano, con esto se generan patrones de utilización de sustrato de las bacterias fecales aisladas. Sin embargo, con este método también se han visto deficiencias debido a que no se logra hacer una comparación si dichas bacterias son de origen fecal humano o animal. Igual sucede con el FAME (Ácidos Grasos Metil Ester), con el cual por medio del perfil de uso de estos componentes por parte de una determinada bacteria, se puede definir su origen fenotípico, sin embargo este método es muy específico para estudios a nivel de aceites e hidrocarburos, lo cual los hace muy específicos sólo para estudios de este tipo, en donde solo se encontrarán bases de datos de dichos microorganismos en estos medios, y en donde es muy poco probable encontrarlos en fuentes de contaminación fecal, por dicha razón es pobremente usado para este tipo de estudios de discriminación de fuente de contaminación fecal (Duran et al. 2006).

2.9.1.3. Huella de DNA: ribotipificación, REP-PCR, PFGE y métodos relacionados

Dentro de los métodos genotípicos dependientes de bases de datos para determinar la fuente de contaminación se encuentran la ribotipificación, Amplificación por PCR de elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos (REP-PCR), con “primers” REP, BOX o

ERIC, Ampliación del Polimorfismo de la Longitud del Fragmento (AFLP), Electroforesis en Gel de Campos Pulsantes (PFGE), entre otros, son variantes de diversas técnicas de huella de DNA.

Para este tipo de métodos es importante el protocolo y el tamaño de la biblioteca, ya que dependiendo de esta muchas de las bacterias halladas de muestras ambientales pueden corresponder con las bases genómicas encontradas de bacterias fecales aisladas anteriormente y encontradas en diversas bases de datos.

Cuando no se da correspondencia entre las bases encontradas en la base de datos o biblioteca y las de las bacterias aisladas es importante, obtener sus bases de nucleótidos y por similitud con otro tipo de bacterias descartar las que son propias del lugar donde se tomó la muestra (Field 2007).

2.9.2. Métodos independientes de bases de datos usando cultivos

2.9.2.1. Bacteriófagos

Algunas cepas de *Bacteroides fragillis* crecen normalmente dentro del tracto intestinal de humanos específicamente y otras de humanos y animales a la vez. Sin embargo, estas bacterias no son comúnmente encontradas en países como Estados Unidos y Canadá. Por esta razón, se han aislado y estudiado otras cepas de *Bacteroides thetaiotaomicron* y *B. ovatus* usadas en diferentes áreas geográficas como indicadores de discriminación de contaminación fecal, según lo reportado en el estudio de Payan (2005).

Sin embargo, no se tiene un estudio amplio sobre los lugares específicos donde se encuentran dichos Bacteroides, por esta razón se hace necesario un estudio más amplio en diversos lugares del mundo y determinar que pueden ser usados como indicadores a nivel universal.

2.9.2.2. Bacterias

Un método ampliamente usado en la antigüedad para distinguir la contaminación de origen humano o animal es la diferencia en la proporción entre estreptococos y coliformes

fecales. Sin embargo, se presenta un inconveniente al usar este método, ya que al presentar estos dos microorganismos diferentes tiempos de supervivencia, de igual manera se hace diferente la manera de medir y cuantificar dichas bacterias. Además no genera una validez estadística y representatividad de la muestra tomada.

De igual manera se han usado *Bifidobacterium adolescentis* y Bifidobacterias fermentadoras de sorbitol para discriminar la fuente de origen humano y de origen animal.

Las bifidobacterias fermentadoras de sorbitol están comúnmente asociadas con heces humanas, sin embargo su permanencia en muestras ambientales es muy baja y nunca pueden ser detectadas en altas temperaturas, según lo estudiado por Bonjoch et al. (2005).

2.9.3. Métodos independientes de bases de datos sin usar medios de cultivos

2.9.3.1. Métodos químicos

La cafeína, esteroides y estanoles fecales, ácidos biliares, residuos de jabón, surfactantes como los alquil bencenos, fragancias, pesticidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos pueden ser usados como indicadores de contaminación humana o animal, dependiendo si se obtiene de un ambiente urbano o rural.

Sin embargo, una combinación del índice de niveles de cafeína y fragancias puede definir que es contaminación de origen humano y un nivel de esteroides determinado puede definir si es contaminación de origen humano o animal, según los estudios realizados por Blanch et al. (2006).

Sin embargo, la presencia de indicadores químicos no pueden correlacionarse con patógenos o bacterias indicadoras de contaminación fecal, dado que su presencia, transporte y persistencia en el agua se ve afectada por factores como su establecimiento, radiación ultravioleta, entre otros, mientras que las organismos indicadores en varias circunstancias no se ven afectados por estos procesos.

Por ejemplo, los tratamientos de aguas residuales remueven algunos indicadores químicos como la cafeína. La persistencia de los esteroides y estanoles es influenciada por el clima, tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos, los ácidos biliares son sumamente

estables a la degradación, ya que en varios casos son envueltos por sedimentos y resuspendidos (Field 2007).

Por lo tanto, estos indicadores no pueden ser usados, en la mayoría de los casos, como discriminadores de contaminación fecal, ya que su persistencia en el agua no se asemeja a la de las bacterias encontradas en el tracto intestinal tanto de humanos como de animales.

2.9.3.2. *Métodos moleculares*

En estos métodos un marcador genético es usado para analizar la muestra de agua, en donde previamente se ha realizado una extracción y concentración del ADN de las bacterias presentes en el agua, sin haber usado ningún medio de cultivo anteriormente para su mantenimiento. En la mayoría de los casos se usa el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con genes marcadores específicos, para amplificar la secuencia de ADN de los microorganismos a evaluar.

Este método es usado mayormente para determinar virus, bacterias aeróbicas y anaeróbicas, toxinas, entre otros (Field 2007).

2.10. Problemática de la calidad de agua de la cuenca del río Bogotá

Según CONPES (2004), el río Bogotá presenta buena calidad en su agua en la zona de nacimiento, pero a medida que aparecen los asentamientos humanos y las actividades productivas se va deteriorando. La degradación de la calidad del agua de la cuenca alta se debe principalmente a contaminación orgánica y bacteriológica, procedente de vertimientos de aguas residuales domésticas y de las curtiembres. La contaminación bacteriológica presenta altos índices a lo largo del río. Estos índices advierten sobre el problema que representa el río para los habitantes en el área de influencia, en términos de salud pública, superando un contenido de coliformes fecales de 100 UFC/100 ml, 158 mil ton/año de carga orgánica, y aportando a nivel de vertimientos industriales grasas, aceites y metales pesados como cadmio, cromo, cobre, plomo, níquel y otros residuos peligrosos.

En un estudio realizado por la CAR (2006) sobre la calidad del agua del río Bogotá, utilizando el cálculo del índice de calidad (ICA) como parámetro integrador, el cual indica el grado de contaminación del agua a la fecha del muestreo y está expresado como porcentaje del agua pura; así, agua altamente contaminada tendrá un ICA cercano o igual a 0%, mientras que en el agua en excelentes condiciones el valor del índice será cercano a 100%, teniendo en cuenta parámetros fisicoquímicos y biológicos como lo son: oxígeno disuelto, la demanda biológica de oxígeno, el nitrógeno total, el fósforo total, los sólidos totales, la turbiedad, los coliformes fecales, pH y la temperatura, a los cuales se les asigna un valor de acuerdo a las gráficas de calidad respectiva, que esta dentro del rango de 0-100. Su importancia radica en compilar un alto nivel de agregación de la información utilizada para establecer la calidad del agua.

Con base en 16 sitios o estaciones de muestreo ubicados en la parte alta, media y baja de la cuenca, se obtuvieron los datos que se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados del Índice de Calidad de Agua para la cuenca del río Bogotá. Fuente: CAR (2006)

SUBCUENCA	No.	ESTACIÓN	ÉPOCA DE VERANO			ÉPOCA DE INVIERNO		
			CAUDAL (l/s)	ICA	CALIDAD	CAUDAL (l/s)	ICA	CALIDAD
Alto Bogotá	1	Aguas arriba de Villapinzón sobre el río Bogotá	539	85	BUENA	1263	67	MEDIA
	2	Después de descarga de curtiembres y de descarga de agregados Chocontá, sobre el río Bogotá	663	49	MALA	11079	55	MEDIA
	3	Antes del vertimiento de la PTAR de Chocontá, sobre el río Bogotá	1640	61	MEDIA	20754	55	MEDIA
	4	Aguas abajo de la PTAR de Chocontá, sobre el río Bogotá	1670	57	MEDIA	17479	56	MEDIA
Sisga Tibitoc	5	Aguas arriba de la PTAR de Suesca (puente Santander), sobre el río Bogotá	4750	72	BUENA	8397	69	MEDIA
	6	Puente Tulio Botero (Antes PTAR Tocancipa), sobre el río Bogotá	4500	73	BUENA	11392	44	MALA
	7	Estación El triunfo sobre el río Bogotá, aguas arriba de Tibitoc	5672	61	MEDIA	9478	52	MEDIA
Cerros Orientales	8	Estación puente Vargas, antes del vertimiento de PTAR de Cajicá, sobre el río Bogotá	6037	47	MALA	24870	45	MALA
	9	Estación puente La Balsa, después del vertimiento de PTAR de Chia, sobre el río Bogotá	6537	45	MALA	48177	44	MALA
(Tibitoc-Soacha)	10	Estación La Virgen, aguas abajo de la desembocadura de río Frio	9670	42	MALA	31236	47	MALA
	11	Aguas arriba de la descarga de Juan Amarillo.	8746	40	MALA	25739	49	MALA
Soacha	12	La Isla – aguas abajo de la descarga del Fucha y barrios Patio bonito, Gibraltar y Saucedal	22901	36	MALA	46380	41	MALA
Muña	13	Puente Chuzacá	32762	36	MALA	112940	43	MALA
Salto Apulo	14	Estación La Guaca	29341	48	MALA	100310	56	MEDIA
Bajo Bogotá	15	Aguas abajo de las descargas del municipio de Apulo.	44382	55	MEDIA	112063	52	MEDIA
	16	Aguas arriba de la desembocadura al río Magdalena	44196	55	MEDIA	107342	52	MEDIA

De acuerdo con lo anterior, se puede concluir entonces que las aguas de la cuenca presentan un deterioro considerable aguas abajo de Villapinzón. Luego hay una recuperación de la calidad en el cañón del Suesca, debido a la alta pendiente (favorece la aireación) y por el caudal del embalse del Sisga (favorece la dilución de contaminantes). Nuevamente se da un deterioro de la calidad del agua importante al disminuir la pendiente al entrar a la Sabana de Bogotá y por las descargas puntuales de aguas residuales.

En la cuenca alta la concentración de los diferentes contaminantes superan los estándares para uso del agua con fines de consumo humano, riego y recreación. Las descargas de contaminantes de Bogotá y la baja capacidad de autopurificación deterioran totalmente la calidad del agua. Después del embalse del Muña, debido a la caída del salto de Tequendama y a la adecuada sedimentación y en la parte baja, se recupera la calidad del agua y el río Bogotá llega al Magdalena con capacidad de asimilación de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), nitrógeno total (NT) y fósforo, pero impacto negativo por contaminación bacteriológica.

Para mitigar estos impactos referentes a la contaminación y la calidad del agua del río Bogotá, se hace necesario hacer uso de indicadores, los cuales fortalecen la línea base planteada dentro del Plan de Ordenación y Manejo de la Cuenca Hidrográfica del Río Bogotá, en cuanto a sus planes de evaluación y monitoreo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Caracterización y ubicación de la cuenca del río Bogotá

El río Bogotá nace al nor-orienté del municipio de Villapinzón, a 3300 msnm y sus aguas fluyen hacia el suroeste para desembocar en el río Magdalena, en Girardot a 280 msnm. En su recorrido drena las aguas de 6000 km², donde habitan alrededor de 8 millones de habitantes en 42 municipios, incluyendo Bogotá, y se proyecta que la población supere los 12 millones de habitantes para el 2020. Es decir, en la cuenca del río Bogotá habita cerca del 19% de la población del país, en la que se genera alrededor del 26% de la actividad económica nacional. En su recorrido de 336 km, el río Bogotá recibe las aguas de los ríos Sisga, Neusa, Tibitóc, Tejar, Negro, Teusacá, Frío, Chicú, Salitre, Fucha, Tunjuelito, Siecha, Balsillas, (que a su vez recoge las aguas de los ríos Subachoque y Bojacá), Calandaima y Apulo. Dicho recorrido se puede caracterizar en tres tramos: 1) Cuenca alta del río al norte de Bogotá, con una longitud de 145 km desde su nacimiento hasta el lugar conocido como La Virgen; 2) Cuenca media, con unos 68 km, desde La Virgen hasta Alicachín, en el extremo sur de la Sabana de Bogotá; y 3) Cuenca baja, con una longitud de 123 km, hasta la desembocadura en el río Magdalena. La cuenca media, puede dividirse a su vez en Cuenca Media Occidental y Cuenca Media Oriental, en la cual está Bogotá, la descripción gráfica de la cuenca del río Bogotá se puede ver en la figura 1. (IDEAM 2004).

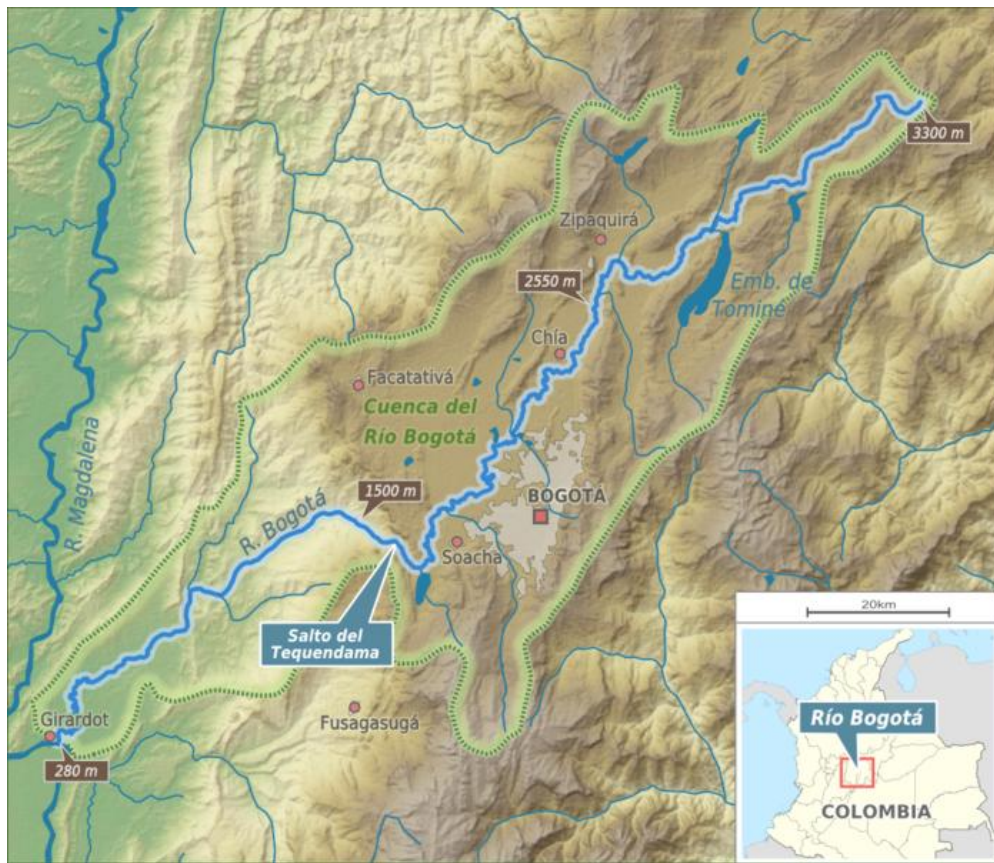


Figura 1. Cuenca del Río Bogotá.

3.1.1. Características generales de la cuenca alta del río Bogotá

La cuenca alta del río Bogotá se encuentra localizada en el altiplano cundiboyacense, administrativamente pertenece a la Provincia de Almeydas, está conformada por parte de los municipios de Villapinzón 46,28%; Chocontá 49,9%, Suesca 3,60%, Lenguaque 0,19% y Machetá 0,02%. Limita por el norte con Ventaquemada (Boyacá) y Lenguaque (Cundinamarca); al sur con el Municipio de Chocontá, al occidente con el municipio de Gachancipá y al oriente con los Municipios de Machetá y Gacheta, todos estos con altitudes por encima de los 2.000 msnm, con una altitud media del alrededor de los 2900 m.s.n.m (CAR 2006).

Se caracteriza por presentar una topografía variada con predominio de relieve fuertemente ondulado y fuertemente quebrado en una proporción superior al 67% del área total.

Las zonas escarpadas y muy escarpadas se localizan sobre el flanco suroriental de la cuenca alta a altitudes superiores a los 3.000 msnm, constituyendo una importante área de regulación hídrica de la cordillera oriental, en donde tiene lugar el nacimiento del río Bogotá y está actualmente declarada por la CAR como RESERVA FORESTAL PROTECTORA, mediante Acuerdo CAR 010 de 1982.

Las zonas de relieve suave, menos de 7% de pendiente, representan menos del 14 % del área total y se localizan sobre el cauce del río Bogotá o Funza, ampliándose principalmente en la jurisdicción del municipio de Chocontá.

Las zonas de relieve ondulado e inclinado representan aproximadamente el 17,3% del área y se localizan sobre el piedemonte, en dirección nor-oriental, paralelas a la dirección de drenaje del río Bogotá (CAR 2006).

Por pertenecer a la franja de baja presión de la zona de convergencia intertropical-ZCIT, la cuenca alta del río Bogotá tiene un régimen bimodal, con dos periodos lluviosos entre abril y junio el primero y de septiembre a octubre el segundo. Los períodos secos se presentan uno entre enero a marzo y otro entre julio y agosto.

Los valores máximos de precipitación se presentan en la parte sur oriental de la cuenca alta, con valores que fluctúan entre los 1.100 mm y 1.000 mm. Los valores más bajos se observan en la zona nor oriental, en el municipio de Villapinzón, con registros que fluctúan entre los 700 mm y 800 mm. En la parte media de la cuenca alta, la precipitación varía entre los 800 mm y 900 mm y en la parte baja se observan valores entre los 1.000 mm y 1.100 mm. La precipitación media en toda la cuenca del río Bogotá es de aproximadamente 850 mm.

Las temperaturas más bajas se presentan en la parte más alta de la cuenca en el oriente, con valores que fluctúan entre los 6° C y los 9° C. En la parte media de la cuenca alta, entre las cotas 2.500 msnm y 2.800 msnm, los valores varían entre los 9° C y los 12° C. finalmente las partes bajas de la cuenca alta, presentan valores que fluctúan entre los 12° C y los 15° C. La temperatura media de la cuenca alta del río Bogotá es de aproximadamente 12° C (CAR 2006).

En cuanto a los servicios públicos existentes en el municipio de Villapinzón, que fue la zona analizada en la parte alta de la cuenca del río Bogotá para este estudio, se presentan los siguientes:

- **Acueducto**

Para el Municipio de Villapinzón el acceso al servicio de acueducto tiene una cobertura del 100% el total de viviendas del municipio en el área urbana.

El sistema de acueducto cuenta con una planta de tratamiento de agua potable que opera con un caudal de 18 l/s, aunque tiene una capacidad de 34 l/s, derivado de la Quebrada Quincha y cuenta con 1.237 suscriptores instalados, todos con medición. La prestación del servicio de acueducto de la zona urbana funciona las 24 horas del día con una calidad aceptable del servicio. El área rural de Villapinzón presenta una cobertura del 69,7%.

- **Alcantarillado**

Para el Municipio de Villapinzón el sistema de alcantarillado cuenta con 1.124 suscriptores en el área urbana y cuenta con una cobertura del 95,2%.

La red de alcantarillado de Villapinzón es un sistema combinado que recoge aguas lluvias y domésticas, las cuales son vertidas directamente al río Bogotá sin ningún tratamiento.

Con relación al sistema de alcantarillado para el área rural del Municipio de Villapinzón solamente el 22% de la población cuenta con este servicio.

- **Sistemas de Tratamiento**

Respecto al tratamiento de aguas residuales domésticas en el área de la cuenca alta del río Bogotá, la zona urbana del Municipio de Villapinzón no cuenta en la actualidad con PTAR, solamente el Matadero de Villapinzón cuenta con una pequeña planta de tratamiento de aguas residuales propias del sacrificio de ganado bovino.

- **Residuos Sólidos**

El servicio de recolección de desechos sólidos en el Municipio de Villapinzón es prestado por la empresa de Servicios Públicos Domiciliarios, la cual cuenta con 1237 suscriptores y un cubrimiento del 97,2% en el área urbana y 7,7% para el área rural. La disposición final es efectuada en el relleno sanitario regional de Reatova, ubicado en el Municipio de Villapinzón.

En los Municipios de Villapinzón y Chocontá, la producción de residuos sólidos tóxicos proviene de la industria de las curtiembres (cebo o unche) diseminado en los potreros como abono, el cual contiene una alta carga contaminante de sulfuro de sodio; otro residuo es el ripio con alto contenido de cromo, dispuesto a cielo abierto y la quema de recortes de cuero curtido con altos contenidos de cromo.

En el área rural del municipio de Villapinzón solamente el 7,7% cuentan con un sistema de recolección de basuras, de un total de 1.146 viviendas ubicadas dentro de la cuenca alta del río Bogotá, las demás viviendas arrojan los residuos a cauces y quebradas, ocasionando problemas ambientales y contaminación adicional al recurso hídrico.

En las zonas rurales de este municipio los residuos sólidos vienen siendo dispuestos a cielo abierto, debido a la deficiencia de la recolección de éstas zonas.

- **Plantas de beneficio animal**

El matadero de Villapinzón es de tipo regional hecho para sacrificar ganado bovino, porcino, ovino con procedimientos técnicos y manejo integral ambiental.

- **Servicio de Energía**

En la cuenca alta del río Bogotá el servicio de suministro de energía eléctrica cuenta con un cubrimiento del 99% a nivel rural y urbano, es prestado por la empresa comercializadora CODENSA S.A. a las acometidas domiciliarias y alumbrado público, éste último es responsabilidad de los municipios en lo que respecta a suministro de energía, mantenimiento y ampliación del sistema.

- **Servicio de Teléfono**

En la cuenca alta del río Bogotá el servicio de telefonía en la zona urbana tiene un cubrimiento de un 40% y en el área rural es mínimo, existiendo un cubrimiento parcial por parte de Colombia Telecomunicaciones de apenas 2% a razón y se ha optado por sistemas de radioteléfonos y telefonía móvil; otro medio de comunicación, aunque con poco éxito han sido los teléfonos comunitarios localizados en zonas perimetrales a la zona urbana continua.

- **Servicio de gas Natural**

El servicio de gas domiciliario se ha convertido en una condición de desarrollo regional en la cuenca del río Bogotá y demás zonas de posible acceso al servicio. Por tanto, se debe proyectar, estudiar y gestionar la incorporación del sistema en el municipio, para lo cual se plantea realizar alianzas a nivel regional para la viabilización y ejecución del proyecto por las empresas prestadoras del servicio (CAR 2006).

En general la cuenca alta del río Bogotá cuenta con el cubrimiento de los servicios públicos de la siguiente manera:

Cuadro 2. Cubrimiento de servicios públicos en el sector urbano y rural de la cuenca alta del río Bogotá. Fuente: CAR (2006).

MUNICIPIO	ENERGÍA		RECOLECCIÓN BASURA		TELÉFONO	
	URBANO	RURAL	URBANO	RURAL	URBANO	RURAL
Chocontá	98,9	91,7	98,8	6,4	42,5	1,7
Suesca	99,6	95,8	97,3	19,2	47,0	7,0
Villapinzón	99,3	94,1	97,2	7,7	50,0	4,2
Promedio	99,2	93,8	97,7	11,1	46,5	4,3

3.1.2. Características generales de la cuenca media del río Bogotá.

La cuenca media del río Bogotá hace parte de la región Andina, del Altiplano Cundiboyacense y del centro de la Sabana de Bogotá. A nivel subregional provincial, Mosquera y Funza junto con Facatativa, Bojacá, Subachoque, El Rosal, Mosquera y Tenjo, constituyen la Provincia Sabana de Occidente y Chía, Cajicá, Cota, Zipaquirá, Sopo y Tocancipá hacen parte de la Provincia de Sabana Centro junto con Tabio, Nemocón, Gachancipá y Cogua; con altitudes que oscilan entre los 2600 y 3600 msnm. La altitud media de la cuenca se encuentra alrededor de los 2637 msnm.

La cercanía de estos municipios a Bogotá D.C. representa grandes beneficios, especialmente en las áreas de salud, educación superior y fuentes de trabajo.

La cuenca media del río Bogotá es la de mayor extensión territorial con aproximadamente 713 km². Se caracteriza por presentar topográficamente un predominio de

relieves planos a ligeramente ondulados sobre la parte más ancha de la Sabana de Bogotá en un porcentaje aproximado de 70,3% del área total, zona que en su mayoría sirve de asiento al área urbana del Distrito Capital, y de las zonas urbanas municipales de Mosquera, Cota y Cajicá y que es indicativo del alto grado de urbanización que se presenta en la cuenca media del río Bogotá.

Las zonas fuertemente onduladas, fuertemente quebradas a escarpadas se localizan principalmente sobre el flanco oriental de la cuenca media a altitudes superiores a los 3000 msnm y constituyen alrededor del 23,2% del área total constituyendo la región denominada de Cerros Orientales del Distrito Capital.

Las zonas de relieve ondulado e inclinado constituyen el 6,4% del área y se localizan sobre el piedemonte en dirección nor-oriental paralelas a la dirección de drenaje del río Bogotá

Por pertenecer a la franja de baja presión de la zona de convergencia intertropical-ZCIT, la cuenca media del río Bogotá debería tener un régimen bimodal, con dos periodos lluviosos entre abril y junio el primero y de septiembre a octubre el segundo.

Los valores máximos de precipitación se presentan hacia la zona de los cerros orientales, con valores que fluctúan entre los 1.100 mm y 1.400 mm, y disminuyen paulatinamente hacia el norte y hacia el occidente, presentándose los menores valores en los municipios de Mosquera, Puente Cundinamarca, Zipaquirá y Sopó. Hacia el norte, en los alrededores del municipio de Chía, se presentan valores entre 700 mm y 800 mm, y en los alrededores de los municipios de Funza, Cota y Tenjo, aún en la parte media de la subcuenca, se registran valores con precipitaciones que varían entre los 600 mm y los 700 mm, que se puede decir que están entre las más bajas del país, finalmente, en la zona urbana del Distrito Capital, se registran valores entre 900 mm y 1.100 mm. La precipitación media para la subcuenca, es de aproximadamente 800 mm.

Las temperaturas más bajas se presentan en la parte más alta de la cuenca media, esto es en todo el sector de los cerros orientales, desde el sur en el municipio de Ubaque, hasta el norte, en el municipio de Chía, con registros que fluctúan entre los 9° C y los 12 °C. En las partes bajas de la subcuenca, que cubren aproximadamente el 85% del área, se observan valores, con registros entre 12 °C y 15 °C. La temperatura media en la subcuenca es de aproximadamente 14 °C.

El valor promedio anual es de 14,8 °C. En general se puede decir que la variación a lo largo del año, a nivel mensual no supera los 3 °C.

Los valores máximos fluctúan alrededor de los 16° C y los mínimos alrededor de los 8° C. Los valores máximos extremos presentan un registro de 25° C en los meses de junio y julio y un valor mínimo de -4° C, en el mes de febrero.

En cuanto a los servicios públicos, se describirán a continuación los encontrados en el municipio de Nemocón y la ciudad de Bogotá, según el Plan de Ordenamiento Territorial de la CAR (2006):

- **Acueducto**

El municipio de Nemocón se abastece con base en dos fuentes, la primera la EAAB ESP y la segunda del pozo profundo Nemocón 2, que capta agua subterránea de la formación Tilatá.

La distribución actual se realiza por bombeo desde la planta de tratamiento e inyectando directamente a la red el agua comprada en bloque a la EAAB-ESP, volumen que corresponde aproximadamente al 75% del consumo actual del municipio de Nemocón. La producción directa se realiza desde un pozo ubicado en predios de la planta de tratamiento, el cual suministra cerca del 25% restante del consumo municipal. La capacidad nominal del pozo profundo es de 120 l/s. aunque su explotación está limitada a 38 l/s debido a la capacidad de tratamiento instalada. El pozo se perforó con una profundidad de 610 metros y la capacidad de tratamiento instalada es de 90 l/s.

La medición del volumen de la compra de agua es bloque se hace en los medidores instalados sobre la derivación de la tubería de interconexión Bogotá-Municipios.

El municipio de Nemocón cuenta con una cobertura del 99% en el servicio de agua potable, con 9.940 usuarios en la zona urbana y en la zona rural la cobertura es del 44,6% correspondiente a 391 viviendas.

En la zona rural del municipio de Nemocón el suministro de agua para consumo humano esta ubicado de la siguiente manera: por fuera del lote 149 viviendas, dentro del área del lote 100 viviendas y 142 dentro de la vivienda.

- **Alcantarillado**

En materia de prestación del servicio de alcantarillado, en el municipio de Nemocón se encuentran 2 sectores perfectamente definidos, en función del destino final de las aguas servidas: los colectores que entregan a la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y aquellos que descargan directamente al cuerpo receptor.

A la planta de tratamiento van las aguas recolectadas en el sector central o antiguo del municipio, lo que representa aproximadamente un 90% de la población actual. El restante 10% corresponde al sector de asentamientos urbanos discontinuos, ubicados en el costado izquierdo de la vía Panamericana que sale de Bogotá, a continuación del cruce sobre el río Bogotá.

En total existen 7 colectores principales para la zona urbana, que se encargan de conducir las aguas hasta la estación de bombeo, ubicada sobre la variante de la vía Panamericana, La estación de bombeo impulsa el agua hacia la PTAR, que tiene un caudal máximo de diseño de 500 l/s. Los flujos son enviados por una tubería de impulsión de 12” de diámetro hasta la planta de tratamiento, y los excesos en épocas de lluvia son evacuados a un vallado.

Un elemento importante del drenaje general dentro del área de Nemocón lo constituye la ciénaga Gualí – Tres Esquinas, a la cual se hacen algunos vertimientos de aguas residuales, por lo que la ciénaga se encuentra contaminada y requiere de un tratamiento particular independiente, para su recuperación ambiental. La misma puede integrarse al sistema de alcantarillado de aguas lluvias, pero deben suprimirse completamente los vertimientos de aguas residuales y de desechos.

La red troncal del alcantarillado de Nemocón está compuesta por 23,3 kilómetros de tubería de gres y cemento, y un total de 386 pozos de inspección. Este municipio cuenta con una cobertura en la zona urbana del 85,4% con 5.563 viviendas y en la zona rural con el 25,5% que equivalen a 351 viviendas.

- **Sistemas de Tratamiento**

El propósito de la planta es tratar las aguas residuales procedentes de la zona urbana de la población. Esta PTAR está localizada en la parte baja de la cuenca del río Subachoque, cerca de su confluencia con el río Bojacá; punto a partir del cual los caudales de estos dos ríos

forman una sola corriente denominada río Balsillas. La planta fue construida sobre un terreno de 18,67 hectáreas.

Esta planta se diseñó para una capacidad de 117 l/s, con el fin de atender una población de 32.234 habitantes. El porcentaje de remoción aproximado para esta planta de tratamiento de aguas es del 83%.

En la zona rural del municipio de Nemocón el manejo de excretas presenta las siguientes cifras: 11 viviendas que no cuentan con ningún sistema, 6 hogares con letrina, 5 hogares con inodoro sin conexión, 91 hogares con pozo séptico y 46 viviendas con inodoro conectado a alcantarillado.

En cuanto al sistema de tratamiento de Bogotá, ésta ciudad adoptó en 1993 el sistema de tratamiento de plantas independientes localizadas en la desembocadura de los ríos Salitre, Fucha y Tunjuelito, desarrollando el tratamiento de norte a sur, en el sentido del flujo del río Bogotá. En 1994 fue adjudicada al Consorcio Degremont Lyonnaise des Eaux la primera fase de la planta de tratamiento del Salitre.

La planta El Salitre trata las cuencas del Salitre, Torca y La Conejera, entrando en operación en su Fase I de tratamiento primario en el mes de septiembre de 2000. Esta planta remueve el 40% de la carga orgánica y el 60% de sólidos suspendidos y trata 4 m³/segundo reduciendo en un 9% la carga orgánica y sólidos suspendidos totales aportados al río Bogotá.

De acuerdo con los resultados de la evaluación de la planta Salitre Fase I, el programa de saneamiento del río Bogotá continuará con la construcción de la planta Salitre Fase II, de tratamiento secundario (calidad del efluente final, menos de 20 mg/l de DBO₅ y menos de 30 mg/l de sólidos suspendidos). La operación de la planta Salitre Fase I y II, significará una disminución del 18% de carga orgánica y del 11% de sólidos suspendidos totales aportados al río Bogotá.

La PTAR del Salitre está programada para una capacidad media de tratamiento de 8,40 m³/s. El sistema incluye procesos de tratamiento preliminar, primario y secundario, con recolección y tratamiento de lodos, para su disposición en relleno de seguridad.

La cuenca El Salitre es una de las cuencas más desarrolladas que cuenta con un sistema combinado y otro separado de alcantarillado. El sistema pluvial es el Canal del Salitre, al cual entregan los demás subsistemas y se desarrolló desde el centro oriente de la ciudad hasta la

Avenida 68, donde recibe el canal del río Negro. A partir de este punto las aguas son vertidas al cauce natural del río Negro y de aquí al río Bogotá.

La infraestructura troncal del alcantarillado sanitario y pluvial se encuentra construida hasta la calle 80 con avenida 68, en donde las aguas residuales recolectadas en la parte superior son entregadas al cauce del río Salitre afectando el humedal del Juan Amarillo. Se intervendrá esta red completando el sistema con interceptores que reduzcan los vertimientos directos sobre el humedal.

Respecto al diseño y construcción de los interceptores que llevan las aguas al sistema de tratamiento, se establecieron los siguientes: Sistema de tratamiento del Salitre: construcción del interceptor Salitre (Tramo II: Carrera 91-Planta de Tratamiento) con una longitud de 4,5 km.

- **Residuos sólidos**

En Nemocón los servicios de aseo se prestan en la zona urbana con total cubrimiento pero con deficiencia en el sector rural, no existe un programa de recolección de basuras con clasificación de materiales, que permitan el desarrollo futuro de proyectos de reciclaje y manejo de desechos.

La cobertura en el área rural es del 84%, con 323 usuarios en el área de ésta subcuenca. En Bogotá el servicio de recolección y transporte de desechos se realiza a través de contratos de concesión, bajo el control de la Unidad Ejecutiva de Servicios Públicos (UESP). La gestión comercial y financiera del servicio de aseo corresponde a la Empresa Comercial del Servicio de Aseo, ECSA, constituida por los concesionarios de recolección, barrido y limpieza.

- **Plantas de beneficio animal**

En Nemocón el matadero se encuentra cerrado por razones de manejo ambiental. De igual manera se ha reportado que se encuentra en construcción otro nuevo matadero de carácter regional con manejo de especies bovinas y porcinas; y con corrales para recepción del ganado, frigorífico e instalaciones complementarias tales como edificio principal, oficinas administrativas y de servicios sociales, parqueaderos, calzadas, cerramiento perimetral y tratamiento de aguas servidas.

En Bogotá hasta hace relativamente poco tiempo, los mataderos se consideraron parte de la función pública del Gobierno Distrital. Los mataderos que operan en la ciudad son de carácter privado: Los frigoríficos, únicos mataderos que funcionan con las especificaciones recomendadas por la Secretaria de Salud, se encuentran cerca de las industrias procesadores de alimentos.

Este es un sector que se comporta cada vez más como una industria privada que requiere más una regulación que una gestión del sector público.

- **Servicio de energía**

En la cuenca media del río Bogotá el servicio de suministro de energía eléctrica es prestado por la empresa comercializadora CODENSA S.A. a las acometidas domiciliarias y alumbrado público, éste último es responsabilidad a la fecha por parte de los municipios en lo que respecta a suministro de energía, mantenimiento y ampliación del sistema.

Suministro domiciliario: Para la zona rural contempla el 95% de cubrimiento, distribuido en la subcuenca; en cuanto a la zona urbana, cuenta con un 99% de cubrimiento de las domiciliarias.

- **Servicio de Teléfono**

El servicio de telefonía fija ha sido prestado en la subcuenca por TELECOM, hoy llamado Colombia Telecomunicaciones S.A., recientemente ingresó al mercado la Empresa de Teléfonos de Bogotá, la cual ha instalado algunas líneas en la zona urbana de Chía y Cota. Particulares comercializan este servicio a través de telecabinas y teléfonos monederos.

Adicionalmente Cajicá y Bogotá cuenta con numerosos usuarios de la telefonía móvil e Internet, en cerca de diez salas privadas de servicio público. Igualmente existe la comercialización de servicio de telefonía móvil a través de la venta de minutos en la calle o en negocios no adecuados.

En la subcuenca el servicio de telefonía en la zona rural corresponde en promedio al 23,34%; a nivel urbano en promedio existe un cubrimiento del 53,3% por parte de Colombia Telecomunicaciones.

- **Servicio de Gas Natural**

El servicio es prestado por la Empresa de Gas Natural Cundiboyacense. Su cobertura se concentra en la zona urbana centro y en los sectores rurales por donde se extiende el gasoducto que están ubicados cerca de la vía principal. En la actualidad para el caso de Chía existen 1932 usuarios en el municipio de los cuales la mayor parte pertenecen al estrato 2 y 3 con 929 y 772 usuarios, respectivamente.

En el cuadro 3 se presenta en forma resumida el porcentaje de cubrimiento de servicios públicos de la cuenca media del río Bogotá:

Cuadro 3. Cubrimiento de servicios públicos de la cuenca media del río Bogotá. Fuente: CAR (2006).

Municipio	Acueducto		Alcantarillado		Energía		Recolección de Basuras		Teléfono	
	Urbano	Rural	Urbano	Rural	Urbano	Rural	Urbano	Rural	Urbano	Rural
Cajicá	99,2	95,7	98,9	88,1	99,5	99,2	99,6	96,9	32,2	22,5
Chía	99,5	95,5	99,1	66,6	99,8	98,8	99,3	90,8	99,3	41,6
Cota	98,3	87,9	95,6	54,1	99,1	97,9	99,0	90,2	30,3	25,4
Funza	99,0	44,8	98,2	29,9	99,7	95,9	98,5	47,3	58,4	16,9
Nemocón	97,3	47,6	98,4	28,8	99,8	93,4	98,7	39,3	46,3	10,3

3.1.3. Características generales de la cuenca baja del río Bogotá

Políticamente la cuenca baja del río Bogotá pertenece al departamento de Cundinamarca, tiene una extensión de aproximadamente 544 km² y está dentro de la jurisdicción de los municipios que la conforman: Agua de Dios, Girardot, Ricaurte, Tocaima, La Mesa y Viotá; éstos a su vez se agrupan administrativamente en Provincias; Agua de Dios, Girardot, Ricaurte y Tocaima pertenecen a la provincia del Alto Magdalena, mientras que La Mesa y Viotá pertenecen a la provincia de Tequendama, con altitudes entre los 240 y 1450 msnm. La altitud media se encuentra alrededor de los 470 msnm.

Las administraciones municipales se ocupan de la prestación de los servicios públicos domiciliarios, de la promoción de la participación comunitaria y del desarrollo local en sus dimensiones física, económica, social y cultural. La administración local la dirige el alcalde quien es el representante legal del municipio y tiene por funciones velar por el cumplimiento

del orden jurídico, elaborar proyectos del plan de desarrollo y presupuesto, y dirigir la actividad administrativa del municipio en general. El 77,78% de la cuenca baja hace parte de la Provincia Alto Magdalena, cuya jurisdicción incluye los municipios de Agua de Dios, Girardot, Ricaurte, Tocaima, Nariño, Jerusalen y Nilo; y un 12,02% forma parte de la provincia del Tequendama cuya jurisdicción incluye La Mesa y Viotá.

La cuenca baja del río Bogotá está conformada por 82 veredas; 10 de Agua de Dios, 6 de La Mesa, 8 de Girardot, 8 de Nariño, 1 de Nilo, 13 de Ricaurte, 23 de Tocaima y 6 de Viotá.

Se caracteriza por presentar predominio de relieves planos a ligeramente ondulados en un porcentaje del 36,7% del área total, indicativo del alto potencial para actividades agrícolas y ganaderas de clima cálido. Sobre la zona plana se asientan las cabeceras municipales de los municipios de Girardot, Ricaurte, La Mesa (parcialmente), Tocaima y Agua de Dios.

Dentro de la subcuenca se presentan dos zonas montañosas que corren paralelas en dirección sur-oeste, nor-este y que se localizan sobre el flanco sur de la cordillera Alonso Vera ubicada en la zona occidental de la subcuenca y sobre el flanco norte de la cuchilla de Agua de Dios ubicada en la parte sur-oriental en altitudes inferiores a los 1000 msnm. Sobre la parte norte y nor-oriental de la subcuenca al norte de la ciudad de Tocaima, se presenta una cadena montañosa que corre en dirección sur-norte con altitudes de hasta 1300 msnm.

En estas zonas de montaña predominan los relieves fuertemente ondulado, fuertemente quebrado, escarpado y muy escarpado que constituyen aproximadamente el 49,6% del área total de la subcuenca. Las zonas de relieve ondulado e inclinado constituyen el 13,7% del área y se localizan sobre el piedemonte en dirección nor-oriental paralelas a la dirección de drenaje del río Bogotá en su parte más baja antes de su confluencia con el río Magdalena en cercanías de Girardot.

Los valores máximos de precipitación se presentan en la parte sur oriente, en el municipio de Viotá, con valores que fluctúan entre los 1.200 mm y los 1.400 mm y va disminuyendo paulatinamente hacia el noroccidente de la subcuenca, donde se observan los valores más bajos, en las partes altas del municipio de Tocaima, con registros que fluctúan entre los 1.000 mm y los 1.100 mm, finalmente en la parte media de la subcuenca, la precipitación varía entre los 1.100 y los 1.200 mm. La precipitación media es de aproximadamente 1.200 mm.

El valor total anual promedio es de 1122 mm, con valores máximos que superan los 1.400 mm y mínimos con registros por debajo de los 900 mm.

Las temperaturas más bajas se presentan en la parte más alta de la cuenca en el oriente, con valores que fluctúan entre los 21 °C y los 24 °C. Aumenta luego hacia el occidente, observándose valores de 24 °C a 27 °C en la zona central de la subcuenca. Finalmente en la parte más baja de la subcuenca, se registran valores que fluctúan entre 27 °C y 30 °C. La temperatura media en la subcuenca es de aproximadamente 26 °C.

El valor promedio anual es de 23 °C. En general se puede decir que la variación a lo largo del año no supera los 3 °C. Los valores máximos fluctúan alrededor de los 26 °C y los mínimos alrededor de los 24 °C. Los valores máximos extremos presentan un registro de 37,9 °C en el mes de septiembre y un valor mínimo de 24 °C en el mes de abril.

Los servicios públicos que se prestan específicamente para el municipio de la Mesa, que es el área de estudio seleccionada, están descritos a continuación:

- **Acueducto**

Los acueductos de la zona rural de La Mesa cuentan con tanques de almacenamiento ubicados cerca de las fuentes de captación y su distribución es mediante mangueras.

El servicio de acueducto en la zona rural del municipio de La Mesa, tiene una cobertura de 37,1%, que corresponde a 355 viviendas, lo cual indica que este servicio constituye una de las necesidades más relevantes del municipio.

En la zona rural del municipio de La Mesa el suministro de agua para consumo humano esta ubicado de la siguiente manera: por fuera del lote 101 viviendas, dentro del área del lote 246 viviendas y 66 dentro de la vivienda.

- **Alcantarillado**

En el municipio de La Mesa el alcantarillado presenta una cobertura en la zona rural del 7,3% correspondiendo a 355 viviendas.

- **Sistemas de tratamiento**

En la zona rural de La Mesa no existen sistemas de tratamiento de aguas residuales, por lo tanto las soluciones para la disposición de aguas residuales deberán consistir en la instalación de sistemas sanitarios individuales.

En la zona rural del municipio de La Mesa el manejo de excretas presenta las siguientes cifras: 137 viviendas que no cuentan con ningún sistema, 25 hogares con letrina, 19 hogares con inodoro sin conexión, 199 hogares con pozo séptico y 26 viviendas con inodoro conectado a alcantarillado.

- **Residuos sólidos**

En el área rural de La Mesa, a pesar de la disposición de basuras que se lleva a cabo en algunos sectores, la basura se viene disponiendo en lotes a cielo abierto donde se incineran o es dispuesta en quebradas cercanas a las casas.

El servicio de aseo público de este municipio cubre el 15,5% en el sector rural con 355 viviendas.

- **Planta de beneficio animal**

En la actualidad el municipio de La Mesa cuenta con un matadero ubicado en la zona urbana, el cual carece de cuarto frío. Báscula y sistema de depuración de aguas residuales. En la zona rural de La Mesa no se cuenta con matadero para el sacrificio animal.

- **Energía eléctrica**

En cuanto a la energía eléctrica la zona urbana y rural presentan una cobertura del 96,8% y 87,8%, respectivamente, la cual se considera de un alto nivel para la cuenca baja del río Bogotá, aunque en el área rural hay diferencias considerables en la cobertura entre los municipios, siendo Ricaurte el que presenta mejor cobertura con un 92,2% y Agua de Dios el que presenta menor cobertura con un 82,9%.

- **Telefonía**

El servicio de telefonía tiene una cobertura de 44,28% en el área urbana y 4,65% en el área rural, siendo ésta última muy baja.

- **Gas Natural**

El servicio de gas natural se presta en el área urbana de Girardot, Ricaurte y Tocaima.

Datos generales sobre el cubrimiento de servicios de energía eléctrica, teléfono y gas natural en los municipios de la cuenca baja del río Bogotá se presentan en el cuadro 4:

Cuadro 4. Cobertura de energía, teléfono y gas en la cuenca baja del río Bogotá. CAR (2006).

Municipios	Energía Eléctrica				Teléfono				Gas Natural			
	Urbano		Rural		Urbano		Rural		Urbano		Rural	
	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
LA MESA	762	95,8	1223	85	762	40,7	1223	2,9	762	0,4	1223	0
AGUA DE DIOS	2552	97,1	724	82,9	2552	43,4	724	3,9	2552	0	724	0
GIRARDOT	18237	97,9	1049	83,7	18237	52,3	1049	2,6	18237	13,3	1049	0,1
RICAURTE	742	96,6	1134	92,2	742	49,7	1134	10,1	742	18,1	1134	0
TOCAIMA	2318	97	1834	91,2	2318	35,3	1834	8,1	2318	35,3	1834	3,9
VIOTÁ	NO	NO	2964	91,8	NO	NO	2964	0,3	NO	NO	2964	0
CUENCA BAJA		96,88		87,80		44,28		4,65		13,42		0,67

3.2. Selección de puntos de muestreo

Para la selección de los puntos de muestreo dentro de la cuenca del río Bogotá se llevó a cabo un análisis de los resultados obtenidos en otros estudios del grupo de investigación del Laboratorio de Indicadores de la Pontificia Universidad Javeriana, como el realizado por Cárdenas y Guerrero (2000) en donde se tomaron diferentes puntos, tanto de la cuenca alta como de la cuenca baja, y se hizo análisis de coliformes fecales, fagos somáticos y Bacteroides, para cada una de las estaciones de muestreo.

Sin embargo, para el caso específico de este estudio se seleccionaron para cada parte de la cuenca puntos con diferente tipo de fuente de contaminación: doméstica, mixta y animal, basándose en los datos provenientes de estudios previos realizados a lo largo de la cuenca y que permiten conocer los sitios más representativos para el muestreo, como el estudio denominado “Monitoreo y diagnóstico de la calidad del agua del río Bogotá analizando aspectos biológicos y su impacto en la salud de las comunidades” realizado en el año 2004, en donde se estudió la calidad del río Bogotá desde su nacimiento hasta su desembocadura, evaluando el impacto de las condiciones del río Bogotá sobre la salud de las personas que habitan cerca de su cuenca (Pontificia Universidad Javeriana 2004).

Se recogieron tres muestras en cada una de las estaciones de muestreo entre los meses de abril y septiembre del año 2009, siendo en total 27 muestras analizadas. Cada muestra se analizó para cada uno de los indicadores propuestos (coliformes fecales, fagos somáticos, *Clostridium prefringes*, *Bacteroides* RYC 2056, *Bacteroides* GA 17 y *Bacteroides* HB13).

Las estaciones de muestreo seleccionadas fueron las siguientes:

1. Cuenca alta:

- Afluente de la planta de tratamiento de aguas del Matadero de Villapinzón, específicamente en la fase de sedimentación, luego de haber pasado por las rejillas de separación de sólidos grandes, Este punto fue nombrado para este estudio como Matadero Villapinzón (Fuente animal)



Figura 2. Estación de muestreo denominada matadero Villapinzón

- Aguas abajo del matadero de Villapinzón, donde se mezclan las aguas provenientes del matadero y del municipio, denominado en este estudio como Puente Centro Villapinzón (fuente doméstica).



Figura 3. Estación de muestreo denominada puente centro Villapinzón

- Río Bogotá en Villapinzón antes de recibir aguas del matadero, denominado Salida Villapinzón (aguas mixtas).



Figura 4. Estación de muestreo denominada salida Villapinzón

2. Cuenca media:

- Pozo estercolero de la finca ganadera San José, ubicada en el Municipio de Nemocón, en este punto sólo llega contaminación de origen fecal animal, ya que se reciben los desechos fecales de aproximadamente 15 vacas, al hacer un lavado de la zona en donde estas suelen pastar (fuente animal).



Figura 5. Estación de muestreo denominada pozo estercolero Nemocón

- Río Bogotá, mezcla entre el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales El Salitre y aguas domésticas descargadas directamente en el río Bogotá. Este punto es denominado dentro del estudio como río Bogotá PTAR (aguas mixtas).



Figura 6. Estación de muestreo denominada como río Bogotá PTAR.

- Afluyente de la planta de tratamiento de aguas residuales de El Salitre, en donde el agua contaminada solamente ha pasado la fase de remoción de material sólido grande y entra a la etapa de sedimentación de otro tipo de sólidos, denominado en este estudio como PTAR El Salitre (fuente doméstica).



Figura 7. Estación de muestreo denominada como PTAR El Salitre.

3. Cuenca baja:

- Efluente del matadero de La Mesa, en donde llega contenido ruminal y sangre en volúmenes similares y permanece en un pozo de cemento sin realizarse ningún tratamiento antes de filtrarse por el suelo. Esta estación de muestreo ha sido nombrada Matadero La Mesa (fuente animal).



Figura 8. Estación de muestreo denominada matadero La Mesa.

- Represa del Muña, donde se encuentra como fuente de contaminación la de origen mixto, ya que acá llegan aguas contaminadas tanto de origen humano, como de animal y también de origen industrial.



Figura 9. Estación de muestreo denominada represa del Muña.

- Aguas abajo de la represa del Muña, punto que presenta agua del río Bogotá de la parte baja de la cuenca, luego de haber pasado por la Represa del Muña (fuente doméstica)



Figura 10. Estación de muestreo denominada aguas abajo de la represa del Muña.

Tanto en la cuenca media como baja se dificultó la selección de los puntos de muestreo por la mezcla de vertidos de diferente origen, pero se seleccionaron los más representativos, de fácil acceso y donde se lograron los permisos de muestreo.

3.3. Fase de campo

3.3.1. Toma de muestras

Se tomaron muestras de agua de 500 ml para cada estación de muestreo seleccionada, las cuales fueron recogidas en botellas estériles y preservadas en frío hasta su análisis. Este procedimiento se repitió tres veces, para un total de 9 muestras por cada parte de la cuenca y 27 en total para las tres partes de la cuenca. Se hizo el análisis y evaluación para cada uno de los indicadores, sumando 162 análisis en todo el estudio, entre los meses de abril y septiembre del año 2009.

Los análisis de bacterias (coliformes fecales, *Clostridium perfringes*) fagos somáticos y fagos de *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 y HB 13, se realizaron en el Laboratorio de Indicadores de Calidad de Agua, ubicado en la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia; siendo 24 horas el tiempo máximo en donde se pueden analizar cada uno de los indicadores.

A una de las muestras recolectadas en cada estación de muestreo, se le extrajo el DNA y se realizó un análisis molecular denominado PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), con el fin de confirmar los resultados obtenidos para la fase de laboratorio; este procedimiento se explicará en detalle más adelante.

3.4. Fase de laboratorio

3.4.1. Pase y recuperación de *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 y HB 13

Debido a que las cepas de *Bacteroides* para evaluar en este estudio fueron donadas por la Universidad de Barcelona, se hizo necesario realizar un pase y recuperación de los mismos, con el fin de tener viales en stock (reserva) para poder hacer los análisis pertinentes del agua de cada una de las muestras tomadas.

Según el Método ISO 10705-4 (Anónimo 2001), el procedimiento a seguir para hacer este pase es el que se describe a continuación:

- 1) De los viales que contenían los *Bacteroides* se realizó una siembra masiva en Agar BPRMA, por duplicado para cada una de las cepas (GA17, HB13 y RYC 2056) y se dejó incubando en condiciones de anaerobiosis a 37 °C por 24 horas.
- 2) Se tomó con un isopo una muestra abundante de las colonias de bacterias obtenidas del paso anterior y se pasaron a un tubo 16 x 150 que contenía caldo BPRMB, manteniéndolo en condiciones de anaerobiosis; este se dejó durante toda la noche en incubación a 37 °C.
- 3) De los tubos con bacterias se tomaron 2 mL y se mezclaron con 10 mL de caldo BPRMB. Se incubaron a 37 °C en anaerobiosis durante 3 horas y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm la cual debe estar entre 0,3 y 0,5.

- 4) Cuando se obtuvo la absorbancia deseada, las cepas obtenidas se pasaron a viales, mezclándolas con el crioprotector, a base de glicerol y agua destilada estéril, teniendo en cuenta una concentración de 1:1 v/v. Este último se agregó con el fin de conservar y mantener a las bacterias estables manteniéndolas a una temperatura de -70 °C.

3.4.2. Curva de crecimiento de los Bacteroides

Para cada uno de los Bacteroides evaluados se realizó una curva de crecimiento para verificar a que hora y en que concentración se presenta la fase logarítmica o de crecimiento exponencial, y de igual manera su fase de latencia y posterior muerte. Esto se realizó en los meses de marzo, abril, mayo y agosto de 2009. Cabe anotar que el trabajo final se realizó con una cepa traída desde la Universidad de Barcelona, la cual contaba con la concentración ideal de trabajo.

Las curvas realizadas para cada cepa de Bacteroides y en cada una de los meses, se encuentran claramente explicadas en el Anexo 3, incluidas las cepas de trabajo traídas en el mes de agosto.

Para tener en cuenta el crecimiento de los Bacteroides se utilizaron dos técnicas: la primera fue “recuento de células viables” que consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula viva (viable) y aislada que se encuentra en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas produce una colonia en un breve lapso de tiempo.

La segunda técnica es la denominada “medida de la masa de células” que se basa en el crecimiento bacteriano en un medio líquido, en donde las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente en la mayoría de los casos, formando una suspensión de células libres; esta suspensión dispersa la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en suspensión y, por lo tanto, midiendo esta se puede estimar la concentración bacteriana. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio y se realiza con ayuda del espectrofotómetro en donde se mide la absorbancia.

Guzmán (2005) plantea cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano; de estas es importante tener en cuenta la *fase exponencial* o *logarítmica* de cada uno de los Bacteroides, pues en esta se presenta la infección y multiplicación dentro de los Bacteroides de los fagos que los infectan:

- **Fase lag o de adaptación:** durante esta fase los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.
- **Fase exponencial o logarítmica:** en ella la velocidad de crecimiento exponencial es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima.
- **Fase estacionaria:** en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios. Los microorganismos entran en fase estacionaria bien porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales.
- **Fase de muerte:** se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

Según el método ISO 10705-4 (Anónimo 2001), el procedimiento a seguir para realizar la curva de crecimiento se describe a continuación:

- 1) Se tomaron 2 ml de un vial en reserva o “stock” y se pusieron en 10 ml de Caldo BPRMB conservando las condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante toda la noche.
- 2) A partir de la mezcla anterior se sembró 1 ml de bacteria adicionando posteriormente Agar BPRMA y se llevó a incubación en anaerobiosis por 24 horas a 37 °C. Este procedimiento se realizó cada hora durante 6 horas.
- 3) Durante cada hora se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm.

4) Pasadas las 24 horas de incubación se realizó el conteo de colonias encontradas en cada caja y se calculó el número de UFC, así:

$$UFC = \frac{N}{(VF)}$$

N= Número total de colonias contadas en la caja.

V= Volumen usado en la prueba con dilución.

F= Factor de dilución usado (F = 1 para una muestra no diluida, F = 0.1 para una dilución 1:10, F = 0.01 para una dilución 1:100).

3.4.3. Recuperación de los fagos de Bacteroides

Debido a que los fagos de *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 y HB 13 fueron donados por la Universidad de Barcelona, se hizo necesario realizar una recuperación de los mismos, con el fin de tener viales en reserva (stock) para poder hacer los análisis pertinentes del agua de cada una de las muestras tomadas.

Según el método ISO 10705-4 (Anónimo 2001), el procedimiento a seguir para la recuperación de fagos es el que se describe a continuación:

- 1) De un tubo con caldo BPRMB y bacteria crecida durante toda la noche se tomó 1 ml y se mezcló con 100 µl de fago, se completó con caldo BPRMB estéril hasta obtener las condiciones de anaerobiosis, dejándolo en incubación a 37 °C por 24 horas.
- 2) A partir del volumen obtenido en el paso anterior se agregó el 10% de cloroformo, esto con el fin de facilitar la eliminación de bacterias y recuperar solamente el fago.
- 3) Se agitó fuertemente con la mano y se pasó a centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- 4) Luego de la centrifugación se obtuvo una mezcla de dos fases, se sacó el sobrenadante en otro tubo estéril y se eliminó la parte clara y precipitado.
- 5) Este sobrenadante se filtró con un filtro de poro de 0,22 µ de poliéster sulfona. El resultante de este filtrado es el fago recuperado puro, el cual se guardó a 4 °C para realizar su posterior titulación.

3.4.4. Análisis de coliformes fecales

Se realizó la enumeración de coliformes fecales mediante filtración por membrana por medio del método APHA 9222 D (1995), el cual se describe a continuación:

- 1) El equipo de filtración debió ser montado cerca de una fuente de calor, para crear un flujo de aire ascendente y evitar contaminaciones accidentales.
- 2) Se colocó la membrana de filtración en el centro del soporte, con la cuadrícula hacia arriba.
- 3) Se realizaron diluciones seriadas entre 1×10^{-1} y 1×10^{-4} , para la mayoría de las muestras a analizar y se llevaron a filtración.
- 4) Se filtró 1 mL de la muestra a analizar, agregando antes 20 mL de una solución de peptona salina.
- 5) Se retiró la membrana del soporte y se colocó con la cuadrícula hacia arriba sobre agar m-FC, el cual contiene peptona, proteasa, triptosa y extracto de levadura, actuando como fuente de carbono, nitrógeno, minerales, vitaminas y otros nutrientes esenciales. Contiene lactosa como carbohidrato fermentable y sales biliares, las cuales inhiben las bacterias gram-positivas acompañantes. También posee azul de metileno y trifenil metano, actuando como supresores del crecimiento de las bacterias acompañantes. El sistema indicador de este medio de cultivo esta basado en el cambio de color de este dado por el azul de metileno y al ácido rosólico.
- 6) Se incubó a $44,5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.
- 7) Se cuantificaron las colonias que presentaban un color azul. Las colonias de color crema o gris no se contaron como coliformes fecales. Para evitar errores por pequeños cambios de color, es importante que el recuento se haga dentro de los 30 minutos siguientes después de haber sacado la muestra de la incubadora.
- 8) Para el informe se seleccionaron las cajas que tenían un número de colonias típicas entre 20 y 80.
- 9) Se informó como Unidades Formadoras de Colonias por volumen de muestra (UFC/100 mL).
- 10) El número de UFC/100 mL de muestra fue calculado así:

$$UFC / 100 ml = \frac{NX100}{(VF)}$$

N= Número total de colonias contadas en la caja.

V= Volumen usado en la prueba con dilución.

F= Factor de dilución usado (F = 1 para una muestra no diluida, F = 0.1 para una dilución 1:10, F = 0.01 para una dilución 1:100, F= 0,001 para una dilución 1:1000; y así sucesivamente).

En caso de no encontrar colonias típicas o ningún tipo de crecimiento, se determina el límite de detección de la técnica, el cual se obtiene aplicando la fórmula anterior, con N = 1. El valor resultante se informa como “menor a” (<).

3.4.5. Análisis de *Clostridium perfringens*

Se realizó la enumeración de *Clostridium perfringens* mediante filtración por membrana según el método ISO 6461-2 (1986), que se describe a continuación:

- 1) El equipo de filtración debió ser montado cerca de una fuente de calor, para crear un flujo de aire ascendente y evitar contaminaciones accidentales.
- 2) Se colocó la membrana de filtración en el centro del soporte, con la cuadrícula hacia arriba.
- 3) La muestra se debió llevar a una temperatura de 75 °C en baño maría durante 15 minutos, para favorecer la esporulación de *Clostridium perfringens*
- 4) Se realizaron diluciones seriadas después de haber puesto la muestra a altas temperaturas, y se llevaron a filtración.
- 5) Se filtró 1 mL de la muestra a analizar, agregando antes 20 mL de una solución de peptona salina.
- 6) Se retiró la membrana del soporte y se colocó con la cuadrícula hacia arriba sobre agar SPS (Sulfito Polimixin Sulfadiazina), el cual contiene peptona como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, extracto de levadura, suplementado con vitaminas del

complejo B como estimulante del crecimiento bacteriano, citrato férrico y sulfito de sodio como indicadores de la formación de H₂S. *Clostridium* sp. reduce el sulfito, el cual reacciona con el hierro del citrato férrico, formando un precipitado negro de sulfuro férrico. El polisobarto 80 es usado como agente dispersante. El polimixin B sulfato y sulfadiazina son inhibidores de los microorganismos acompañantes en la muestra de agua. El tioglicolato de sodio actúa como agente reductor.

- 7) Las cajas de agar SPS con la membrana dispuesta sobre este se llevaron a incubación a 37 °C ± 1 °C durante 20 h ± 4 h en condiciones de anaerobiosis.
- 8) Se cuantificaron las colonias que presentaban color negro.
- 9) Se informó como Unidades Formadoras de Colonias por volumen de muestra (UFC/100 mL), seleccionando las cajas que tenían un número de colonias típicas entre 20 y 80.
- 10) Se calculó el número de UFC/100 mL de muestra, así:

$$UFC / 100ml = \frac{NX100}{(VF)}$$

N= Número total de colonias contadas en la caja.

V= Volumen usado en la prueba con dilución.

F= Factor de dilución usado (F = 1 para una muestra no diluida, F = 0.1 para una dilución 1:10, F = 0.01 para una dilución 1:100).

En caso de no encontrar colonias típicas o ningún tipo de crecimiento, se determina el límite de detección de la técnica, el cual se obtiene aplicando la fórmula anterior, con N = 1. El valor resultante se informa como “menor a” (<).

3.4.6. Análisis de fagos somáticos

La cuantificación de fagos somáticos se realizó mediante el procedimiento de doble capa de agar, según el método ISO 10705-2 (Anónimo 2001), que se describe a continuación:

- 1) Se adicionaron 50 mL de caldo de cultivo MSB a un erlenmeyer y se dejó a temperatura ambiente o precaliente a 37 °C.

- 2) Se inoculó 0,5 mL del cultivo de trabajo en el caldo MSB y se llevó a incubación a 36 +/- 2 °C mientras se agitaba a 100 rpm.
- 3) Se realizó una medición de absorbancia en espectrofotómetro aproximadamente a las 2 ó 3 horas de haberlo incubado. Cuando la absorbancia correspondió a 0,147 – 0,335, lo cual es una densidad celular de aproximadamente 10⁸ UFC/mL, se tomó el inóculo de la incubadora y se llevó a enfriar rápidamente poniéndolo en hielo derretido, usando un lapso de 2 horas como máximo para realizar el análisis.
- 4) Se debe usar este inóculo de cultivo el mismo día de trabajo, obteniendo un conteo aproximado de 10⁸ UFC/mL.
- 5) Asépticamente se adicionaron 300 µl de solución de cloruro de calcio al medio MSAss a temperatura ambiente y se distribuyó en alícuotas de 2,5 mL en tubos con tapa.
- 6) Posterior a esto los tubos se colocaron en baño maría a 45 +/- 1 °C, mientras se llevaba a cabo el procedimiento de laboratorio
- 7) Se hicieron diluciones seriadas entre 1 x 10⁻¹ y 1 x 10⁻⁴ para cada una de las muestras a analizar.
- 8) A cada tubo se le adicionó 1 mL de muestra original de agua diluida,
- 9) Posteriormente se adicionó 1 mL del inóculo a cada tubo que contenía las muestras diluidas y finalmente se agregaron entre 4 y 5 ml de MSAss. Se vertió el contenido sobre la superficie de una caja con agar MSA mezclando cuidadosamente, evitando la formación de burbujas.
- 10) Se distribuyó uniformemente, dejando solidificar sobre una zona horizontal hasta que su superficie estuviera fría.
- 11) Se llevó a incubación boca abajo a 36 +/- 2 °C, por 18 +/- 2 h.
- 12) Se cuantificaron el número de placas en cada caja usando luz oblicua indirecta.
- 13) Las placas cuantificadas se informaron como Partículas Formadoras de Placas por volumen de muestra (PFP/100 mL)
- 14) El número de PFP/100 mL de muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$PFP/100 \text{ ml} = \frac{NX100}{(VF)}$$

N= Número total de placas contadas en la caja.

V= Volumen usado en la prueba con dilución.

F= Factor de dilución usado (F = 1 para una muestra no diluida, F = 0.1 para una dilución 1:10, F = 0.01 para una dilución 1:100).

En caso de no encontrar placas o calvas, se determina el límite de detección de la técnica, el cual se obtiene aplicando la fórmula anterior, con N = 1. El valor resultante se informa como “menor a” (<).

3.4.7. Análisis de fagos de *Bacteroides RYC 2056*, GA 17 y HB 13.

La cuantificación de fagos de *Bacteroides fragilis* se realizó mediante el procedimiento de doble capa de agar, según el método ISO 10705-4 (Anónimo 2001), que se describe a continuación:

- 1) Se tomó un vial de cultivo de bacteroides guardado en el Laboratorio de Indicadores de Calidad de Agua, ubicado en la Pontificia Universidad Javeriana y se adicionó a un tubo con medio líquido BPRMB, incubándolo a 36 +/- 2 °C.
- 2) Después de 3 horas de incubación, se midió la absorbancia en espectrofotómetro.
- 3) Cuando la absorbancia correspondió a una densidad celular de aproximadamente 2×10^8 UFC/mL, es decir que se encontrara entre 0.4 – 0.7, se tomó el inóculo de la incubadora y se usó inmediatamente para la cuantificación de fagos.
- 4) Se debe dejar equilibrar la muestra a temperatura ambiente.
- 5) Paralelo a esto se colocaron frascos con 50 mL de BPRMAss (Agar Semisólido para la recuperación de fagos de bacteroides) (agar base) en un baño de agua hirviendo a 45 +/- 1 °C.
- 6) Asépticamente, se adicionó hemina, Na_2CO_3 , y antibióticos al agar base, ajustando el pH entre 6.5 y 7.0 con HCl.
- 7) Se distribuyeron alícuotas de 2,5 mL en tubos con tapa, colocándolos en baño maría a 45 +/- 1 °C. Cada tubo corresponde a las diluciones realizadas para cada una de las muestras de agua a analizar, siendo estas diluciones entre 10^1 y 10^4 .

- 8) A cada tubo se le adicionó 1 mL de muestra original diluida dejándola a temperatura ambiente.
- 9) Finalmente se adicionó 1 mL del inóculo de bacteroides a cada tubo que contenía las alícuotas de la muestra y 4 mL aproximadamente de BPRMAss, mezclando cuidadosamente y evitando la formación de burbujas, se vertió el contenido sobre la superficie de una caja con agar BPRMA.
- 10) Se distribuyó uniformemente, dejando solidificar sobre una zona horizontal fría y se llevaron a incubar las cajas boca abajo en una jarra de anaerobiosis a 36 +/- 2 °C por 22 +/- 2h.
- 11) Después de la incubación, se realizó la cuantificación del número de placas en cada caja. Si no es posible contar las cajas después de terminada la incubación, se deben poner a 4 °C hasta poder realizar la lectura.
- 12) Las placas cuantificadas se informaron como Partículas Formadoras de Placas por volumen de muestra (PFP/100 mL)
- 13) El número de PFP/100 mL de muestra se calculó así:

$$PFP/100 \text{ ml} = \frac{NX100}{(VF)}$$

N= Número total de placas contadas en la caja.

V= Volumen usado en la prueba con dilución.

F= Factor de dilución usado (F = 1 para una muestra no diluida, F = 0.1 para una dilución 1:10, F = 0.01 para una dilución 1:100).

Este mismo procedimiento se realizó para la cuantificación de fagos de *Bacteriodes fragilis* RYC 2056 (para identificar excrementos animales), GA17 y HB 13 (para identificar heces humanas y en menor concentración para identificar heces de animales) (Araujo ét al, 2001; Balanche-Muñoz ét al, 2008; Blanch ét al, 2004,2006; Bonjoch ét al, 2005; Cárdenas y Guerrero 2000; Durán ét al, 2006; Field ét al, 2007; Griffith ét al, 2003; Jofre y Lucena, 2006; Leclerc ét al, 2000; Lucena ét al, 2006, 2003; McDonald ét al, 2006; Payán ét al, 2005; Shanks, 2005 y TFSPW, 2004).

3.5. Caracterización molecular de los fagos de Bacteroides

Con la intención de confirmar si las cepas de Bacteroides evaluadas pueden discriminar realmente la fuente de contaminación, se realizó una prueba de PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa, obteniendo un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas (enzimas) para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre si tras cada fase de replicación; a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas. Así se conocerán las cadenas de ADN propias del microorganismo, según bases de datos conocidas, y se verificará la presencia de estas bacterias a estudiar en las muestras analizadas (Jhonson 2008).

La extracción del ADN de las muestras recolectadas a lo largo de la cuenca, se llevó a cabo en la Universidad Javeriana. El ADN de las muestras de agua se obtuvieron según la metodología descrita por Payan *et. al* (2005) la cual se fundamenta en la obtención del ácido nucleico a partir del remanente de filtración retenido en un filtro de policarbonato, utilizando perlas de vidrio, Buffer CTAB y una mezcla de Fenol/Cloroformo/isoamilíco.

Para la amplificación de ADN por la técnica de PCR, inicialmente se tomaron las mismas condiciones reportadas por Bernhard y Field (2000), en donde se proponen temperaturas de alineamiento de 62 °C para el primer específico de animales CF128F y 63 °C para el primer específico de humanos HF183F. Sin embargo para este ensayo no se obtuvieron amplificadores de ninguna índole, por lo que se iniciaron una serie de ensayos a diversas temperaturas, siendo uno de éstos 3 °C por encima de las propuestas por la casa comercial y 3°C por debajo, describiendo como temperaturas óptimas de alineamiento para CF128F, 51,2 °C y para HF183F 63 °C. Al hacer este ensayo se obtuvo como resultado que en el protocolo en donde los ensayos realizados a más bajas temperaturas (59 °C a 62 °C) las temperaturas estaban por encima (52 a 55°C) se observaron varias bandas inespecíficas y no repetitivas dentro de las diferentes muestras, en tanto que los ensayos a 53°C ya empezaron a mostrar una banda única y repetitiva.

Finalmente se llegó a dejar una temperatura de 53°C para CF128F/Bac708R y 54°C para HF183F/Bac708R, siendo el protocolo que mejor funciona a la fecha: 94°C 5 min, 30 ciclos (94°C 1min, 53-54°C 1 min, 72°C 1,5 min), 72°C 7 min, 4°C, obteniendo una banda aproximada de 590-600pb la cual se supone corresponde al amplificado esperado.

Tomando como positivo el amplificado anterior, se realizaron pruebas preliminares para cada una de las muestras de agua recolectadas a lo largo de la cuenca del río Bogotá.

3.6. Análisis estadístico

Para el presente estudio se evaluaron un total de 9 estaciones de muestreo, las cuales fueron distribuidas como se describe a continuación:

- Para cada parte de la cuenca (alta, media y baja) se tuvo en cuenta la actividad que se presentaba, ya sea de origen industrial, doméstico, mixto o animal.
- Se seleccionaron tres puntos de muestreo en cada cuenca representativos de vertidos de origen doméstico, mezcla de doméstico y animal (mixto) y uno sólo animal.

Para cada uno de estos puntos de muestreo se evaluó la concentración de diferentes microorganismos indicadores de contaminación fecal, entre estos coliformes fecales, *Clostridium perfringes*, fagos somáticos y *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 y HB13.

Para ver que indicador mostraba mayor concentración en la cuenca, se realizó un análisis de varianza como un diseño en bloque, bajo la teoría de los modelos lineales mixtos (Di Rienso *et al.* 2009). Los bloques en el modelo representan las partes de la cuenca (alta, media y baja), estos bloques fueron declarados como efecto aleatorios, con el fin de descontar la variación de la concentración producto de las partes de la cuenca. Además, se declaró como efecto aleatorio el tipo de actividad para descontar la variación producto de esta. Como las concentraciones (variable respuesta) de bacterias (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringes* y fagos somáticos) y fagos de bacteroides (*Bacteroides* RYC 2056, *Bacteroides* GA 17 y *Bacteroides* HB 13) fueron expresadas en UFC/100 ml y UFP/100 ml, respectivamente; se transformaron a logaritmo base 10.

Dado, que las varianzas entre los indicadores no eran homogéneas, se modelo a través de una función de varianzas heterogéneas.

El modelo matemático para el análisis será:

$$Y_{ij} = \mu + I_i + A_j + IA_{ij} + B + E_{ij}$$

donde:

Y_{ij} : Variable respuesta (número de microorganismos por cada parte de la cuenca según su actividad)

μ : Media general

I_i : Efecto del i -ésimo indicador

A_j : Efecto de la j -ésima actividad declarado como efecto aleatorio en el modelo

B : Bloque definido como cada parte de la cuenca (alta, media y baja), declarado como efecto aleatorio en el modelo

E_{ij} : Término de error independiente, supuestamente distribuido normal $(0, \mu^2)$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Objetivo 1: Comparar el uso de indicadores tradicionales (coliformes fecales, *Clostridium perfringens* y fagos somáticos) y nuevos indicadores como fagos de las cepas RYC 2056, GA17 y HB13 de Bacteroides para diferenciar el origen de la contaminación de origen fecal.

4.1.1. Cuenca alta.

En el cuadro 5 se presentan los resultados correspondientes a las concentraciones de los diferentes microorganismos en las tres estaciones de muestreo de la cuenca alta del río Bogotá.

Cuadro 5. Promedios y unidades logarítmicas de las concentraciones microbianas encontradas en las estaciones de muestreo de la cuenca alta del río Bogotá

MICROORGANISMOS	ESTACIONES DE MUESTREO					
	Matadero Villapinzón		Puente Centro Villapinzón		Salida Villapinzón	
	Promedio*	Unidad Logarítmica (UL)	Promedio*	Unidad Logarítmica (UL)	Promedio*	Unidad Logarítmica (UL)
Coliformes Fecales (UFC/100 mL)	5,27 x 10 ⁶	6,72	1,46 x 10 ⁵	5,17	2,53 x 10 ⁵	5,40
<i>Clostridium perfringens</i> (UFC/100 mL)	4,43 x 10 ³	3,65	2,63 x 10 ³	3,42	7,03 x 10 ³	3,85
Fagos somáticos (UFP/100 mL)	3,20 x 10 ⁶	6,51	1,32 x 10 ⁴	4,12	7,07 x 10 ³	3,85
Fagos que infectan Bacteroides RYC 2056 (UFP/100 mL)	3,87 x 10 ³	3,59	1,00 x 10 ²	2	1,33 x 10 ²	2,12
Fagos que infectan Bacteroides GA 17 (UFP/100 mL)	8,34 x 10 ⁴	4,92	1,00 x 10 ²	2	2,33 x 10 ²	2,37
Fagos que infectan Bacteroides HB 13 (UFP/100 mL)	1,77 x 10 ⁵	5,25	1,00 x 10 ²	2	3,00 x 10 ²	2,48

*Promedio de tres muestreos realizados en los meses de agosto y septiembre en la cuenca alta del río Bogotá

Para el análisis de la concentración microbiana en esta parte de la cuenca, se realizaron varios muestreos en diferentes fechas del año, iniciando desde el mes de abril y finalizando en el mes de septiembre. A todos los resultados obtenidos se les realizó un ANOVA, para evaluar

la probabilidad estadística de encontrar cada uno de los Bacteroides (*Bacteroides* RYC 2056, *Bacteroides* GA 17 y *Bacteroides* HB13) (Anexo 1) y bacterias (coliformes fecales, *Clostridium perfringens* y fagos somáticos) (Anexo 2) en cada parte de la cuenca, teniendo en cuenta el tipo de contaminación que presenta cada estación de muestreo.

4.1.1.1. Estación de muestreo Matadero Villapinzón

La estación de muestreo donde se encuentra enfocada la contaminación de tipo animal es la del Matadero, en donde se puede encontrar altas concentraciones de coliformes fecales y fagos somáticos, que indican la presencia elevada de contaminación fecal en esta muestra de agua.

En el caso de *Clostridium perfringens* se observa, para todos los muestreos, una concentración que está en el orden de 10^3 UFC/100 mL, con lo que se puede confirmar el estudio realizado por Cimenti et al. (2005), donde encontraron concentraciones de *Clostridium perfringens* entre 10^4 y 10^5 UFC/100 mL, en todas las muestras de agua analizadas, entre estas muestras con estiércol de cerdo y tanques estercoleros.

Para los fagos que infectan *Bacteroides* RYC 2056, conocidos por estar presentes en su mayoría en muestras de origen animal (Lucena et al. 1996; Atherholt et al. 2003), se observa que se encuentra en una concentración de $3,87 \times 10^3$ PFP/100 mL. Ésta concentración es la comúnmente encontrada en estudios realizados anteriormente por Blanch et al. (2006).

Los fagos que infectan *Bacteroides* GA 17 son comúnmente encontrados en muestras de origen humano en su mayoría y en menor concentración contaminación de origen animal (Payán et al. 2005), por tanto para este punto no es posible asociarla con algún tipo de filtración de desecho humano, ya que la zona muestreada es la de sedimentación, luego de haber pasado por las rejillas de separación de sólidos grandes. Además, esta planta de tratamiento sólo depura las aguas provenientes del proceso de sacrificio del ganado, la tubería proveniente de baños u otros sitios donde se pueda generar desecho humano se trata por la tubería que va directamente a la planta de tratamiento del municipio de Villapinzón.

La cepa *Bacteroides* HB 13 es comúnmente encontrada en muestras de origen humano, pero en concentraciones muy bajas, siendo 50 veces más bajas que las comúnmente

encontradas de la cepa *Bacteroides* RYC 2056 en muestras de agua residual municipal en el Reino Unido (Payán et al. 2005). Sin embargo para este caso, esta bacteria se encuentra en concentraciones más altas de las reportadas ($1,77 \times 10^5$ UFP/100 mL), lo cual lleva a pensar que efectivamente debe existir algún tipo de fuente contaminante de origen humano para este punto. También se puede dar este resultado, por la especificidad que se ha evidenciado de algunas cepas de *Bacteroides* a un área geográfica definida (Lucena et al. 2003), y puede ser que la cepa de *Bacteroides* HB13, sea específica de la zona en donde se aisló, y al ser así el método de detección y cuantificación de ésta en la cuenca alta del río Bogotá puede ser menos específico y sensible para estas características biofísicas propias de esta zona. Por esta razón es importante plantear la búsqueda y aislamiento de nuevas cepas de *Bacteroides* que ayuden a diferenciar el origen de la contaminación.

De igual manera, se ha sugerido dentro del método de Seguimiento de la Discriminación de la Fuente de Contaminación (MST, por sus siglas en inglés) hacer la confirmación mediante biología molecular, y para este estudio se realizará con PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ya que al ser un método más sensible y específico para determinar la presencia de este tipo de bacterias, se puede corroborar el resultado obtenido con la técnica en placa para la detección y cuantificación de fagos, y así se pueden plantear mejores estrategias y acciones para la toma de decisiones e implementación de medidas a nivel gubernamental y socioeconómico para disminuir la contaminación en una cuenca hidrográfica, en este caso específico, la cuenca del río Bogotá.

4.1.1.2. Estación de muestreo puente centro Villapinzón

En el punto denominado como puente centro Villapinzón se observa una mezcla de agua proveniente del matadero y del municipio.

La concentración de coliformes fecales para este sitio sigue siendo alta, comparado con el Matadero de Villapinzón, pues solamente disminuyó una unidad logarítmica (de 6,72 UL a 5,17 UL), lo cual significa que al ser este punto denominado como fuente de contaminación doméstica, se esperaría encontrar mayor tipo de contaminación de origen humano. Sin embargo, a esta estación de muestreo también llega agua proveniente del matadero, luego de

haber pasado por el sistema de tratamiento. Al observar concentraciones tan altas de coliformes fecales para este punto se confirma una vez más que la planta de tratamiento de aguas del Matadero no cuenta con un sistema eficiente para eliminar microorganismos, ya que ésta solo elimina materia orgánica y sólidos provenientes del proceso de sacrificio animal.

De igual manera se evidenció en las concentraciones de fagos somáticos, microorganismos que se encuentran frecuentemente en muestras ambientales de agua con contaminación de origen fecal y que son indicadores de virus, por lo que se puede llegar a pensar que esta muestra contiene una carga elevada de contaminantes de origen fecal, bien sea virus o bacterias.

Clostridium perfringens se encontró en el mismo rango de concentración que en el punto del Matadero ($2,63 \times 10^3$ UFC/100 mL), lo cual es consecuente con lo reportado por Toranzos y McFeters (1997) y Bisson y Cabelli (1979), en donde se plantea la supervivencia y persistencia de este microorganismo, tanto en muestras de suelo como de agua; al ser esporulado es más resistente en cualquier ambiente, incluso por meses y hasta años, por lo tanto, con este microorganismo se puede identificar contaminación de origen fecal a lo largo del tiempo y la distancia.

Por el contrario, los fagos que infectan *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 y HB 13, propios de muestras de origen animal y humano, respectivamente, no se presentan en altas concentraciones para esta estación de muestreo evaluada (en el orden de 10^2 UFP/100 mL), lo cual puede llevar a pensar que comparado con estudios realizados en Europa, por el equipo de investigadores de Lucena et al (1995, 2003, 2005) para puntos seleccionados con este mismo tipo de contaminación, este microorganismo no es tan efectivo discriminando la fuente de contaminación de origen fecal dentro de las condiciones socioeconómicas y biofísicas propias de la cuenca alta del río Bogotá en Colombia.

Para este caso es importante realizar el análisis molecular con “primers” específicos para discriminar si hay contaminación de origen animal o humana, y así compararlos con los resultados del recuento en placa y poder discernir la ausencia o presencia de este tipo de contaminantes para esta muestra de agua.

4.1.1.3. Estación de muestreo salida Villapinzón

Para la salida Villapinzón, donde se encuentra una mezcla de agua doméstica e industrial, debido a las pequeñas empresas de curtiembres que circundan esta zona muestreada; se puede observar una disminución severa respecto a las concentraciones de coliformes fecales y fagos somáticos, siendo este último el que presenta mayor disminución a lo largo de la cuenca alta, realizando el análisis desde el punto más alto de la parte alta de la cuenca (Matadero Villapinzón) hasta el más bajo (Salida Villapinzón), como se observa en la figura 21.

Esto pudo deberse a una posible dilución de la muestra analizada para este punto, luego de pasar por las estaciones de muestreo seleccionadas en una parte de la cuenca alta del río Bogotá, también favorecido por las bajas concentraciones de contaminantes para este punto.

Por otro lado, las concentraciones de *Clostridium perfringens* se mantienen constantes, comparado con los otros dos puntos de muestreo analizados en la cuenca alta del río Bogotá, por ser este microorganismo muy tolerante y resistente a diferentes condiciones a lo largo del tiempo y la distancia, como se ha mencionado anteriormente.

A continuación se puede observar la gráfica de la dinámica de la concentración microbiana a lo largo de la cuenca alta del río Bogotá en la figura 11.

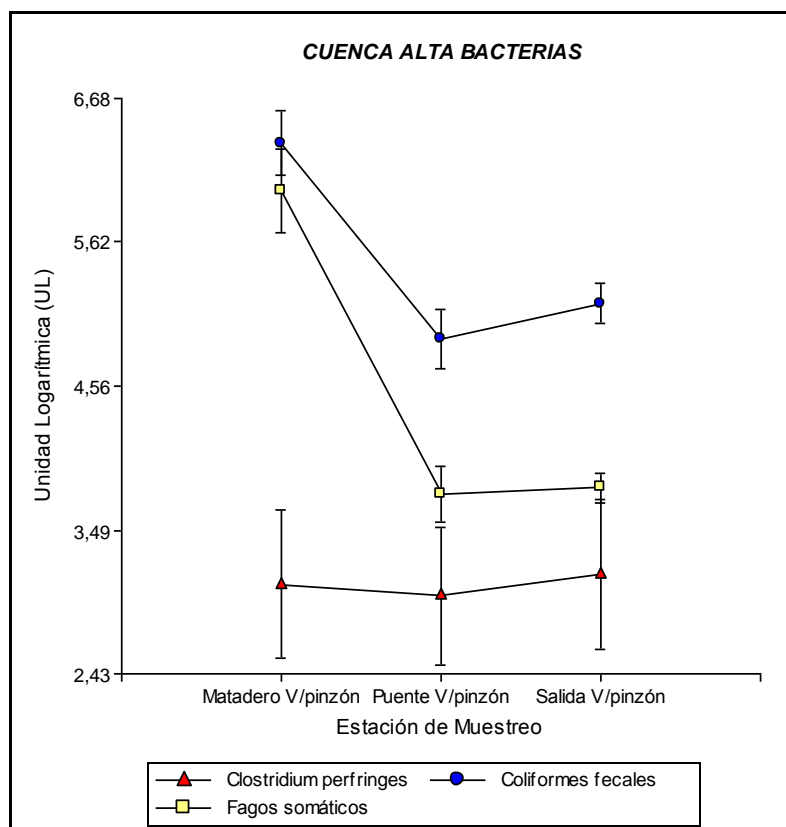


Figura 11. Comparación entre concentraciones de bacterias en la cuenca alta del río Bogotá
*Las barras verticales representan el error estándar

Debido a que se encuentran diversos tipos de animales de corral cercanos a este punto, al igual que ganado bovino, se observa una concentración baja de fagos que infectan *Bacteroides* RYC 2056 ($1,33 \times 10^2$ UFP/100 mL), que aunque sea baja es representativa. Estos animales pertenecen a familias que tienen ubicada su lugar de vivienda a orillas de este río, por lo tanto también se genera contaminación de origen humano, como se evidenció al evaluar el resultado de fagos que infectan *Bacteroides* GA 17, que presentó una concentración de $2,33 \times 10^2$ PFP/100 mL.

Se observa la presencia de *Bacteroides* HB 13, propio de muestras de origen humano, sin embargo se encuentra en muy bajas concentraciones ($3,00 \times 10^2$), aunque coincide con lo esperado, ya que en este punto se deben encontrar, tanto indicadores de contaminación de origen fecal humano (*Bacteroides* GA17 y HB 13) como animal (*Bacteroides* RYC 2056).

En la figura 12 se puede observar claramente que no varía mucho la concentración de los diferentes bacteroides en las estaciones de muestreo de la cuenca alta del río Bogotá,

evidenciado por la cercanía entre las barras que representan el error estándar, lo que sugiere que no se presentan diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$), en las concentraciones de los bacteroides para cada una de las actividades o estaciones de muestreo evaluadas (Ver anexo 1), mientras que para el caso de las bacterias si se presentó diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre las concentraciones halladas para cada uno de los indicadores tradicionales (Ver anexo 2).

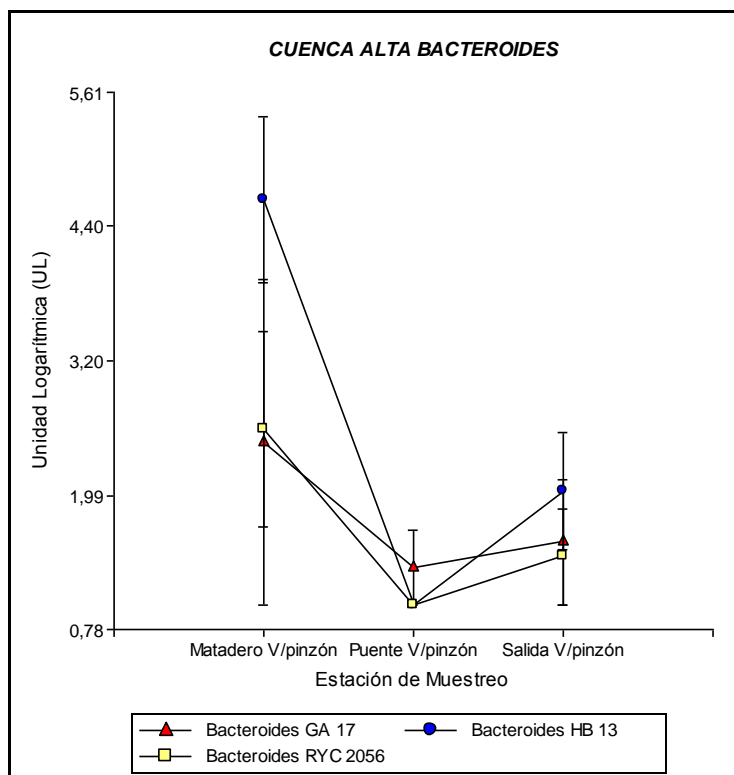


Figura 12. Comparación entre concentraciones de Bacteroides en la cuenca alta del río Bogotá
*Las barras verticales representan el error estándar

4.1.2. Cuenca media

En el cuadro 6 se presentan los resultados correspondientes a las concentraciones de diferentes microorganismos en las tres estaciones de muestreo en la cuenca media del río Bogotá.

Cuadro 6. Promedios y unidades logarítmicas de las concentraciones microbianas encontradas en las estaciones de muestreo de la cuenca media del río Bogotá.

MICROORGANISMOS	ESTACIONES DE MUESTREO					
	Pozo Estercolero Nemocón		Río Bogotá Salida de PTAR		Afluente PTAR Salitre	
	Promedio*	Unidad Logarítmica (UL)	Promedio*	Unidad Logarítmica (UL)	Promedio*	Unidad Logarítmica (UL)
Coliformes Fecales (UFC/100 mL)	3,53 x 10 ⁴	4,55	9,63 x 10 ⁶	6,98	2,00 x 10 ⁷	7,30
<i>Clostridium perfringes</i> (UFC/100 mL)	1,90 x 10 ⁴	4,28	6,33 x 10 ⁵	5,80	9,33 x 10 ⁴	4,97
Fagos somáticos (UFP/100 mL)	3,33 x 10 ²	2,52	5,73 x 10 ⁵	5,76	7,83 x 10 ⁵	5,89
Fagos que infectan Bacteroides RYC 2056 (UFP/100 mL)	1,00 x 10 ²	2	1,43 x 10 ⁴	4,15	2,70 x 10 ⁴	4,43
Fagos que infectan Bacteroides GA 17 (UFP/100 mL)	1,00 x 10 ²	2	7,67 x 10 ³	3,88	1,89 x 10 ⁴	4,28
Fagos que infectan Bacteroides HB 13 (UFP/100 mL)	1,00 x 10 ²	2	9,10 x 10 ³	3,96	8,60 x 10 ³	3,93

*Promedio de tres muestreos realizados en los meses de agosto y septiembre en la cuenca alta del río Bogotá

4.1.2.1. Estación de muestreo pozo estercolero Nemocón

Para el pozo estercolero ubicado en la finca de ganado vacuno San José, en el Municipio de Nemocón, se ve una disminución en cuanto a la concentración de coliformes fecales de dos Unidades Logarítmicas (de 6,72 UL a 4,55 UL) comparado con la estación de muestreo en donde se encontraba contaminación de origen animal en la cuenca alta del río Bogotá (Matadero Villapinzón), lo que se pudo presentar por la evidente presencia de heces de origen vacuno encontrada en esta estación de muestreo, en donde se dan altas concentraciones de bacterias indicadoras de contaminación fecal.

Por el contrario, la ausencia de oxígeno beneficio el crecimiento y reproducción de *Clostridium perfringes*, ya que se presentó un aumento en la concentración de una Unidad Logarítmica comparado con la muestra de origen animal tomada en la cuenca alta (de 3,65 UL a 4,28 UL), ya que esta bacteria es anaerobia estricta derivada de desecho fecal de animales y

humanos. Sus células vegetativas no sobreviven en ambientes aerobios, pero estas bacterias forma endoesporas lo que hace que sobreviva por muchos meses y hasta años en suelos, agua y sedimentos (Atherholt et al. 2003). Además esto es lo esperado al ser un punto en donde sólo llega contaminación de origen fecal animal, ya que es en éste pozo donde se reciben los desechos fecales de aproximadamente 15 vacas, al hacer un lavado de la zona en donde estas suelen pastar.

La concentración de fagos somáticos para este punto disminuyó notablemente ($3,33 \times 10^2$ UFC/100 mL), lo cual podría deberse por efectos de la temperatura, ya que según Sinton et al. (1999), estos se desarrollan mejor a temperaturas de 35 °C a 37 °C, y en esta zona la temperatura varía fuertemente, presentando durante la madrugada temperaturas por debajo de los 0 °C.

No se presentaron concentraciones altas de fagos somáticos para el pozo estercolero de la finca de Nemocón, y tampoco se presentaron concentraciones altas de *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 Y HB 13 ($1,00 \times 10^2$ UFC/100 mL en cada una de ellos), por lo que se puede afirmar lo planteado en el estudio hecho por Costán et al. (2008) en efluentes secundarios del Noreste de España, donde asegura que la concentración de Bacteroides está relacionada directamente con la de fagos somáticos, entonces a menor concentración de fagos somáticos menor concentración de Bacteroides. De esta manera, se puede observar una vez más que las cepas de Bacteroides evaluadas en este estudio no son específicas para este tipo de contaminación, bien sea por sus características ambientales o biofísicas, ya que se presentaron concentraciones iguales en cada una de ellas, y para este punto era de esperarse encontrar mayor concentración de Bacteroides RYC 2056, propia de contaminación de origen animal (Araujo et al, 2001; Blanch et al, 2004,2006; Cárdenas y Guerrero 2000; Durán et al, 2006; Griffith et al, 2003; Jofre y Lucena, 2006; Lucena et al, 2006, 2003; y TFSPW, 2004).

4.1.2.2. Estación de muestreo río Bogotá PTAR

El otro punto que se tuvo en cuenta para el muestreo en la cuenca media del río Bogotá fue el punto de salida de agua de la PTAR Salitre, que se descarga directamente en el río Bogotá. Este punto es denominado dentro del estudio como fuente de contaminación de origen

mixto, por encontrarse tanto contaminación de origen doméstico como contaminación de origen animal, debido principalmente a los animales encontrados en las orillas de este punto del río.

Se observa para el caso de coliformes fecales, una concentración elevada ($9,63 \times 10^6$ UFC/100 mL), donde se ve sólo un aumento de un orden de magnitud, comparado con las muestras tomadas en el río Bogotá en la parte alta de la cuenca, lo cual se da porque el agua tratada que sale de la PTAR se une con la del río Bogotá y genera que aumente de nuevo la contaminación de origen fecal.

De igual manera sucede en el caso de *Clostridium perfringes* y fagos somáticos, presentando concentraciones de $6,33 \times 10^5$ UFC/100 mL y $5,73 \times 10^5$ UFC/100 mL, respectivamente, siendo concentraciones muy elevadas para este punto, aumentando un orden de magnitud comparado con las muestras de agua tomadas en la parte alta de la cuenca del río Bogotá, en donde comparado con la muestra tomada en el efluente de la PTAR Salitre, no presenta alguna reducción significativa en su concentración, por el contrario aumenta, que para el caso de *Clostridium perfringes*, se ve favorecido su crecimiento por el exceso de contaminantes y materia orgánica e inorgánica presente en esta estación de muestreo, lo cual hace que disminuya la concentración de oxígeno e incrementa su replicación (Handford 1974).

Para este punto era de esperarse que las concentraciones de *Bacteroides* GA17 y *Bacteroides* HB13 fueran altas, pues según lo publicado en diversos estudios (Blanch et al. 2004, 2006), para muestras ambientales que presentan este tipo de contaminación, estas dos cepas de *Bacteroides* presentan una concentración de $7,67 \times 10^3$ PFP/100 mL y $9,10 \times 10^3$ PFP/100 mL, respectivamente.

Es posible encontrar, de igual manera, una concentración similar de *Bacteroides* RYC 2056, ya que se encuentran animales en su mayoría de tipo vacuno circundando el punto muestreado, y ya es sabido que éstos microorganismos son comunes en muestras donde predomina contaminación de origen animal (Lucena et al. 2003), teniendo en cuenta de igual manera la posible contaminación animal que viene aguas arriba siendo esta una estación de muestreo con una fuente de contaminación no puntual.

4.1.2.3. Estación de muestreo planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) El Salitre

Para el punto de muestreo analizado en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales PTAR Salitre, ubicada en la zona noroccidente de la ciudad de Bogotá, se observa en general una concentración alta de coliformes fecales de $2,00 \times 10^7$ UFC/100 mL, lo cual es lo esperado, pues esta planta trata las aguas residuales de la cuenca del río Salitre y los humedales Torca y La Conejera, conteniendo los desechos humanos de aproximadamente 2,2 millones de habitantes, correspondientes al 28% del total de la población de la ciudad de Bogotá. También se debe tener en cuenta que el punto muestreado recibe agua contaminada de origen doméstico que solamente ha pasado la fase de remoción de material sólido grande, y entra a la etapa de sedimentación de otro tipo de sólidos y aún no se ha realizado ningún tipo de tratamiento químico o biológico, por lo cual se espera una concentración elevada de microorganismos indicadores de contaminación fecal.

Para el caso de *Clostridium perfringes*, su concentración disminuye al ser un microorganismo estrictamente anaerobio, a pesar de tener un alto grado de persistencia y supervivencia en diversos tipos de muestras ambientales (Hill et al. 1993). Se presenta 3 unidades logarítmicas por debajo de los coliformes.

No sucede de igual manera para los fagos somáticos, pues sus concentraciones son más cercanas a las encontradas en los coliformes fecales, lo cual es lo esperado, al ser *E.coli* la célula huésped, deben existir concentraciones similares del fago (fagos somáticos) y de la bacteria a fagocitar (*Escherichia coli*) (Gantzer 1998). Además para este tipo de fuente de contaminación doméstica, es de esperarse encontrar altas concentraciones de microorganismos indicadores de contaminación fecal, en este caso indicadores de virus, como lo son los fagos somáticos.

Se puede concluir entonces que en la cuenca media del río Bogotá no se encuentra disminución en la concentración bacteriana entre los dos puntos que tienen continuidad, es decir, entre la PTAR y el río Bogotá saliendo de la PTAR, como se muestra en la figura 13:

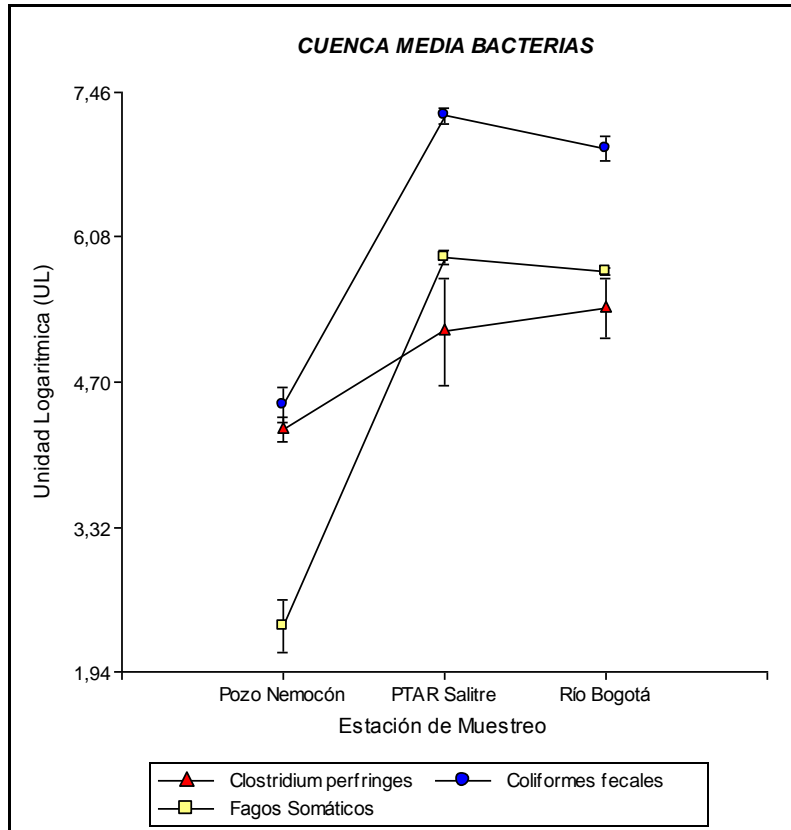


Figura 13. Comparación entre concentraciones de bacterias en la cuenca media del río Bogotá.
*Las barras verticales representan el error estándar

En el análisis de las diferentes cepas de Bacteroides evaluadas para este estudio, *Bacteroides* RYC 2056, *Bacteroides* GA17 y *Bacteroides* HB13, al observar los resultados obtenidos en todos los muestreos para este punto, se evidencia una concentración cercana entre cada una de ellas (4,43 UL para RYC 2056, 4,28 UL para GA 17 y 3,93 UL para HB 13), y de igual manera al realizar el ANOVA (Anexo 1) no se observó ninguna diferencia significativa ($P > 0,05$) para este punto evaluando las concentraciones de cada uno de los bacteroides propuestos, lo cual es lo esperado, pues a pesar de ser este punto mayormente contaminado con desechos de origen humano, es posible encontrar también desechos de tipo animal en las alcantarillas y sistemas de acueducto que después van a verter sus aguas a esta planta de tratamiento.

Como en los casos anteriores, se realizó un análisis de tipo molecular en donde se verificó la presencia y/o ausencia de contaminantes de origen animal y humano, con la ayuda

de “primers” específicos que diferencian estas dos fuentes de contaminación para cada uno de los puntos evaluados.

Se puede concluir entonces, analizando las barras verticales que representan el error estándar en la figura 14, que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis y cuantificación de Bacteroides para la cuenca media del río Bogotá, al estar todas estas unidas entre si, no hay variación en los resultados, es decir que para el caso de la cuenca media no se pueden identificar diferencias entre cada estación muestreada, respecto a si contiene contaminación de origen fecal humana o animal, haciendo notar que hasta el momento no se ha presentado una evidencia notoria que diga que si se puede plantear una diferencia al usar dichos microorganismos como indicadores de la discriminación de la contaminación de origen fecal en muestras de aguas con diferentes características biofísicas y socioeconómicas.

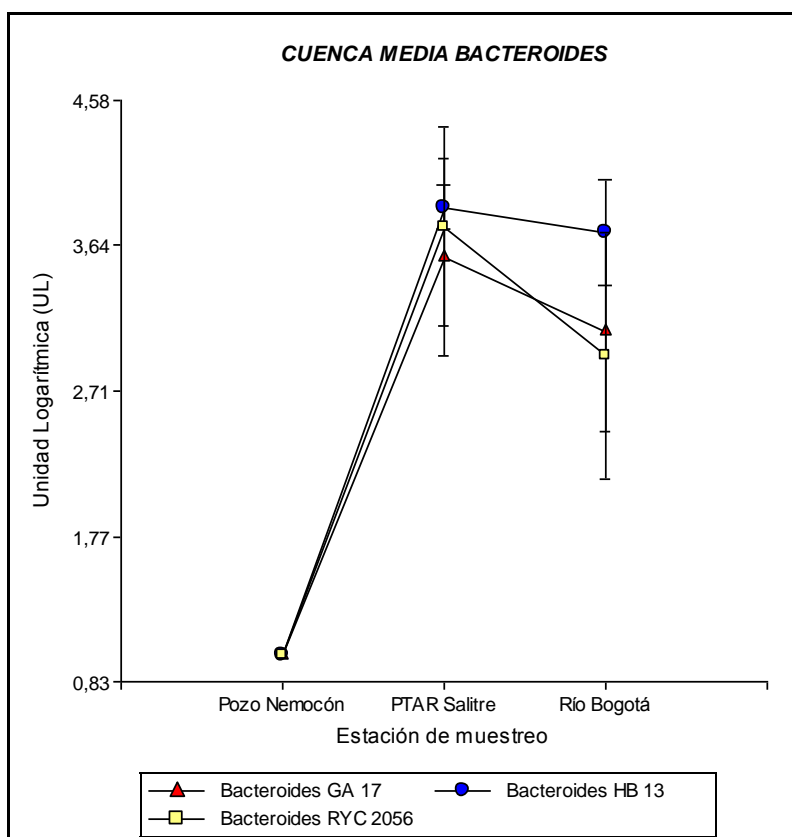


Figura 14. Comparación entre concentraciones de Bacteroides en la cuenca media del río Bogotá
*Las barras verticales representan el error estándar

4.1.3. Cuenca baja

En el cuadro 7 se presentan los resultados correspondientes a las concentraciones de los diferentes microorganismos en las tres estaciones de muestreo en la cuenca baja del río Bogotá.

Cuadro 7. Promedios y unidades logarítmicas de las concentraciones microbianas encontradas en las estaciones de muestreo de la cuenca baja del río Bogotá

MICROORGANISMOS	SITIOS O ESTACIONES DE MUESTREO					
	Represa del Muña		Aguas abajo Represa del Muña		Matadero La Mesa	
	Promedio*	Unidad Logarítmica (UL)	Promedio*	Unidad Logarítmica (UL)	Promedio*	Unidad Logarítmica (UL)
Coliformes Fecales (UFC/100 mL)	$3,07 \times 10^7$	7,49	$9,70 \times 10^6$	6,99	$2,03 \times 10^7$	7,31
<i>Clostridium perfringes</i> (UFC/100 mL)	$9,47 \times 10^4$	4,98	$2,43 \times 10^4$	4,39	$5,37 \times 10^5$	5,73
Fagos somáticos (UFP/100 mL)	$2,60 \times 10^5$	5,41	$3,63 \times 10^5$	5,56	$2,56 \times 10^8$	8,41
Fagos que infectan Bacteroides RYC 2056 (UFP/100 mL)	$1,01 \times 10^4$	4,00	$7,77 \times 10^3$	3,89	$1,64 \times 10^7$	7,21
Fagos que infectan Bacteroides GA 17 (UFP/100 mL)	$4,00 \times 10^3$	3,60	$4,60 \times 10^3$	3,66	$9,77 \times 10^5$	5,99
Fagos que infectan Bacteroides HB 13 (UFP/100 mL)	$3,30 \times 10^3$	3,52	$4,43 \times 10^3$	3,65	$6,20 \times 10^5$	5,79

*Promedio de tres muestreos realizados en los meses de agosto y septiembre en la cuenca baja del río Bogotá

Para la cuenca baja del río Bogotá, se puede observar una concentración similar de bacterias indicadoras de contaminación fecal a la encontrada en las otras estaciones de muestreo evaluadas sobre toda la cuenca del río Bogotá.

4.1.3.1. Estación de muestreo matadero La Mesa

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos para el punto denominado Matadero de la Mesa, se puede observar que la concentración de coliformes fecales es de $2,03 \times 10^7$ UFC/100 ml, pues al ser una muestra de origen animal, presenta gran cantidad de heces, y estas contienen altas concentraciones de coliformes fecales.

La concentración de fagos somáticos se encuentra en una elevada concentración ($2,56 \times 10^8$ UFP/100 mL). Esto se debe a la cantidad tan elevada de materia fecal encontrada en este punto, por lo cual se presenta de igual manera elevada la concentración de bacterias indicadoras de contaminación fecal, específicamente indicadores de enterovirus patógenos como los fagos.

Clostridium perfringes se encuentra en una concentración de $5,37 \times 10^5$ UFC/100 mL, lo cual es de esperarse ya que este microorganismo es propio del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, como el ganado bovino y es persistente en cualquier tipo de ambiente (Cimenti et al. 2005).

En la evaluación de los fagos que infectan *Bacteroides* RYC 2056, se puede observar una alta concentración de estos para esta muestra ($1,64 \times 10^7$ PFP/100 mL), lo que concuerda con el estudio realizado por Leclerc et al. (2000), donde se obtuvo que en muestras de agua de matadero, RYC 2056 alcanzó concentraciones hasta de 10^8 PFP/100 mL.

Sin embargo, sí se presenta una discrepancia en los resultados obtenidos de *Bacteroides* GA 17 y HB 13, ya que es de esperarse que estos no se encuentren en este tipo de muestras, aunque para este caso, se presentan en concentraciones cercanas a las de *Bacteroides* RYC 2056, lo cual puede llevar a deducir que dichos microorganismos no son específicos para la discriminación de la fuente de contaminación de origen fecal, pues tampoco se presentan diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre las concentraciones encontradas de estos Bacteroides, según el ANOVA (Anexo 1).

También se realizó un análisis molecular para verificar si los resultados obtenidos respecto a las cepas evaluadas son específicos para esta zona muestreada con características biofísicas y socioeconómicas propias, o en cambio no se pueden usar como evaluadores de discriminación de la contaminación fecal en esta zona en particular. Es importante anotar que para determinar la discriminación de la fuente de contaminación de origen fecal se deben realizar mínimo tres análisis, bien sea de tipo molecular, fenotípico o de resistencia a antibióticos, entre otros; y así determinar eficazmente si la muestra analizada es de origen fecal animal o humano (Field y Mansour 2007).

4.1.3.2. Estación de muestreo Represa del Muña

En la represa del Muña se espera encontrar como fuente de contaminación la de origen mixto, ya que a este punto llegan aguas contaminadas tanto de origen humano, como de animal y también de origen industrial.

Se presenta una alta concentración de coliformes fecales ($3,07 \times 10^7$ UFC/100 mL), seguida por una concentración dos órdenes de magnitud menor de fagos somáticos ($2,60 \times 10^5$ UFC/100 mL) y con una orden menos, le sigue *Clostridium perfringes* ($9,47 \times 10^4$ UFC/100 mL). Estas altas concentraciones de microorganismos son las que se esperan para este tipo de muestra, ya que son bacterias propias del tracto digestivo, tanto de humanos como de animales.

De igual manera, se presenta una concentración muy parecida para los diferentes tipos de Bacteroides (entre 10^3 y 10^4 UFP/100 mL), lo cual se hace evidente también al hacer el análisis estadístico (Anexo 1), donde no se demostró ninguna diferencia estadísticamente significativa ($P > 0,05$) para la represa del Muña en cuanto a los Bacteroides evaluados (RYC 2056, GA 17 y HB13), como se muestra en la figura 15:

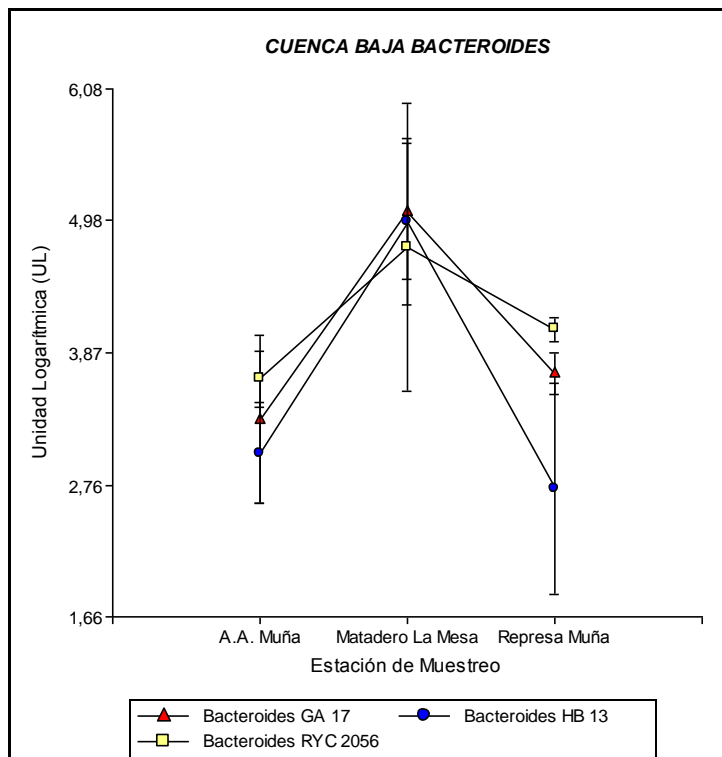


Figura 15. Comparación entre concentraciones de Bacteroides en la cuenca baja del río Bogotá
*Las barras verticales representan el error estándar

Al analizar la figura 15, se observa claramente para cada estación de muestreo de la cuenca baja del río Bogotá no existe diferencia entre las concentraciones de *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 y HB 13, porque se observan concentraciones muy cercanas entre cada una de éstas además del entrecruzamiento de las barras verticales (error estándar) muestra que no hay variación entre muestras, es decir, que como se había planteado anteriormente no existe diferencia alguna entre concentraciones de *Bacteroides*, por lo tanto, para esta estación de muestreo, no es posible usarlos como discriminadores de la fuente de contaminación.

4.1.3.3. Estación de muestreo aguas abajo de la represa del Muña.

Para esta estación de muestreo en el río Bogotá, específicamente en la parte baja de la cuenca, se puede observar que no se presenta una disminución significativa en las concentraciones de los microorganismos indicadores de contaminación fecal, como lo son los coliformes fecales, fagos somáticos y *Clostridium perfringes*. Este resultado es de esperarse, ya que en la represa del Muña no se realiza ningún mecanismo de descontaminación, ya que esta es usada para almacenar el agua que luego alimenta a cuatro hidroeléctricas aguas abajo, por lo tanto, el agua llega contaminada a este punto desde la parte alta y media de la cuenca, presentando niveles similares de bacterias indicadoras de contaminación fecal en todo el recorrido de la cuenca del río Bogotá. Sin embargo, a pesar de presentarse las mismas concentraciones de bacterias en todas las estaciones de muestreo a lo largo de la cuenca del río Bogotá, si se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre indicadores bacterianos de contaminación fecal, como se presentan en la figura 16:

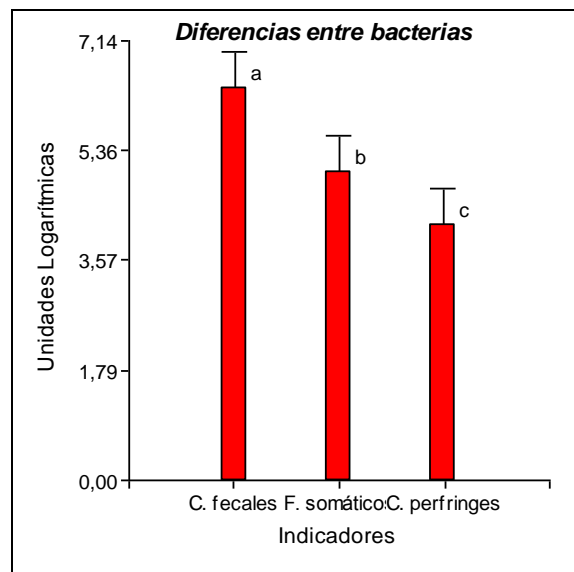


Figura 16. Diferencia estadística entre bacterias en la cuenca del río Bogotá
 *Las letras diferentes representan diferencias estadísticas

Al realizar la detección y cuantificación de los fagos que infectan los Bacteroides RYC 2056, GA 17 y HB 13, se observa una concentración propia para este tipo de contaminación (entre 3,50 UL y 4,00 UL) según los estudios realizados por Anicet et al. (2004, 2006); Lucena et al. (1996, 2003) y Atherholt et al. (2003), y evidentemente al ser esta muestra analizada de origen doméstico, se puede encontrar indicadores de contaminación tanto de origen animal como de origen humano en las concentraciones descritas en diferentes estudios.

En general se puede decir que para el caso de las bacterias se presenta una constante diferencia ($P < 0,05$) en cuanto a sus concentraciones para cada uno de las estaciones evaluadas, lo cual concuerda con lo analizado en estudios anteriores, pues al ser estos microorganismos evaluados y usados a nivel universal como indicadores de contaminación fecal, se sabe que su presencia en muestras ambientales, específicamente de agua, es resultado de la presencia de contaminantes de este mismo origen.

Las cepas de Bacteroides evaluadas, solo presentan diferencias en cuanto a las concentraciones encontradas en los puntos donde se presentaba contaminación de origen animal ($P < 0,05$), como se observa en la figura 17, lo que lleva a concluir que son más específicas para evaluar y determinar la presencia de este tipo de contaminantes, sin embargo no se puede lograr establecer definitivamente cual de las tres cepas evaluadas fue la que discriminó la fuente de contaminación para este estudio en la cuenca del río Bogotá, teniendo

en cuenta que es posible encontrar resultados favorables al momento de aislar y evaluar Bacteroides propios de la zona de estudio, manteniéndolos con las mismas características ambientales que requieren para su óptimo crecimiento.

Por lo tanto, fue importante realizar para el caso específico de este estudio otros tipos de análisis que ayudaron a la confirmación de los resultados obtenidos, como el método molecular denominado PCR, presentando los resultados en el capítulo siguiente.

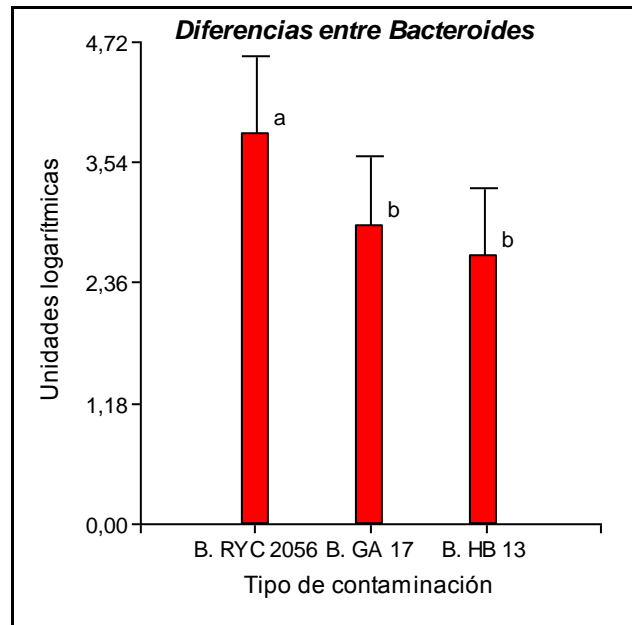


Figura 17. Diferencia estadística entre bacteroides en la cuenca del río Bogotá.
*Las letras diferentes representan diferencias estadísticas

4.2. Objetivo 2: Realizar extracción y amplificación de DNA para comprobar a nivel molecular la presencia y/o ausencia del origen de la contaminación en la cuenca del río Bogotá.

4.2.1. Identificación con “primers” específicos del género bacteriano Bacteroidetes para discriminar contaminantes de origen humano y animal.

Para realizar la identificación del género bacteriano Bacteroidetes, para cada uno de los puntos muestreados, se realizó una PCR cualitativa, usando como primers o cebadores CF 128F para identificación de contaminación de origen animal y HF 183F para identificación de

contaminación de origen humano. Los resultados se presentan en el siguiente cuadro, relacionándolos con los resultados de los análisis de laboratorio de recuento bacteriano:

Cuadro 8. Resultados de PCR cualitativa de cada una de las estaciones de muestreo de la cuenca del río

Análisis	CUENCA ALTA			CUENCA MEDIA			CUENCA BAJA		
	Matadero V/pinzón	Puente centro V/pinzón	Salida V/pinzón	Pozo estercolero	PTAR Salitre	Río Bogotá	Matadero La Mesa	Aguas abajo R. del Muña	R. Del Muña
Fagos de B. RYC 2056	+	-	-	-	+	+	+	+	+
PCR Primers CF128F (Animal)	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Fagos de B. GA 17y HB13	+	-	-	-	+	+	+	+	+
PCR Primers HF183F (Humano)	-	-	-	-	-	-	+	-	-

+: Resultado positivo

-: Resultado negativo

Se puede observar que para cada una de las estaciones de muestreo donde la contaminación es exclusiva de origen animal (matadero La Mesa y matadero Villapinzón) se da un resultado positivo para la prueba molecular, identificando la contaminación como de origen animal. Sin embargo, se presenta un resultado negativo, tanto para contaminación animal o humana para la estación pozo estercolero en Nemocón, lo cual coincide con los resultados de la cuantificación de Bacteroides, ya que se presentó una ausencia total de los mismos en este sitio.

Para los puntos de muestreo donde la contaminación es de origen doméstico (PTAR Salitre y aguas abajo de la represa del Muña) era de esperarse encontrar sólo resultados positivos para contaminación de origen humano (HF 183F), sin embargo se presentaron resultados respecto al análisis molecular que se presentan positivos para humano y animal, lo cual es similar con los resultados encontrados del análisis realizado in vitro. Cabe aclarar que

es posible encontrar en la estación de muestreo aguas debajo de la represa del Muña contaminación tanto de origen humano como de animal, pero al ser este un punto específico dentro de la cuenca baja del río Bogotá, fue denominado para este estudio como de origen doméstico.

En el caso de la estación de muestreo puente Villapinzón, los resultados sí concordaron con los obtenidos en el recuento in vitro, pues en ninguna de las dos pruebas se encontraron *Bacteroides* indicadores de contaminación fecal humana, ni animal.

Para el sitio de muestreo PTAR Salitre, se observaron concentraciones similares de *Bacteroides* RYC 2056, HB 13 y GA 17, propias de contaminación de origen animal y humano (entre 10^3 y 10^4 UFP/100 mL), y al realizar la PCR cualitativa se pueden observar resultados positivos para la identificación tanto de contaminación animal como humana.

Caso contrario sucede al hacer el análisis del sitio de muestreo aguas abajo de la represa del Muña, en donde se obtuvieron sólo respuestas positivas en la PCR cualitativa respecto a la contaminación de origen animal (CF 128F) y negativas para humanas (HF 183F), lo cual no coincide con lo obtenido in vitro, pues en este análisis se encontraron concentraciones altas tanto de *Bacteroides* RYC 2056, como de GA 17. Esta diferencia en los resultados se puede deber principalmente a que se ha determinado que el primer HF 183F presenta un bajo porcentaje de sensibilidad y correcta identificación (50% en ambas) (Ballesté et al. 2010), por lo que se pudieron presentar resultados falsos negativos; y también a posibles problemas en el momento de extraer el DNA debido a la contaminación alta del río y varios inhibidores que podrían encontrarse por los residuos de origen animal.

Finalmente en los puntos de muestreo denominados de origen mixto (salida Villapinzón, río Bogotá y represa del Muña), que llevan contaminantes tanto de origen domestico como animal y en algunos casos industriales, se observan en general resultados que coinciden con los analizados en el laboratorio.

En la estación de muestreo salida Villapinzón se observaron concentraciones bajas de *Bacteroides* (10^2 UFP/100 mL), lo cual es consecuente con lo obtenido en el PCR cualitativo, ya que se presentan resultados negativos en los dos tipos de “primers”.

También se presenta una concordancia en los resultados de la estación de muestreo represa del Muña, ya que se presentan concentraciones significativas para todas las cepas de *Bacteroides* (RYC 2056, GA 17 y HB 13) que están en el rango entre 10^3 y 10^4 UFP/ 100mL,

lo cual es similar al resultado obtenido para la PCR cualitativa, que dio positivo tanto para el “primer” que identifica contaminación de origen fecal humana, como el que identifica la contaminación de origen animal.

Sin embargo, para el punto de muestreo denominado río Bogotá se presenta una diferencia importante en cuanto a los resultados obtenidos, ya que se presentan altas concentraciones de cepas de *Bacteroides* RYC 2056, HB 13 y GA 17, y se presentan también resultados negativos para el contaminante de origen humano y positivo para el contaminante de origen animal en la PCR cualitativa, con lo que se puede llegar a pensar también en un resultado falso positivo para el primer HF 183F, ya que como se comentó en párrafos anteriores, este tiene un porcentaje de sensibilidad e identificación correcta bajas.

En conclusión, los resultados muestran que el contaminante fecal bovino tiene un comportamiento similar al de los recuentos bacterianos, pero el contaminante fecal humano no presenta igual comportamiento, con lo que se debería analizar si no es un buen marcador, o si debido al alto grado de contaminación del agua hay sustancias interferentes con el proceso de amplificación de ADN. También con estos resultados se puede llegar a pensar que debido a la diferente situación geográfica en donde se hizo este estudio, no se presentan resultados similares a los encontrados en estudios realizados en Europa, con lo que se recomienda hacer análisis con cepas de *Bacteroides* aisladas del sitio donde se desee hacer el análisis de discriminación de la fuente microbiana de contaminación fecal, ya que así se daría una mejor recuperación de estos, al presentar unos requerimientos nutricionales y ambientales propios de la zona a estudiar.

4.3. Objetivo 3: Proponer estrategias y acciones para la toma de decisiones y la implementación de medidas sobre la contaminación fecal del agua en la cuenca del río Bogotá.

4.3.1. Estrategias y acciones para la toma de decisiones e implementación de medidas para disminuir la contaminación en la cuenca del río Bogotá

Los resultados microbiológicos para este estudio reflejan concentraciones preocupantes con relación a la calidad del agua del río y el riesgo sanitario que ello implica para la

población. Esto se refleja en un porcentaje importante de enfermedades de origen hídrico como la enfermedad diarreica aguda y el poliparasitismo, por tanto es de vital importancia enumerar y poner en marcha una serie de estrategias y acciones para disminuir la contaminación en la cuenca del río Bogotá.

Por ello a continuación se detallan algunas medidas que pueden ser de utilidad para el manejo integrado de la cuenca del río Bogotá:

- Implementación y puesta en marcha de una manera real del Plan de Ordenamiento Territorial de la cuenca del río Bogotá, donde los entes y organismos de control den seguimiento y cumplimiento a lo dispuesto en este documento ejecutado por la CAR en el año 2006.
- Construcción y generación de sistemas de tratamiento de aguas en donde se de un mejor aprovechamiento y re uso de las aguas negras generadas por procesos productivos, domésticos o una combinación de ambos, para hacer más eficiente el uso del agua para que sea óptima y disponible para el consumo humano.
- Mayor control y cobro de multas por incumplimiento de las leyes en lo referente a deforestación, eliminación de la cobertura vegetal en los márgenes de los cursos de agua y vertido de basura y productos químicos directamente a los cursos de agua. En este contexto, podría analizarse la incorporación de pagos por los daños ambientales causados por los procesos productivos; nótese, sin embargo, que estos representan pagos por unidad de contaminación, la cual muchas veces resulta difícil de medir y controlar.
- Asignación de un valor al recurso agua como insumo dentro del proceso productivo. Por ejemplo, los productores de soya utilizan grandes cantidades de agua para la fumigación con productos químicos, sin un costo adicional. También existen industrias en la cuenca que vierten los desechos de su proceso productivo en los cauces. Es necesario que los productores dejen de ver el ambiente como un insumo gratuito; solo así se logrará un uso y manejo más racional de los recursos.

- Incentivos o estímulos para la conservación del agua. Esto incluye mecanismos como el pago por servicios ambientales y otros incentivos y procedimientos para estimular a aquellos productores que realizan acciones que favorezcan al bienestar público y promuevan un mejor manejo de los recursos naturales.
- Incorporación de prácticas de conservación y recuperación del suelo. Por ejemplo, la implementación de sistemas silvopastoriles en las fincas ganaderas, ya que la ganadería es uno de los usos de la tierra más importantes en la cuenca y se practica con bajo nivel tecnológico.
- Promoción de campañas de concientización para la protección del agua. Por ejemplo, crear conciencia sobre el daño que causa la basura al ambiente, colocar carteles prohibitivos en sitios estratégicos y mencionar el número de Ley que prohíbe esta práctica.
- Programas de educación ambiental y generación de conocimientos sobre el recurso agua y el funcionamiento del acuífero. Una comunidad conocedora de la riqueza natural que posee, que conoce como funciona y el peligro que corre un recurso natural, lo valora y lo protege. El conocimiento se constituye así en un instrumento para priorizar las necesidades hídricas más urgentes y asegurar un futuro al recurso hídrico.
- Capacitación y asistencia técnica para la adopción de prácticas de producción limpia, tales como agricultura orgánica, actividades agrícolas, pecuarias, forestales, industriales y agroindustriales no contaminantes, uso de tecnologías de descontaminación, manejo de desechos líquidos y sólidos y recuperación de suelos degradados (uso abonos verdes).
- Organización de los productores y las comunidades para mejor enfrentar las diferentes situaciones que se presenten en la cuenca; promoción de acciones grupales (campañas de reforestación, educación ambiental, protección de nacientes de agua, etc.); comercialización y adquisición de productos en forma grupal, ya que rinde mayores beneficios que de manera individual; gestión ambiental y social.

- Para impulsar alternativas de protección y mantenimiento de la calidad del agua y el manejo sostenible de la cuenca es necesario contar con un organismo representativo de la cuenca del río Bogotá. Este organismo debiera conformarse con representantes de cada uno de los municipios asentados en la cuenca.
- El elemento más importante para definir la cuenca como unidad de planificación y de gestión es que la misma constituye un sistema donde el elemento integrador es el agua. La cuenca constituye un sistema conformado por las interrelaciones de diferentes subsistemas, tales como lo social, económico, político, institucional, cultural, legal, tecnológico, productivo, físico y biológico. Por lo tanto, este enfoque haría posible una gestión integral que garantice la producción en forma armónica con la conservación del ambiente.

Actualmente se viene llevando a cabo según el documento CONPES (2004) que habla sobre la estrategia para el manejo ambiental del río Bogotá, un plan de acción en tres etapas:

Primera etapa (2004 – 2008): se fundamenta en el desarrollo de planes de saneamiento básico de los municipios y en una intervención en el Embalse del Muña, que siendo factible, a corto plazo, genere un mejoramiento de las condiciones de vida de la población del Municipio de Sibaté. En esta etapa se trabajará para complementar la infraestructura de saneamiento básico, se establecerán estándares de calidad para los planes a mediano y largo plazo sobre la Cuenca, se diseñarán mecanismos financieros y se trabajará en la conformación de esquemas regionales, con el liderazgo de la Gobernación de Cundinamarca, la Corporación Autónoma Regional, el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y el Distrito.

Segunda etapa (2009 – 2013): se orienta a la continuación de las inversiones y al planteamiento de alternativas técnicas que optimicen y complementen las obras iniciadas en la primera etapa, de acuerdo con los objetivos de calidad, y teniendo en cuenta los resultados que se obtengan de los acercamientos iniciales, con especial atención al mejoramiento adicional sobre el Embalse del Muña y la población de Sibaté, y a los resultados sobre la Cuenca Baja,

priorizando, en su orden, el acceso de la población a agua potable, redes de alcantarillado y tratamiento de aguas residuales.

Tercera etapa (2014–2020): es una etapa de consolidación, seguimiento y evaluación para futuras intervenciones que permitan acceder a nuevos usos del Río Bogotá.

5. CONCLUSIONES

- Los fagos que infectan *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 y HB 13, propios de muestras de origen animal y humano, respectivamente, no se presentan en altas concentraciones según los análisis realizados para este estudio, lo cual puede llevar a pensar que comparado con estudios realizados en Europa, por el equipo de investigadores de Lucena et al (1995, 2003, 2005) para puntos seleccionados con este mismo tipo de contaminación, este microorganismo no es tan efectivo discriminando la fuente de contaminación de origen fecal dentro de las condiciones socioeconómicas y biofísicas propias de la cuenca del río Bogotá en Colombia.
- Las cepas de *Bacteroides* evaluadas, RYC 2056, GA 17 y HB 13, solo presentan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las concentraciones encontradas en los puntos donde se presentaba contaminación de origen animal ($P < 0,05$), lo que lleva a concluir que son más específicas para evaluar y determinar la presencia de este tipo de contaminantes, sin embargo no se logró establecer claramente cuál de las tres cepas evaluadas fue la que discrimino la fuente de contaminación.
- No se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) al realizar el análisis y cuantificación de *Bacteroides* para la cuenca del río Bogotá, es decir que no se pueden identificar diferencias entre cada estación muestreada, respecto a si contiene contaminación de origen fecal humana o animal.
- Respecto a los resultados encontrados en el análisis molecular (PCR) se observa que el contaminante fecal bovino tiene un comportamiento similar al de los recuentos bacterianos de fagos de *Bacteroides*, pero el contaminante fecal humano no presenta igual comportamiento, con lo que se debería analizar si no es un buen marcador, o si debido al alto grado de contaminación del agua hay sustancias interferentes con el proceso de amplificación de ADN, por lo que se deben realizar más estudios relacionados a la identificación de cepas de *Bacteroides* por medio de

técnicas moleculares, como es el caso de *Bifidobacterium dentium* (propio de animales) y *Bifidobacterium adolescentis* (propio de humanos), en donde se trabaja con “primers” que cuentan con una sensibilidad, especificidad y correcta identificación mayor que la de los Bacteroides. “Primer” ADO, que identifica residuos humanos (sensibilidad 96%, especificidad 74% y correcta identificación 80%); “primer” DEN que identifica residuos animales (sensibilidad 64%, especificidad 92% y correcta identificación 77%) (Ballesté et al. 2010).

- Es importante tener en cuenta que para realizar un estudio de Microbial Source Tracking o Discriminación de la Fuente Microbiana de Contaminación, se deben tener en cuenta tanto métodos dependientes o no de cultivos y dependientes o independientes de bases de datos, esto con el fin de confirmar los resultados obtenidos y poder realizar un análisis integral del manejo que se le debe dar al cuerpo de agua analizado.
- Con estos resultados obtenidos se puede llegar a pensar que debido a la diferente situación geográfica en donde se hizo este estudio, no se presentan resultados similares a los encontrados en estudios realizados en Europa, con lo que se recomienda hacer análisis con cepas de Bacteroides aisladas del sitio donde se desee hacer el análisis de discriminación de la fuente microbiana de contaminación fecal, ya que así se daría una mejor recuperación de estos, al presentar unos requerimientos nutricionales y ambientales propios de la zona a estudiar.
- El uso de indicadores tradicionales de contaminación fecal como coliformes fecales, *Clostridium perfringens* y fagos somáticos, siguen siendo de gran utilidad para la evaluación de diferentes muestras de aguas, sin embargo, como se evidenció en este estudio no se lograron establecer diferencias en cuanto a su concentración en cada una de las estaciones de muestreo con diferente origen de contaminación, por lo que su uso sigue siendo sólo como indicadores y no discriminadores de contaminación fecal.

- Los resultados de los niveles de contaminación encontrados en la cuenca del río Bogotá plantean serios cuestionamientos con relación a la eficiencia en la gestión, control y seguimiento de las plantas de tratamiento de aguas residuales construidas en los municipios del área de influencia, teniendo en cuenta también que no todos los municipios cuentan con una planta de tratamiento de aguas residuales, se ve más afectado el manejo de agua en general que se le da actualmente a la cuenca del río Bogotá.
- Debido a que se presentaron elevadas concentraciones de fagos somáticos, coliformes fecales y *Clostridium perfringes* a lo largo de toda la cuenca del río Bogotá, se puede concluir que es necesario iniciar de forma inmediata una mejora en la gestión de la cuenca del río Bogotá, pues se sabe con claridad que presenta los mismos niveles de contaminación desde su inicio hasta su final, y así se pueden llegar a conocer las fuentes principales de contaminación y manejarlas de la mejor manera, usando planes de acción interdisciplinarios.
- *Clostridium perfringes* puede llegar a ser considerado uno de los mejores microorganismos indicadores de contaminación fecal, pues perdura viable a lo largo del tiempo y la distancia y su método de análisis en laboratorio es fácil y económico.
- El elemento más importante para definir la cuenca como unidad de planificación y de gestión es que la misma constituye un sistema donde el elemento integrador es el agua. La cuenca constituye un sistema conformado por las interrelaciones de diferentes subsistemas, tales como lo social, económico, político, institucional, cultural, legal, tecnológico, productivo, físico y biológico. Por lo tanto, este enfoque haría posible una gestión integral que garantice la producción en forma armónica con la conservación del ambiente.

6. RECOMENDACIONES

- Se debe crear un programa de gestión, manejo y control de los sistemas de tratamiento de agua, a lo largo de toda la cuenca del río Bogotá. Esto con el fin de disminuir el efecto que el agua residual proveniente de los municipios, ya sea de origen doméstico, industrial, animal o mixto, puedan causar en el río.
- Es importante realizar un control de los vertidos que llegan a la cuenca del río Bogotá. Con esta se podrá saber cuáles son los parámetros microbiológicos necesarios para evaluar el tipo de contaminación que se genera. Este control se puede realizar con las cepas de *Bacteroides* evaluadas en este estudio, y así definir si es un contaminante de origen animal o humano.
- Es importante verificar con técnicas moleculares los resultados obtenidos en el laboratorio, lo ideal sería hacer un análisis con *Bifidobacterium dentium* (propio de animales) y *Bifidobacterium adolescentis* (propio de humanos), pues esta técnica está validada y un poco más estudiada que la de los bacteroides, pues se sabe que trabaja con “primers” que cuentan con una sensibilidad, especificidad y correcta identificación mayor que la de los *Bacteroides*.
- Los entes a cargo de la cuenca del río Bogotá y actores claves deben dar seguimiento al cumplimiento de la normatividad existente y los planes impuestos en el Plan de Ordenamiento Territorial realizado por la Corporación Autónoma Regional, y así poder dar un manejo y gestión real de esta cuenca logrando un uso del agua eficiente para todos los usuarios.

7. LITERATURA CITADA

- Anónimo. 2001. ISO 10705-4: Water quality- Detection and enumeration of bacteriophages. Part 4: Enumeration infecting *Bacteroides fragilis*. Ginebra, EH: International Standardization Organization. 68 p.
- Anónimo. 2001. ISO 6461-2: Water quality- Detection and enumeration of *Clostridium perfringens*. Ginebra, EH. International Standardization Organization. 54 p.
- APHA (American Public Health Association). 1995. Métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales. Edición 19. 1714 p.
- Araujo, R; Muniesa, M; Méndez, X; Puig, A; Queralt, N; Lucena, F; and Jofre, J, 2001. Optimisation and standardisation of a method for detecting and enumerating bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. Journal of Virology. Methods 93:127–136.
- Asano, T; Levine, D. 1998. “Wastewater reclamation, recycling and reuse: an introduction. In wastewater reclamation and reuse”. Takashi Asano (editor). Technomic Publishing. Lancaster. 1528 p.
- Atherholt T., Feerst E., Hovendon B., Kwak J., Rosen J. 2003. Evaluation of indicators of fecal contamination in groundwater. Water Works Association Journal. 95, 10 : 119 – 131.
- Belanche-Muñoz, L; Blanch A, 2008. Machine learning methods for microbial source tracking. Environmental modelling and software. 23: 741 – 750.
- Basterrecha, M; Molina, M; Molina, S; Beltrán, E. 1987. Causas de la contaminación de siete tributarios de la subcuenca del Lago Amatitlán. In Simposium estudios recientes

sobre la contaminación del Lago Amatitlán. Guatemala, GT, IGA-CATIE. p. 123-148.

Ballesté E., Bonjoch J., Belanche L., Blanch A. 2010. Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6: 1789 – 1795.

Benites, A. 2007. Manejo participativo de los recursos naturales basado en la identificación de servicios ecosistémicos en la cuenca del río Otún-Pereira, Colombia. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, CR. 116 p.

Bisson, J.W; Cabelli, V.J. 1979. Membrane Filter Enumeration Method for *Clostridium perfringens*. *Applied and environmental microbiology*. 37:55.

Blanch, A; Belanche-Munoz, L; Bonjoch, X; Ebdon, J; Gantzer, G; Lucena, F; Ottoson, J; Kourtis, G; Iversen, A; Kuhn, I; Moce, L; Muniesa, M; Schwartzbrod, J; Skraber, S; Papageorgiou, G; Taylor, H; Wallis, J; Jofre, J. 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. *Journal of Water and Health*. 24: 249 – 259.

Blanch, A; Belanche-Munoz, L; Bonjoch, X; Ebdon, J; Gantzer, G; Lucena, F; Ottoson, J; Kourtis, G; Iversen, A; Kuhn, I; Moce, L; Muniesa, M; Schwartzbrod, J; Skraber, S; Papageorgiou, G; Taylor, H; Wallis, J; Jofre, J. 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Applied and environmental microbiology*, 72 (9): 5915 – 5926.

Bonjoch, X; Balleste, E; Blanch, A. 2005. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. *Water Research*. 39 (8): 1621 – 1627.

- Campos C. 2008. Indicadores de contaminación fecal en aguas. Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, CO. 11 p.
- CAR (Corporación Autónoma Regional). 2006. Plan de ordenación y manejo de la cuenca hidrográfica del Río Bogotá. Bogotá, CO, CAR. 104 p.
- CAR (Corporación Autónoma Regional). 2006. Elaboración del diagnóstico, prospectiva y formulación de la cuenca hidrográfica del río Bogotá. Diagnóstico subcuenca río Alto Bogotá – 2120-19. INFORME FINAL.
- CAR (Corporación Autónoma Regional). 2006. Elaboración del diagnóstico, prospectiva y formulación de la cuenca hidrográfica del río Bogotá. Diagnóstico subcuenca río Bogotá Sector Tibitoc Soacha – 2120-10. INFORME FINAL.
- CAR (Corporación Autónoma Regional). 2006. Elaboración del diagnóstico, prospectiva y formulación de la cuenca hidrográfica del río Bogotá. Diagnóstico subcuenca río bajo Apulo – Girardot 2120-01. INFORME FINAL.
- Cárdenas M., Guerrero A. 2000. Determinación y cuantificación de bacteriófagos como indicadores de contaminación viral en el río Bogotá. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá, CO. 144 P.
- Cimenti, M; Biswas, N; Bewtra, J; Hubberstey, A. 2005. Evaluation of microbial indicators for the determination of bacterial groundwater contamination sources. Water, air and soil pollution. 168:157 – 169.
- CONPES (Consejo Nacional de Política Económica y Social). 2004. Estrategia para el manejo ambiental del río Bogotá. Bogotá, CO, CONPES. 45 p.

- Córdoba A. 2002. Calidad del agua y su relación con los usos actuales en la subcuenca del río Jucuapa, Matagalpa, Nicaragua. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 143 p.
- Costán-Longares A; Montemayor, M; Payán, A; Méndez, J; Jofre, J; Mujeriego, R; Lucena, F. 2008. Microbial indicators and pathogens: Removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Research* 42: 4439 – 4448.
- Díaz V. 2006. Metodología de la investigación científica y bioestadística, para médicos, odontólogos y estudiantes de ciencias de la salud. 1 ed. Santiago, CL, Ril editores. 150 p.
- Di Rienso J, Macchiavelli R, Casanoves F. 2009. Modelos mixtos en Infostat. Pagina web. Consultado el 15 de Agosto 2010. Disponible en: <http://academic.uprm.edu/rmacchia/agro6998/TutorialMMesp.pdf>
- Dourojeanni A. y Jouravlev A. 2002. Gestión de recursos a nivel de cuencas. México, MX, CEPAL. 16 p.
- Dufour, A. P. 1984. EPA health effects criteria for fresh recreational waters. North Carolina, USA. Office of Research and Development, United States Environmental Protection Agency. 187 p.
- Duran, M; Haznedaroglu, B; Zitomer, D. 2006. Microbial source tracking using host specific FAME profiles of fecal coliforms. *Water Research*. 40 (1): 67 – 74.
- Ebdon, J; Taylor, H. 2006. Geographic stability of enterococcal antibiotic resistance profiles in Europe and its implications for the identification of fecal sources. *Environmental Science Technology* 40: 5327-5332.

- EPA (Environmental Protection Agency). 2000. Improved enumeration methods for the recreational water quality indicators: Enterococci and *Escherichia coli*. Office of Science and Technology, Washington, US. EPA/821/R-97/004. 55 p.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2005. Microbial Source Tracking Guide Document. Cincinnati, US, EPA 133 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1993. Prevención de la contaminación del agua por la agricultura y actividades afines. Informes sobre temas hídricos 1. Santiago, CL, FAO 385 p.
- Franceschi, L. 2002. Evaluación etnobotánica y socioeconómica de la zona de amortiguamiento del Parque Internacional La Amistad; enfoques que promuevan la conservación de la cuenca alta del río Boquete, Caldera, Panamá. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 142 p.
- Faustino J. 2008. Notas de clase, Curso de postgrado, Manejo de Cuencas II. Turrialba, CR. CATIE. 65 p.
- Field, K; Mansour, S. 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water research* 41: 3517 – 3538.
- Gallego, R. 2000. El agua, vehículo de contaminación (en línea). Consultado 06 de Octubre de 2008. Disponible en: <http://www.babad.com/no01/agua.html>.
- Gantzer, C; Maul, A; Audic, J; Schwartzbrod, L. 1998. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages treated wastewater. *Applied and environmental microbiology*. 64, 4307 – 4312.

- García, A; Campos, J.J; Villalobos, R; Jiménez, F; Solórzano, R. 2005. Enfoque de manejo de recursos naturales a escala de paisaje: Convergencia hacia un enfoque ecosistémico. Turrialba, CR. CATIE. 55 p. (Serie técnica, Informe técnico N° 340).
- Griffith, J.F; Weisbourg, S; McGee, G. 2003. Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. *Journal Water Health* 1: 141 – 152.
- Handford P. 1974. A new medium for detection and enumeration of *Clostridium perfringens* in food. *Journal Applied Bacteriology*. 37, 559 – 570.
- Hill, R; Knight, I; Anikis, M; Colwell R. 1993. Benthic distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-ocean dump site. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 47 – 51.
- Hyer, K. y Mayer, D. 2004. Enhancing Fecal Coliform Total Maximum Daily Load Models Through Bacterial Source Tracking. *Journal of the American Water Resources Association* 40(6):1511-1526.
- IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia). 2004. Guía técnico científica para la ordenación y manejo de cuencas hidrográficas en Colombia. Bogotá, CO, Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. 134 p.
- ISO (International Organization for Standarization) 6461 Parte 2. 1986. Water Quality - detection and enumeration of *Clostridium perfringens*.
- Jiménez, F. 2005. Gestión Integral de Cuencas Hidrográficas: Enfoques y estrategias actuales. Recursos Ciencia y Decisión N° 2.

- Jiménez F. 2008. Guía para elaborar planes de gestión de cuencas hidrográficas. Curso de maestría manejo y gestión integral de cuencas hidrográficas I. Turrialba, CR. CATIE. 108 p.
- Jofre, J; Lucena, F. 2006. Los bacteriófagos, un instrumento útil en la gestión de la calidad microbiológica del agua regenerada. *Tecnología del agua*. 27 (2): 56-68.
- Leclerc, H; Edberg, S; Pierzo, V; Delattre, J. 2000. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 5 – 21.
- Lucena, F; Araujo, R; Jofre, J. 1996. Usfulness of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* as index microorganisms of remote faecal pollution. *Water Research*. 30 (11): 2812 – 2816.
- Lucena, F; Méndez, X; Morón, A; Calderón, E; Campos, C; Guerrero, A; Cárdenas, M; Gantzer, C; Shwartzbrood, L; Skraber, S; Jofre, J. 2003. Ocurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 808-815.
- Llorente, C; Sanz, J; Water, V. 2006. Informe Técnico: acción combinada de agentes desinfectantes en la planta de regeneración de aguas de Castell-Platja d'aro. Universidad de Barcelona. Girona, ES, Universidad de Barcelona. pp. 2-21
- Malina, J. 1996. Water quality. Mays, *Water Resources Handbook*. US, McGraw-Hill. p. 83-89.
- McDonald, J; Hartel, P; Gentit, L; Belcher, C; Gates, K; Rodgers, K; Fisher, J; Smith, K; Payne, K. 2006. Identifying Sources of Fecal Contamination Inexpensively with Targeted Sampling and Bacterial Source Tracking. *Journal of Environment Quality* 35 (3): 889 – 897.

- Mendoza, M. 1996. Impacto del uso de la tierra, en la calidad del agua de la microcuencas río Sábalo, cuenca del río San Juan, Nicaragua. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 81 p.
- Meneses J. 2003. Calidad del agua en la microcuenca los Hules-Tinajones, Cuenca del Canal, Panamá. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 94 p.
- Mitchell, M; Stapp, W; Bixby, K. 1991. Manual de campo del Proyecto del Río: una guía para monitorear la calidad del agua en el río Bravo. 2 ed. México, MX. Proyecto del Río NET. 200 p.
- Ongley, E. 1997. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. Roma, IT, Estudio FAO Riego y Drenaje. 116 p.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 1987. Guías para la calidad del agua potable. Criterios relativos a la salud y otra información de base. Washington, US. 350 p.
- Payán, A; Ebdon, J; Taylor, H; Gantzer, C; Ottoson, J; Papageorgiou, G; Blanch, A; Lucena, F; Jofre, J; Muniesa, M. 2005. Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. Applied and Environmental Microbiology 71(9): 5659-5662.
- Pontificia Universidad Javeriana. 2004. Monitoreo y diagnóstico de la calidad del agua del río Bogotá analizando aspectos biológicos y su impacto en la salud de las comunidades. Bogotá, COL. Pontificia Universidad Javeriana.
- Robledo, J. 2001. Estimación económica de las principales externalidades de uso y manejo de los recursos naturales, en la subcuenca Matanzas, del río Polochic, Guatemala y propuesta de internalización monetaria. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 181 p.

- Seoáñez, M. 1999. Ingeniería del medioambiente aplicada al medio natural continental. 2 ed. Madrid, ES. Ediciones Mundi-Prensa. 702 p.
- Sinton, L; Finlay, R; Lynch, P. 1999. Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage polluted seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (8): 3605 – 3613.
- Sinton, L; Hall, C; Lynch, P; Davies-Colley, R. 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. En: *Applied and environmental microbiology*. 68 (3): 1122-1131.
- Shanks, O. 2005. Microbial Source Tracking. Environmental Protection Agency. Cincinnati. US. 49 p.
- Tartera, C; Jofre, J. 1987. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in Sawage-Polluted Waters. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 53 (7): 1632-1637.
- TFSPW. Tracking the origin of faecal Pollution in Surface Water. 2004. A research project supported by the European Commission under the Fifth Framework Programme and contributing to the implementation of the Key Action Sustainable Management and Quality of water within the Energy, Environment and Sustainable Development. Pagina web. Consultado el 8 de Noviembre 2008. Disponible en: <http://www.ub.edu/microbiologia/TOFPSW.htm>
- USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos). 2000. National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule; Proposed Rules. USA, Fed. Reg, 65-91.
- Toranzos, G; McFeters, G. 1997. Detection of indicator microorganisms. En: *Environmental freshwaters and Drinking Waters. Manual of environmental microbiology* (C.J Hurst et al, eds.). American Society for Microbiology Press, Washington.

Villegas, J. 1995. Evaluación de la calidad del agua en la cuenca del río Reventado, Cartago, Costa Rica, bajo el enfoque de indicadores de sostenibilidad. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 146 p.

Wikipedia. 2008. Reacción en Cadena de la Polimerasa: PCR. Consultado el 15 de Noviembre 2008. Disponible en:
http://es.wikipedia.org/wiki/Amplificaci%C3%B3n_gen%C3%A9tica

Yates, M.V y Yates S.R. 1988. Modeling microbial fate in the subsurface environment. CRC, Crit, Rev. Environ. Control. 17: 307 – 344.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1

ANOVA PARA BACTEROIDES (SALIDA INFOSTAT 2010)

Modelos lineales generales y mixtos

Especificación del modelo en R

```
modelo003_LOG10_U_REML<-lme(LOG10_U~1+Tipo+Indicadores+Tipo:Indicadores
,random=list(Cuenca=pdIdent(~1))
,weight=varComb(varIdent(form=~1|Cuenca)
,varIdent(form=~1|Tipo2))
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data03
,keep.data=FALSE)
```

Resultados para el modelo: modelo003_LOG10_U_REML

Variable dependiente: LOG10_U

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
97	349,29	383,97	-160,64	0,72	0,02	0,18

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	86	17,58	0,0001
Tipo	2	86	4,03	0,0212
Indicadores	2	86	0,03	0,9744
Tipo:Indicadores	4	86	0,38	0,8258

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent
Formula: ~1|Cuenca

Desvíos estándares relativos al residual y correlaciones

	(const)
(const)	1,58

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: varIdent

Formula: ~ 1 | Cuenca

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
Alta	1,00
Baja	1,26
Media	1,73

Modelo de varianzas: varIdent

Formula: ~ 1 | Tipo2

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
D	1,00
A	2,48

Medias ajustadas y errores estándares para Tipo

LSD Fisher (alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tipo	Medias	E.E.	
A	3,82	0,77	A
M	2,91	0,69	B
D	2,62	0,67	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

8.2. ANEXO 2

ANOVA PARA BACTERIAS (SALIDA INFOSTAT 2010)

Modelos lineales generales y mixtos

Especificación del modelo en R

```
modelo030_LOG10_U_REML<-lme(LOG10_U~1+Indicadores+Tipo+Tipo:Indicadores
,random=list(Cuenca=pdIdent(~1))
,weight=varComb(varIdent(form=~1|Tipo))
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data30
,keep.data=FALSE)
```

Resultados para el modelo: modelo030_LOG10_U_REML

Variable dependiente:LOG10_U

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
120	392,37	427,59	-183,18	1,04	0,33	0,43

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	109	84,59	<0,0001
Indicadores	2	109	53,38	<0,0001
Tipo	2	109	0,19	0,8270
Indicadores:Tipo	4	109	0,83	0,5063

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent
Formula: ~1|Cuenca

Desvíos estándares relativos al residual y correlaciones

	(const)
(const)	0,92

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: varIdent
Formula: ~ 1 | Tipo

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
M	1,00
D	0,73
A	1,79

Medias ajustadas y errores estándares para Indicadores

LSD Fisher (alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Indicadores	Medias	E.E.	
Coli_F	6,38	0,59	A
Fagos_S	5,01	0,60	B
Clost_P	4,15	0,60	C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

8.3. ANEXO 3

Curvas de crecimiento de Bacteroides RYC 2056, HB 13 y GA 17, para los meses de marzo, abril, mayo y agosto de 2009.

8.3.1. Curva de crecimiento de las cepas de Bacteroides RYC 2056, GA17 y HB 13

Para la realización de este estudio fue importante tener en cuenta el aumento de la concentración de Bacteroides a lo largo del tiempo en horas, esto con el fin de definir las etapas o fases de crecimiento del microorganismo. Para tener en cuenta el crecimiento de los Bacteroides, se utilizaron dos técnicas: la primera fue “Recuento de células viables” y la segunda técnica es la denominada “Medida de la masa de células”.

8.3.1.1. Curva de crecimiento de Bacteroides RYC 2056.

Se realizaron cuatro curvas de crecimiento en el transcurso del tiempo de estudio para la cepa *Bacteroides* RYC 2056, cada una de éstas llevadas a cabo en los meses de marzo, abril, mayo y agosto de 2009.

Las dos últimas se realizaron para verificar que las cepas encontradas inicialmente en el Laboratorio coincidieran en el tiempo de inicio de su fase logarítmica de crecimiento exponencial con las traídas del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona, y así poder realizar los procedimientos según lo recomendado ISO (International Organization for Standardization) (2001), en donde se plantea que la concentración o el número de células viables ideal para trabajar en la cuantificación de los fagos de *Bacteroides* RYC 2056 es de 10^8 UFC/mL, la cual se presenta en la fase log del crecimiento exponencial.

De esta manera para la curva de crecimiento de marzo se puede observar que las seis horas (6) de haber puesto a crecer el cultivo en un medio es donde se genera esta concentración, encontrando una absorbancia de 0,865. Estos parámetros obtenidos se encuentran subrayados en el cuadro 9.

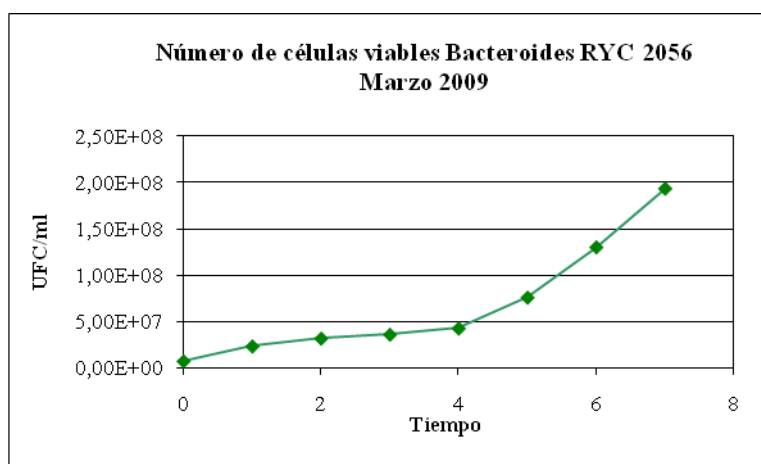


Figura 18. Curva de crecimiento de *Bacteroides RYC 2056*, marzo2009

Cuadro 9. Absorbancia y número de células viables por cada hora de crecimiento de *Bacteroides RYC 2056*

TIEMPO	ABS	VIABLES
0	0,024	7,60E+06
1	0,026	2,36E+07
2	0,028	3,20E+07
3	0,056	3,62E+07
4	0,204	4,28E+07
5	0,533	7,60E+07
6	0,865	1,30E+08
7	0,963	1,93E+08

Para la curva del mes de abril se puede notar el inicio de la fase log de crecimiento exponencial a las dos horas (2), con un incremento en el número de células viables a las cuatro horas ($1,22 \times 10^9$ UFC/mL) y de nuevo una disminución acelerada a las cinco horas ($3,40 \times 10^8$ UFC/mL).

Debido a la inconstancia y evidente variabilidad en la concentración de esta cepa de *Bacteroides* para esta curva de crecimiento, estos parámetros no se tuvieron en cuenta, pues pudo presentarse un error en la técnica de conteo, o un problema con la pureza de la cepa de *Bacteroides RYC 2056*. Por esta razón se procedió a realizar una tercera curva de crecimiento para verificar el tiempo óptimo donde inicia la fase de log de crecimiento exponencial hasta alcanzar una concentración de 1×10^8 UFC/mL.

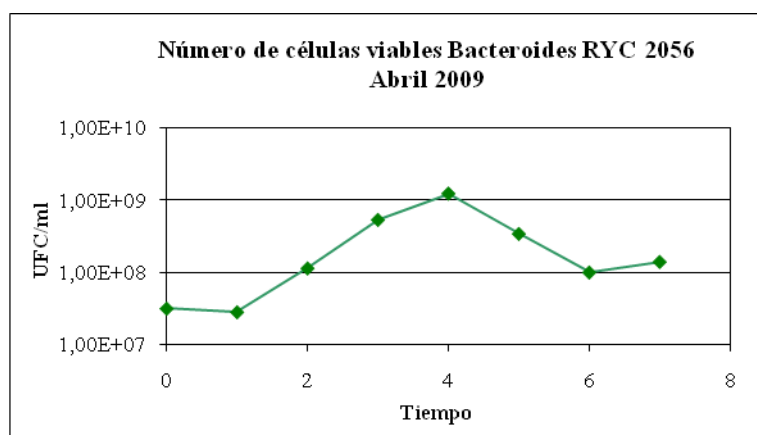


Figura 19. Curva de crecimiento de *Bacteroides* RYC 2056, abril 2009.

Cuadro 10. Absorbancia y número de células viables por cada hora de crecimiento de *Bacteroides* RYC 2056

TIEMPO	ABS	VIABLES
1	0,08	3,18E+07
2	0,536	1,14E+08
3	0,692	5,30E+08
4	0,771	1,22E+09
5	0,776	3,40E+08
6	0,804	1,00E+08
7	0,812	1,40E+08

En la tercera curva de crecimiento realizada en el mes de mayo se observó que la fase de crecimiento exponencial inició a la hora uno (figura 20), encontrando la concentración ideal para trabajar con *Bacteroides* RYC 2056 a las cuatro horas ($1,70 \times 10^8$ PFP/100 mL). Se presentó una curva normal donde se pudo notar fácilmente la fase lag o de adaptación entre las horas 0 y 1, y un creciente aumento de la concentración del microorganismo hasta la hora siete, la cual fue la última hora en la que se realizaron las mediciones para la curva.

Sin embargo se realizó una última prueba con una cepa traída directamente desde la Universidad de Barcelona, con la idea de definir finalmente la hora en donde inicia la fase exponencial de esta bacteria y es preciso iniciar el procedimiento de detección y cuantificación de fagos de *Bacteroides* RYC 2056.

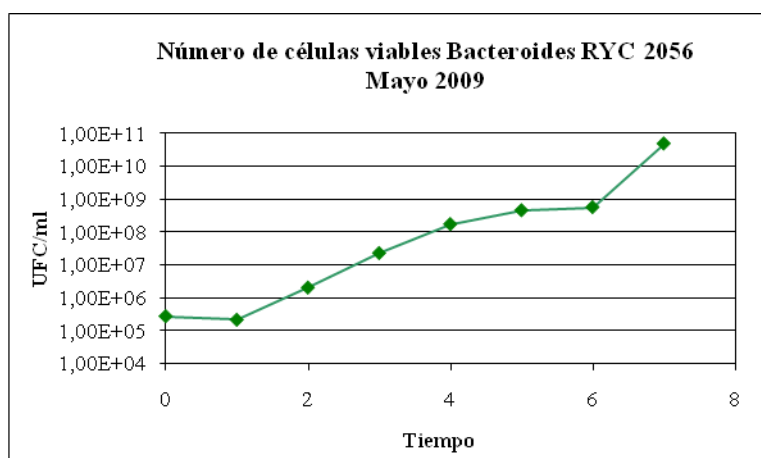


Figura 20. Curva de crecimiento de *Bacteroides RYC2056*, mayo 2009

Cuadro 11. Absorbancia y número de viables de *Bacteroides RYC 2056*, mayo 2009.

TIEMPO	ABS	VIABLES
0	0,041	2,70E+05
1	0,037	2,10E+05
2	0,038	2,00E+06
3	0,081	2,24E+07
4	0,272	1,70E+08
5	0,403	4,50E+08
6	0,567	5,60E+08
7	0,590	4,80E+10

Debido a que esta última curva de crecimiento fue hecha con una cepa nueva traída desde la Universidad de Barcelona, se puede observar en la figura 21 que ya venía con una elevada concentración bacteriana ($9,40 \times 10^7$ UFC/100 mL), lo que hace pensar que ya se presentaba en su fase log de crecimiento exponencial, por tanto el tiempo requerido para encontrar la concentración ideal de trabajo fue de sólo dos horas, desde que inició la curva de crecimiento. Entonces en conclusión, el tiempo, absorbancia y concentración estandarizados para la detección y cuantificación de fagos de *Bacteroides RYC 2056* fue de 2 horas de crecimiento de la bacteria, para obtener una concentración de $1,73 \times 10^8$, con una absorbancia entre 0,484 y 0,794.

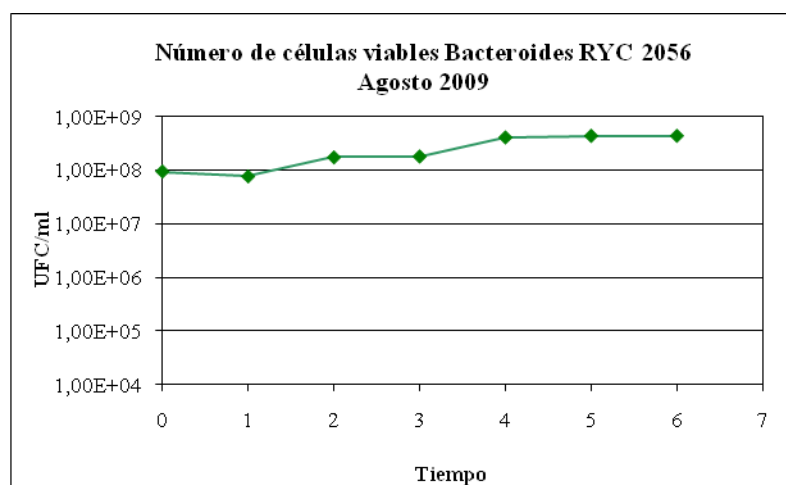


Figura 21. Curva de crecimiento de Bacteroides RYC 2056, agosto 2009.

Cuadro 12. Absorbancia y número de células viables de Bacteroides RYC 2056, agosto 2009.

TIEMPO	ABS	VIABLES
0	0,237	9,40E+07
1	0,249	7,60E+07
2	0,484	1,73E+08
3	0,597	1,80E+08
4	0,746	4,10E+08
5	0,677	4,40E+08
6	0,807	4,40E+08
7	0,794	5,78 E+08

8.3.1.2. Curva de crecimiento de Bacteroides GA 17

Para la cepa *Bacteroides* GA 17 se realizaron tres curvas de crecimiento en el transcurso del tiempo de estudio, cada una de éstas llevadas a cabo en los meses de marzo, abril y agosto de 2009.

La última se realizó con la cepa traída del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Barcelona con el fin de verificar que ésta coincidiera con la cepa evaluada inicialmente en el Laboratorio de Indicadores de la Pontificia Universidad Javeriana, respecto al tiempo de inicio de su fase exponencial, y así poder realizar los procedimientos establecidos.

Al igual que *Bacteroides* RYC 2056, para la determinación y cuantificación de fagos que infectan *Bacteroides* GA 17, se necesita contar con una concentración bacteriana de 1×10^8 UFC/mL. Teniendo esto en cuenta, para la curva del mes de marzo se puede observar que a las dos horas de iniciar el crecimiento bacteriano se alcanza dicha concentración

prolongándose hasta la hora cuatro, presentando una absorbancia entre 0,280 y 0,738. Estos parámetros obtenidos se encuentran subrayados en el cuadro 13.

Se observa en la figura 22 que el inicio de la fase log de crecimiento exponencial se presenta desde el inicio de la curva (hora 0 y 1) presentando una disminución y posterior aumento de la concentración en la hora 3, que aunque se mantiene en el mismo orden ($2,06 \times 10^8$ UFC/100 mL), genera cierto tipo de desconfianza, ya que se supone que el crecimiento se da de manera continua y exponencial y no debería presentarse ningún tipo de disminución en esta fase.

Para tener certeza del resultado obtenido, se realizó una segunda curva en el mes de abril del mismo año.

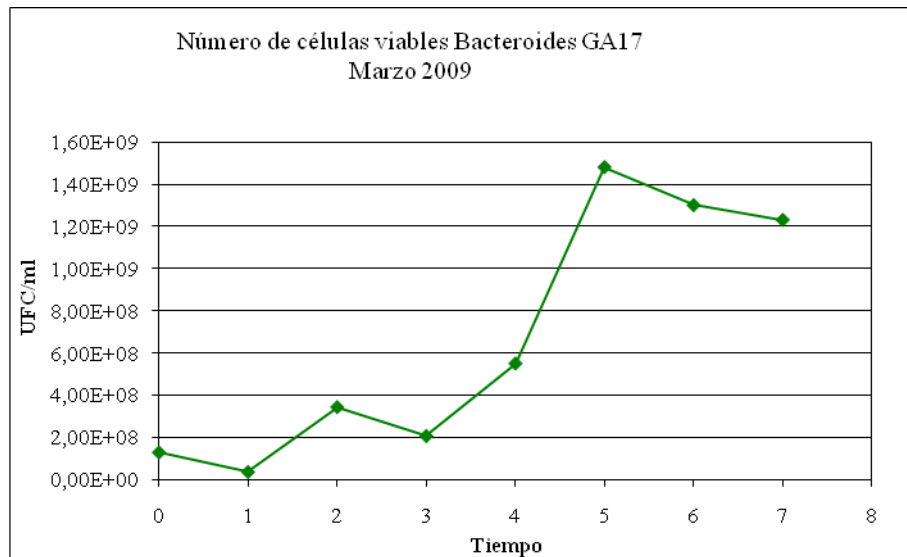


Figura 22. Curva de crecimiento Bacteroides GA 17, marzo 2009.

Cuadro 13. Absorbancia y número de células viables de Bacteroides GA 17, marzo 2009.

TIEMPO	ABS	VIABLES
0	0,085	1,28E+07
1	0,142	3,58E+07
2	0,280	3,43E+08
3	0,399	2,06E+08
4	0,738	5,50E+08
5	0,967	1,48E+09
6	1,112	1,30E+09
7	1,13	1,23E+09

Para ésta segunda curva de crecimiento de Bacteroides GA17, se observa en la figura 23 que la concentración ideal de trabajo inicia a la segunda hora de haber puesto en

crecimiento la bacteria, presentando una duración aproximada de 5 horas (de la hora 2 a la hora 7), y una absorbancia que va desde 0,502 hasta 0,798.

Hasta el momento las dos curvas de esta cepa de *Bacteroides* han proporcionado los mismos datos, manteniendo el inicio de la fase exponencial cuando se llega a una concentración de 1×10^8 UFC/100 mL.

Sin embargo, se hizo una última curva de crecimiento con la misma cepa traída directamente desde la Universidad de Barcelona, con la idea de definir finalmente la hora en donde inicia la fase exponencial de esta bacteria y su concentración ideal de trabajo, obteniendo datos precisos para iniciar el procedimiento de detección y cuantificación de fagos de *Bacteroides* GA 17.

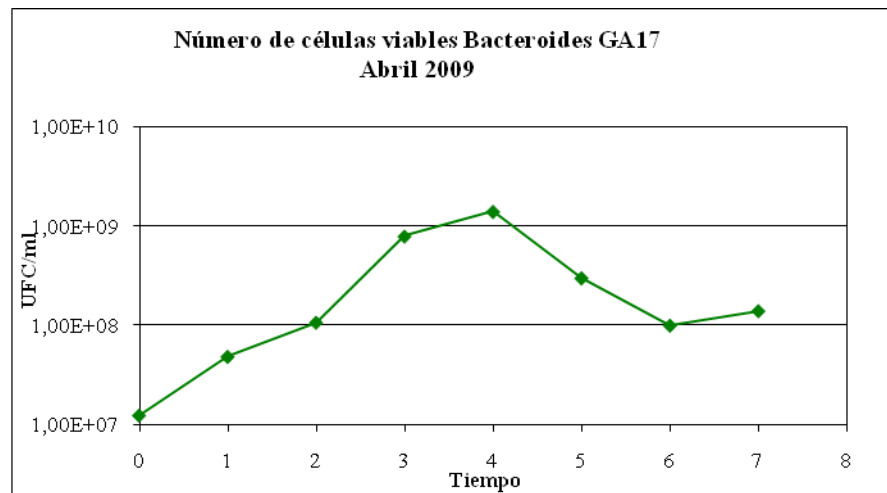


Figura 23. Curva de crecimiento *Bacteroides* GA 17, abril 2009.

Cuadro 14. Absorbancia y número de células viables de *Bacteroides* GA 17, abril 2009.

TIEMPO	ABS	VIABLES
0	0,129	1,24E+07
1	0,215	4,84E+07
2	0,502	1,07E+08
3	0,672	7,90E+08
4	0,722	1,40E+09
5	0,758	3,00E+08
6	0,776	1,00E+08
7	0,798	1,40E+08

Se confirmó con esta última prueba, realizada con la cepa traída de la Universidad de Barcelona, que el tiempo requerido por *Bacteroides* GA 17 para alcanzar la concentración

ideal de trabajo es de dos horas después de iniciar su incubación. En este tiempo alcanza una concentración o número de células viables de $2,00 \times 10^8$ UFC/mL.

Se observa en la figura 24, que *Bacteroides* GA17 inicia su crecimiento con una concentración elevada de viables, luego disminuye un poco mientras inicia su proceso de adaptación y finalmente a las dos horas inicia su fase log de crecimiento exponencial, luego se da el inicio de su fase de latencia a las tres horas prolongándose por 5 horas aproximadamente, como se observó igualmente en las curvas analizadas anteriormente.

Entonces los parámetros a utilizar en este estudio para el análisis de la detección y cuantificación de fagos que infectan *Bacteroides* GA 17 son: se mantiene el cultivo en crecimiento durante dos horas hasta alcanzar una concentración de 10^8 UFC/100 mL y una absorbancia entre 0,502 y 0,798.

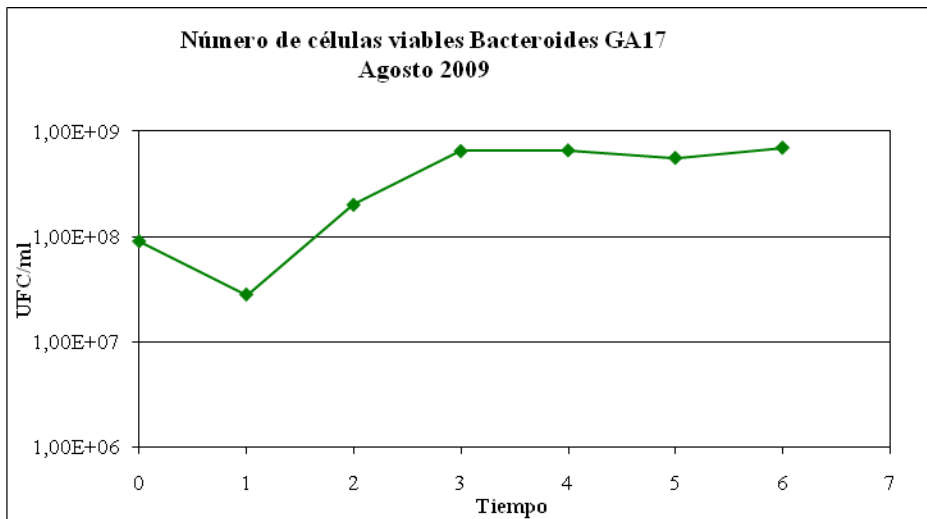


Figura 24. Curva de crecimiento de *Bacteroides* GA 17, agosto 2009.

Cuadro 15. Absorbancia y número de células viables de *Bacteroides* GA 17, agosto 2009.

TIEMPO	ABS	VIABLES
0	0,220	9,00E+07
1	0,389	2,80E+07
2	0,620	2,00E+08
3	0,735	6,50E+08
4	0,756	6,60E+08
5	0,777	5,60E+08
6	0,780	7,00E+08
7	0,740	7,35E+08

8.3.1.3. Curva de crecimiento de *Bacteroides* HB 13

Para la cepa *Bacteroides* HB 13 se realizaron tres curvas de crecimiento en el transcurso del tiempo de estudio, cada una de éstas llevadas a cabo en los meses de marzo, mayo y agosto de 2009.

La última se realizó con la cepa traída del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Barcelona con el fin de verificar que ésta coincidiera con la cepa evaluada inicialmente en el Laboratorio de Indicadores de la Pontificia Universidad Javeriana, respecto al tiempo de inicio de su fase exponencial, y así poder realizar los procedimientos según lo establecido por Araújo et al. (2001).

Al igual que *Bacteroides* RYC 2056, y *Bacteroides* GA 17, para trabajar en la cuantificación de fagos de *Bacteroides* HB 13, se debe contar con una concentración o número de células viables de 10^8 UFC/mL. Entonces, teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado para la curva de crecimiento de marzo se puede observar que a las dos horas de iniciar el crecimiento bacteriano se alcanza dicha concentración ($1,00 \times 10^8$ UFP/100 mL), prolongándose por 5 horas aproximadamente, presentando una absorbancia entre 0,550 y 0,894. Estos parámetros obtenidos se encuentran subrayados en el cuadro 16.

Sin embargo, para tener certeza del resultado obtenido, se realizó una segunda curva en el mes de mayo del mismo año.

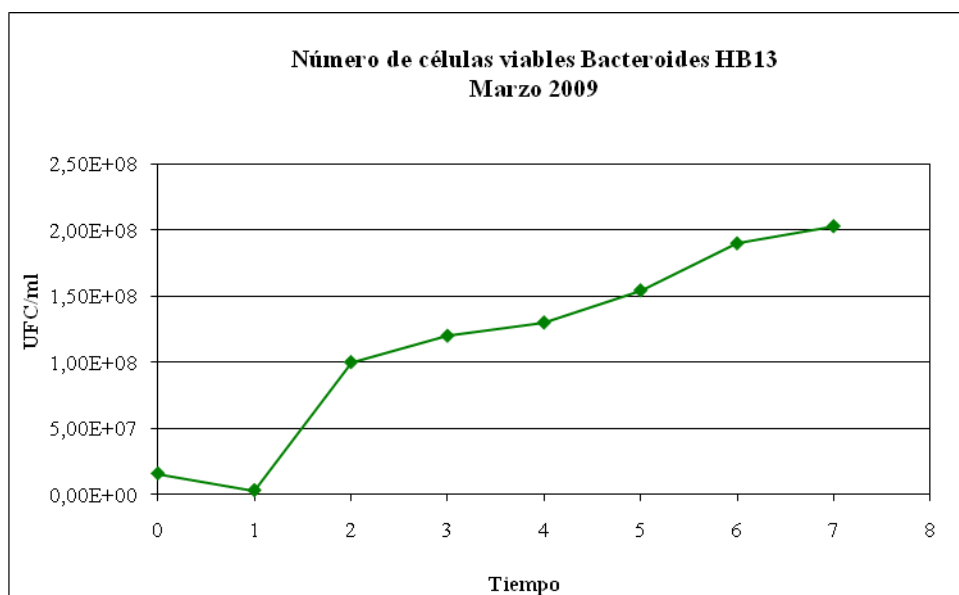


Figura 25. Curva de crecimiento de *Bacteroides* HB13, marzo 2009.

Cuadro 16. Absorbancia y número de células viables de *Bacteroides* HB 13, marzo 2009.

TIEMPO	ABS	VIABLES
0	0,082	1,57E+07
1	0,188	2,98E+06
2	0,550	1,00E+08
3	0,721	1,20E+08
4	0,823	1,30E+08
5	0,838	1,54E+08
6	0,869	1,90E+08
7	0,894	2,03E+08

En esta segunda prueba se observó que *Bacteroides* HB13 no presentó fase de adaptación, sino que empezó su fase de crecimiento desde la hora 0, encontrando la concentración ideal de trabajo a las seis horas ($1,00 \times 10^8$ UFC/100 mL), dando un resultado totalmente diferente a la curva anterior.

Por esta razón estos datos no se tuvieron en cuenta para el análisis de *Bacteroides* HB 13, y se procedió a realizar la última curva de crecimiento con la cepa traída de la Universidad de Barcelona, la cual se tenía certeza de estar pura y viable.

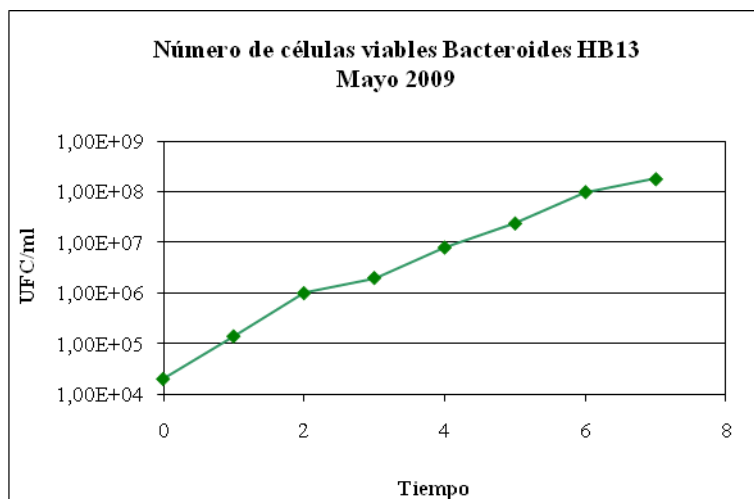


Figura 26. Curva de crecimiento de *Bacteroides* HB 13, mayo 2009.

Cuadro 17. Absorbancia y número de células viables de *Bacteroides* HB 13, mayo 2009.

TIEMPO	ABS	VIABLES
0	0,098	2,00E+04
1	0,124	1,40E+05
2	0,403	1,00E+06
3	0,563	2,00E+06
4	0,588	8,00E+06
5	0,609	2,40E+07
6	0,582	1,00E+08
7	0,604	1,80E+08

Se realizó la prueba final con la cepa de *Bacteroides* HB 13, traída desde la Universidad de Barcelona, y se obtuvieron los datos esperados; en donde para realizar el análisis y cuantificación de fagos que infectan *Bacteroides* HB 13, es necesario dejar en crecimiento esta cepa por dos horas para obtener una concentración de $7,20 \times 10^8$ UFC/mL y una absorbancia que oscila entre 0,664 y 0,720.

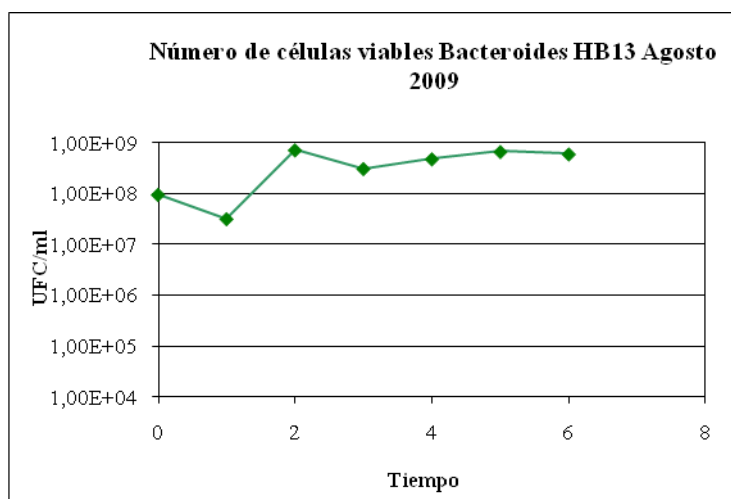


Figura 27. Curva de crecimiento de *Bacteroides* HB 13, agosto 2009.

Cuadro 18. Absorbancia y número de células viables de *Bacteroides* HB 13, agosto 2009

TIEMPO	ABS	VIABLES
0	0,214	9,60E+07
1	0,390	3,20E+07
2	0,664	7,20E+08
3	0,745	3,10E+08
4	0,769	4,80E+08
5	0,752	6,70E+08
6	0,739	6,00E+08
7	0,720	6,65E+08

Se puede concluir entonces que todas las cepas de *Bacteroides* RYC 2056, GA 17 y HB 13, alcanzan su concentración ideal de trabajo, dentro de la fase log de crecimiento exponencial (10^8 UFC/ml) a la segunda hora de iniciar su incubación y crecimiento, este resultado generalizado se presentó debido a que las cepas que se evaluaron, donadas por la Universidad de Barcelona venían concentradas para que los recuentos se mantuvieran constantes al momento de realizar el análisis, por tal razón la curva de crecimiento para estos *Bacteroides* no presenta una fase de adaptación prolongada, y se da un inicio rápido de su fase log de crecimiento exponencial, esto mientras se mantengan las condiciones ambientales ideales (anaerobiosis) y una buena conservación y mantenimiento de las mismas en refrigeración (-70 °C).