

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN  
SISTEMAS DE FILTRACIÓN LENTA EN ARENA ADICIONADOS  
CON DIFERENTES METALES**

**POR**

**Q.B.P. MARIELA GARFIO AGUIRRE**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**OCTUBRE, 2017**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN  
SISTEMAS DE FILTRACIÓN LENTA EN ARENA ADICIONADOS  
CON DIFERENTES METALES**

**POR**

**Q.B.P. MARIELA GARFIO AGUIRRE**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**OCTUBRE, 2017**

## **LUGAR DE TRABAJO**

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad de Formulación de Biológicos del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León, en cooperación con el Laboratorio de Biotecnología II de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Chihuahua, bajo la dirección de la Dra. Patricia Tamez Guerra y de la Dra. María del Rocío Infante Ramírez.

**ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN SISTEMAS DE  
FILTRACIÓN LENTA EN ARENA ADICIONADOS CON DIFERENTES  
METALES**

**Comité de Tesis**

---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**  
Director de Tesis

---

**Dr. Ricardo A. Gómez Flores**  
Secretario

---

**Dra. María del Rocío Infante Ramírez**  
Vocal

---

**Dra. María Julissa Ek Ramos**  
Vocal

---

**Dra. Licet Villarreal Treviño**  
Vocal

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada quiero agradecer a mis padres Ismael y Guadalupe, y a mis hermanos Oscar y Jocelyn, por su apoyo y motivación constante a lo largo de esta etapa, sin ustedes no hubiera sido posible.

Quiero agradecer también a la Dra. Patricia Tamez Guerra y a la Dra. Rocío Infante Ramírez por su apoyo y enseñanzas a lo largo de la maestría, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por hacer que esta investigación fuera posible. También quiero agradecer al resto de mi comité de tesis por su colaboración en este trabajo.

Al Dr. Javier Zavala por su atención, consejos y asistencia en el desarrollo de este proyecto.

También a mis compañeros de laboratorio por su apoyo brindado y los momentos agradables que pasamos juntos.

A mis amigos que se convirtieron en familia, Ana, Sarahí, Maritza y Servando, muchas gracias por permitirme ser parte de sus vidas. YOLO.

A Rocío Rojas, por acompañarme en este camino y batallar juntas, tengo suerte de tenerte como amiga.

Por último, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE TABLAS .....	v
NOMENCLATURA.....	vi
RESUMEN.....	i
ABSTRACT .....	ii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Contaminación del agua.....	3
2.3. Filtración en medios granulares .....	4
2.3.1. Filtros rápidos de arena .....	5
2.3.2. Filtros lentos de arena .....	5
2.4.3. Rendimiento de la filtración lenta en arena.....	15
2.4.4. Limpieza del filtro lento de arena .....	17
2.4.    Uso de metales como antimicrobianos .....	18
2.4.1.Cobre .....	18
2.4.2. Hierro .....	20
2.4.3. Zinc.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS .....	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. Objetivo general.....	24
5.2. Objetivos particulares .....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1. Diseño y construcción de los filtros lentos de arena.....	25
6.1.1. Entrada de agua a los filtros lentos de arena .....	25
6.1.2. Adición de los distintos metales.....	29
6.1.3. Caracterización de la arena. ....	30
6.2. Análisis microbiológico y fisicoquímico del afluente y efluente de los filtros lentos de arena. ....	32

6.2.1. Recolección de agua para llenado de los filtros.....	32
6.2.2. Toma de muestras.....	32
6.2.3. Análisis fisicoquímicos de las muestras de agua .....	33
6.2.4. Análisis microbiológicos de las muestras de agua .....	33
6.3. Análisis de la comunidad bacteriana presente en los filtros lentos de arena. ....	35
6.3.1. Obtención de las muestras.....	35
6.3.2. Extracción de ADN del <i>Schmutzdecke</i> .....	36
6.3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	37
6.3.5. Purificación y cuantificación del ADN. ....	37
6.3.8. Secuenciación.....	37
6.3.9. Análisis de secuencias.....	39
6.4. Análisis estadístico .....	40
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
7.1. Diseño y construcción de los filtros lentos de arena.....	41
7.1.1. Caracterización de la arena. ....	42
7.2. Rendimiento de los filtros lentos de arena.....	43
7.2.1. Análisis fisicoquímicos. ....	43
7.2.2. Análisis microbiológicos.....	46
7.3. Análisis de la comunidad bacteriana .....	51
7.3.1. Extracción y cuantificación de ADN. ....	51
7.3.2. Secuenciación.....	53
7.3.3. Análisis de las secuencias. ....	54
7.3.4. Riqueza y abundancia bacteriana. ....	55
7.3.5. Composición de la comunidad bacteriana.....	57
8. CONCLUSIONES.....	67
9. PERSPECTIVAS .....	68
10. REFERENCIAS .....	69
ANEXO 1 .....	82
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	85

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo del desarrollo de una biopelícula.....	10
Figura 2. Eventos tentativos de la muerte por contacto.....	20
Figura 3. Diagrama de la base de metal utilizada como soporte del sistema de filtración lenta en arena.....	25
Figura 4. Diagrama del sistema de entrada de agua a los filtros lentos de arena.....	27
Figura 5. Diagrama de la vista frontal del sistema de filtración lenta en arena.....	28
Figura 6. Pasos del proceso experimental utilizado por Illumina NGS.....	38
Figura 7. Sistema de filtración lenta en arena.....	41
Figura 8. Valores de pH del afluente y los efluentes de cada uno de los filtros lentos de arena.....	44
Figura 9. Porcentaje de remoción de turbidez (UNT) de cada uno de los filtros lentos de arena.....	45
Figura 10. Valores de los Sólidos disueltos totales (SDT) del afluente y efluentes de los filtros lentos de arena.....	46
Figura 11. Coliformes totales y fecales expresadas en logaritmo base 10.....	48
Figura 12. Porcentaje final de remoción de organismos coliformes totales de cada uno de los filtros.....	50
Figura 13. ADN del <i>Schmutzdecke</i> de cada uno de los filtros lentos de arena.....	51
Figura 14. Filos dominantes presentes en los filtros lentos de arena.....	59
Figura 15. Clases dominantes presentes en los filtros lentos de arena.....	61
Figura 16. Familias dominantes presentes en los filtros lentos de arena.....	66



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comportamiento típico del tratamiento de Filtros lentos de arena convencionales <sup>1</sup>	7
Tabla 2. Eficiencia de tratamiento de los filtros lentos de arena .....	16
Tabla 3. Determinación de textura y plasticidad. ....	30
Tabla 4. Resultados de la caracterización de la arena utilizada en el experimento. ....	42
Tabla 5. Cuantificación de ADN de las muestras del Schmutzdecke de cada uno de los FLA.....	52
Tabla 6. Cuantificación de ADN de las muestras del Schmutzdecke de cada uno de los FLA después de su purificación. ....	52
Tabla 7. Estadísticas datos crudos. ....	53
Tabla 8. Estadísticas datos sin adaptadores. ....	54
Tabla 9. Total de secuencias de cada muestra antes y después del filtro de calidad. ....	54
Tabla 10. Número de OTUs obtenidos de cada clasificación taxonómica por cada muestra (Anexo 1). ....	55
Tabla 11. Número de OTUs en común entre las muestras a nivel de filo. ....	56
Tabla 12. Número de OTUs únicos en cada muestra a nivel de filo. ....	56

## NOMENCLATURA

---

≥	Mayor o igual que
mL	Mililitros
FLA	Filtro lento de arena
mm	Milímetro
cm	Centímetro
log	Logaritmo
pH	Potencial de Hidrógeno
°C	Grados Celsius
UNT	Unidad nefelométrica de turbidez
COT	Carbono orgánico total
DQO	Demanda Química de Oxígeno
COA	Carbono orgánico asimilable
COBD	Carbono orgánico biodegradable disuelto
COD	Carbono orgánico disuelto
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Fe	Hierro
S	Azufre
IluD	Dihidróxido ácido deshidratasa
LeuC	Isopropilmalato deshidratasa
FumA	Fumarasa A
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Zn	Zinc
M	Molar
m	metro
PEAD	Polietileno de alta densidad
L	Litros
CPVC	Policloruro de vinilo clorado
PVC	Policloruro de vinilo

---

---

g	gramo
Log10	Logaritmo base 10
Pb	Plomo
Vol	volumen
mg	miligramos
min	minutos
SDT	Sólidos disueltos totales
NMP	Número más probable
h	hora
núm.	Número
mM	milimolar
<i>g</i>	Gravedades
s	segundos
μL	microlitros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ng	nanogramos
A	Absorbancia
pb	Pares de bases
O <sub>2</sub>	Oxígeno
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HCl	Ácido clorhídrico
NaCl	Cloruro de sodio
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
SDS	Dodecil sulfato sódico
TBE	Tris/Borato/EDTA
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
LMP	Límite máximo permitido
WHO	Organización mundial de la salud
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
H'	Índice de Shannon

---

---

D	Índice de Simpson
N	Norte
W	Oeste
DR	Densidad real
DA	Densidad aparente
%RBCT	Porcentaje de remoción de bacterias coliformes totales
CC	Control de calidad
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
OTU	Unidades taxonómicas operacionales
ANOVA	Análisis de varianza
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

---

## RESUMEN

Debido a la magnitud de los problemas de salud asociados a la ingesta de agua contaminada por población rural, se requiere implementar nuevas estrategias para reducir enfermedades derivadas, principalmente gastrointestinales. La filtración lenta en arena es económica y de fácil mantenimiento. Para reducir contaminantes y microorganismos enteropatógenos presentes en agua, se evaluó este sistema en combinación con acero, cobre o latón. Se construyeron e implementaron cuatro filtros a nivel laboratorio, cuya efectividad se midió en base a parámetros fisicoquímicos y microbiológicos (cuantificación de coliformes totales y fecales usando la técnica del número más probable –NMP-) antes y después de la filtración. Los sistemas de filtración evaluados redujeron de forma efectiva los contaminantes químicos y microbiales. Se analizó la comunidad microbiana presente en el *schmutzdecke*, mediante la amplificación del gen 16S rRNA para procariontes mediante la plataforma MiSeq de Illumina y las secuencias obtenidas se analizaron con el programa bioinformático QIIME. Después se analizó el efecto que tienen los distintos metales en el rendimiento y en la composición de la comunidad bacteriana presente en cada filtro. La adición de los metales no tuvo un efecto significativo ( $P > 0.05$ ) en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos analizados, pero se observaron diferencias entre la composición de la comunidad bacteriana en el filtro con latón y los otros. Creemos que la instalación de un sistema de filtración lenta en arena a mayor escala, localizado antes de asentamientos humanos, ayudará a reducir las enfermedades gastrointestinales y por ingestión de agua contaminada entre la población rural.

## ABSTRACT

The magnitude of health problems associated with water quality has prompted to find new strategies to reduce mainly gastrointestinal diseases among inhabitants settle in rural areas that drink contaminated water. The slow sand filtration is the most recommended water treatment strategy for rural areas, because is economic and requires low maintenance. To reduce contaminants and enteropathogenic microorganisms present in water, a slow sand filtration system was evaluated in combination with steel, copper or brass. Four laboratory-grade filters were constructed and implemented, whose effectiveness was measured based on physicochemical and microbiological (quantification of total and fecal coliforms using the most probable number -NMP- technique) parameters, before and after filtration. The microbial community present in the *schmutzdecke*, was analyzed by amplifying the prokaryotes 16S rRNA genes by using the Illumina MiSeq platform. Obtained sequences were analyzed with the QIIME bioinformatic program. The evaluated filtration systems effectively reduced chemical and microbial contaminants. After the yield and composition of the bacterial community present in the *schmutzdecke* of each filter and metal combination was analyzed, results demonstrated that the addition of metals did not have a significant effect ( $P > 0.05$ ) on the analyzed physicochemical and microbiological parameters. Nevertheless, differences between the bacterial communities compositions in the brass filter versus all other tested were observed. We believe that the installation of a slower sand filtration system, located before human settlements, will help to reduce contamination- and gastrointestinal-related diseases among the rural inhabitants.

# 1. INTRODUCCIÓN

El agua es esencial para la vida y el acceso a agua potable es una necesidad humana fundamental y, por lo tanto un derecho humano esencial. El suministro de agua potable de calidad es importante para el bienestar de la humanidad y el desarrollo de cualquier país, ya que es compatible con la salud pública y, por lo tanto, garantiza el crecimiento económico. La provisión de agua, saneamiento y buenos servicios de higiene es vital para la protección y desarrollo de los recursos humanos (Guchi, 2015). Según un reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la UNICEF: Progresos en materia de agua potable, sanitización e higiene del año 2017, se estima que hasta el año 2015 un total de 844 millones de personas todavía carecían de un servicio básico de agua potable de esas 159 millones aún utilizan aguas superficiales como agua para beber, y al menos 2 billones de personas se abastecen de una fuente de agua contaminada con materia fecal. Esto es un problema ya que el agua contaminada sirve como un mecanismo para transmitir enfermedades contagiosas como diarrea, cólera, disentería. Se calcula que la contaminación de agua potable provoca más de 502,000 muertes por diarrea al año (WHO y UNICEF 2017). Los principales afectados son los niños ya que son más susceptibles, se estima que alrededor de 801,000 niños menores de 5 años de edad padecen de diarrea al año. Esto equivale al 11% de los 7.6 millones de muertes de niños menores de cinco años y significa que alrededor de 2,200 niños están muriendo cada día como resultado de enfermedades diarreicas (CDC 2015).

Debido a la magnitud de los problemas de salud asociados a la calidad del agua, se requieren importantes esfuerzos para la mejora de los abastecimientos de agua. Una de las alternativas para el tratamiento de agua en comunidades rurales es el uso de filtros lentos de arena ya que este tipo de filtros son asequibles, de bajo mantenimiento, y son muy eficaces en la eliminación de bacterias esto debido a la formación de una capa biológicamente activa conocida como *Schmutzdecke*, sin embargo, en aguas muy contaminadas la efectividad se ve reducida por lo que se requieren alternativas para mejorar el rendimiento de los filtros lentos de arena como el uso de metales que se ha visto tienen actividad antimicrobiana. El

objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de hierro, cobre y latón sobre la comunidad microbiana presente en un sistema de filtración lenta en arena.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Contaminación del agua

La contaminación de los cuerpos de agua afecta directamente a las comunidades que viven cerca de los ríos, lagos y otros afluentes porque provoca daños a su salud y sus fuentes de alimentos. Además representa un alto costo para la sociedad en su conjunto: entre más agua contaminada se descargue en los afluentes, más costoso será potabilizarla, llevarla a las ciudades y atender los impactos que deje en las comunidades y en el medio ambiente que fueron afectados (Greenpeace 2015).

La calidad del agua, tanto si el propósito es usarla para beber, limpieza, producción de comida o recreación, tiene un impacto importante en la salud. El agua de baja calidad puede causar brotes de enfermedades y esto puede contribuir a que las tasas de enfermedades se manifiesten con el paso del tiempo (WHO y UNICEF 2015).

Directrices para la calidad del agua potable indican que en muestras de 100 ml de agua potable no deben detectarse las bacterias indicadoras fecales, principalmente *E. coli* o, alternativamente, coliformes termotolerantes (TTC). Sin embargo, numerosos informes documentan contaminación fecal de las fuentes de agua potable, especialmente en países de bajos ingresos (Gruber et al. 2014; Bain et al. 2014a)

Bain et al. (2014b) estimaron que 1.9 billones de personas usaron tanto una fuente de agua no potable como una fuente con contaminación fecal. Que la contaminación es más frecuente entre algunos tipos de fuentes de agua no tratadas, especialmente agua subterránea protegida y tuberías rurales. Las fuentes de agua rurales son sustancialmente más propensas a contaminarse y generalmente presentan niveles altos de contaminación proveniente del agua de áreas urbanas. Además estimaron que el número de personas que consumen agua no potable o con  $\geq 10$  células de *Escherichia coli* o TTC por 100 ml es 1.3 billones (Bain et al. 2014b)

De acuerdo al reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la UNICEF: Progresos en materia de agua potable, sanitización e higiene del año 2017, se estima que hasta el año 2015 un total de 844 millones de personas todavía carecían de un servicio básico de agua potable de esas 159 millones aún utilizan aguas superficiales como agua para beber, y al menos 2 billones de personas se abastecen de una fuente de agua contaminada con materia fecal. Se calcula que la contaminación de agua potable provoca más de 502,000 muertes por diarrea al año (WHO y UNICEF 2017). En 2006, 7 de cada 10 personas de áreas rurales no tenían acceso a agua potable (CDC 2015).

El agua no potable, la disponibilidad inadecuada de agua para higiene y la falta de acceso a sistemas de saneamiento de agua contribuyen a alrededor del 88% de las muertes por enfermedades diarreicas. El saneamiento del agua e higiene tiene el potencial de prevenir al menos el 9.1% de la carga mundial de morbilidad y el 6.3% del total de muertes. El impacto de las tecnologías de agua potable en la salud pública en los Estados Unidos se estima que ha tenido una tasa de retorno de un 23 a 1 en las inversiones hechas en sistemas de filtración y cloración de agua durante la primera mitad del siglo XX (CDC 2015).

### **2.3. Filtración en medios granulares**

La filtración en medios granulares es la forma más económica y eficiente de separar sólidos suspendidos que no son removidos por sedimentación. El filtro más ampliamente usado para remover sólidos suspendidos es el filtro de grava y arena, y se le llama así precisamente porque es un lecho de grava y arena el que retiene las partículas suspendidas en el agua.

En forma general, los filtros se clasifican en filtros de gravedad o filtros lentos y filtros a presión o filtros rápidos (Rocha 2010).

### **2.3.1. Filtros rápidos de arena**

Los filtros rápidos son usados principalmente para remover la turbidez después de la coagulación y floculación en plantas grandes de tratamiento de aguas. Los filtros rápidos pueden ser o bien tanques abiertos (filtros de gravedad rápidos) o tanques cerrados (filtros de presión), en donde el agua pasa a través del medio filtrante, más comúnmente arena (Koenig 1967).

Las principales diferencias entre los filtros rápidos con los filtros lentos es que mientras en el filtro lento el agua fluye por gravedad, en un filtro rápido el agua es forzada a fluir a través de las diferentes capas de material filtrante por presión de una bomba y los filtros lentos son muy eficientes en remover microorganismos del agua (Rocha 2010).

### **2.3.2. Filtros lentos de arena**

La filtración lenta en arena es uno de los procesos más antiguos y eficaces de tratamiento de aguas utilizado para producir agua microbiológicamente segura (Hijnen et al. 2007; Anderson et al. 2009; Haig et al. 2014). Es un sistema muy sencillo y efectivo porque copia exactamente el proceso de purificación que se da en la naturaleza al atravesar el agua de lluvia a los estratos de la corteza terrestre, hasta encontrar los acuíferos o ríos subterráneos (Cánepa de Vargas 1998). Ha sido utilizado principalmente como filtro de partículas y patógenos que combina procesos físicos, biológicos y químicos para la obtención de agua de apta para consumo (Langenbach et al. 2009).

Para que una tecnología de tratamiento de agua en los hogares, como la filtración lenta en arena (FLA) logre el uso sostenible de forma generalizada entre las personas de bajos recursos, debe de cumplir ciertos criterios:

- Limpieza eficaz del agua y la mejora de su sabor, olor y apariencia.
- Fácil de operar y mantener.
- Asequible y duradero, con poco o nada de los costos recurrentes.
- Fabricado utilizando habilidades y materiales locales.

- Sin uso de productos químicos o energía (Guchi 2015).

Por lo que estas características lo convierten en un sistema ideal para implementar en zonas rurales y pequeñas comunidades (Torres y Villanueva 2014).

### **2.3.2.1. Características de la filtración lenta en arena**

Los componentes básicos de un filtro lento de arena son: una capa de agua sobrenadante, un lecho de arena (arena fina y gruesa), una capa de grava y una manguera de salida. La capa de agua sobrenadante proporciona un cabezal de agua que conduce el agua a través del lecho del filtro, mientras crea un periodo de retención de varias horas para el agua. La arena es el medio usual de filtración debido a su bajo costo, durabilidad y disponibilidad. La arena tiene un tamaño de grano relativamente bueno (tamaño efectivo 0.15-0.3 mm). La grava proporciona un paso sin obstrucciones para el agua tratada desde el lecho del filtro, que evita que la arena obstruya la tubería de drenaje y soporta el lecho de arena del filtro.

Materia orgánica, partículas inorgánicas y microorganismos patógenos son removidos por filtración física y degradación biológica en el lecho de arena (Tabla 1) (Guchi 2015).

El principio se basa en que el agua se filtra lentamente a través de una capa del medio filtrante (arena), y durante este proceso los microorganismos presentes forman una zona de purificación bacteriológica sobre y entre la arena en donde se desarrollan procesos de degradación química y biológica que reducen la materia retenida a formas más simples (Cánepa de Vargas 1998; Lea 2008).

El agua que ingresa permanece sobre el lecho filtrante de tres a doce horas, dependiendo de la velocidad de filtración (Cánepa de Vargas 1998).

Tabla 1. Comportamiento típico del tratamiento de Filtros lentos de arena convencionales<sup>1</sup>

Parámetro de calidad del agua	Capacidad de eliminación
Turbiedad	< 1.0 UTN
Coliformes	1-3 unidades log
Virus entéricos	2-4 unidades log
Quiste <i>Giardia</i>	2-4 + unidades log
<i>Cryptosporidium oovystis</i>	> 4 unidades log
Biodegradable	
Carbón orgánico disuelto	< 15-25%
Precusores del Trihalometano	< 20-30%
Metales pesados	
Zinc, Cobre, Cadmio, Plomo	> 95-99%
Fierro, Manganeseo	> 67%
Arsénico	< 47%

<sup>1</sup>Tomado del *National Enviromental Services Center*

### 2.3.2.2. Mecanismos de filtración

Un factor importante que afecta el mecanismo de remoción de un filtro lento de arena maduro es la velocidad de filtración, en particular los mecanismos biológicos y la sedimentación. La remoción de virus decrece con el incremento de la velocidad de filtración, además una alta velocidad de filtración incrementa la tasa de carga orgánica, lo que resulta en una gran disponibilidad de sustrato y fuerza a los microorganismos a vivir a más profundidad que 300-400 mm en el lecho de arena, dando lugar al potencial avance de las bacterias. En algunos casos, la velocidad de filtración no afecta la remoción de bacterias.

Otro factor importante que afecta los mecanismos de remoción del filtro lento de arena es la profundidad del lecho. La profundidad mínima para una buena turbidez y remoción de bacterias coliformes es 300 mm, pero se requiere de una profundidad de 600 mm para la remoción de virus.

La mayoría de la biomasa y el tratamiento biológico ocurre en la parte alta del lecho de arena, toda la reducción de bacterias ocurre en los primeros 20 cm del lecho de arena, con una remoción de 1 log de coliformes fecales en los primeros 5 cm de profundidad y 1.3 log de eliminación después de 20 cm de profundidad, para un total de 2.3 log de eliminación (99.5%).

La profundidad del lecho es más importante en la remoción de partículas más pequeñas, incluyendo virus, materia coloidal, y color, y menos importante en la remoción de bacterias (Guchi 2015).

### **2.3.2.3. Mecanismos fisicoquímicos de remoción en filtración lenta en arena**

Los mecanismos fisicoquímicos de filtración están divididos en dos categorías: de transporte y de fijación.

El mecanismo de transporte regula el transporte de las partículas a el medio de filtrado y el de fijación regula la fijación de las partículas al medio (Guchi 2015).

El mecanismo de transporte que está apoyado por procesos hidráulicos, ilustra los mecanismos mediante los cuales ocurre el choque entre las partículas contenidas en el agua problema y los granos de arena. Estos mecanismos son: cernido, intercepción, sedimentación, difusión y flujo intersticial.

Cernido: En este mecanismo, las partículas de mayor tamaño que los intersticios del material filtrante son atrapadas y retenidas en la superficie del medio filtrante. Los factores que influyen en el cernido son el tamaño de grano, tamaño y forma de las células bacterianas, grado de saturación del agua y obstrucción del medio filtrante.

Intercepción: Las partículas pueden colisionar con los granos de arena.

Sedimentación: Este mecanismo permite que las partículas sean atraídas por la fuerza de gravedad hacia los granos de arena, lo que provoca su colisión.

Difusión: Se produce cuando la trayectoria de la partícula es modificada por micro variaciones de energía térmica en el agua y los gases disueltos en ella, lo cual puede provocar su colisión con un grano de arena.

Flujo intersticial: Se refiere a las colisiones entre partículas debido a la unión y bifurcación de líneas de flujo que devienen de la tortuosidad de los intersticios del medio filtrante. Este cambio continuo de dirección del flujo crea mayor oportunidad de colisión (Stevik et al. 2004; Torres y Villanueva 2014).

Dentro de los mecanismos de fijación se encuentra la adsorción que es cuando el tamaño de poro es más grande que la bacteria, el mecanismo dominante para la retención bacteriana es la adsorción. Los factores que pueden influenciar la adsorción de las células bacterianas al medio poroso pueden ser categorizadas en tres grupos: físicos, químicos y microbiológicos. Los factores físicos incluyen el medio poroso, la presencia de materia orgánica y biofilm, temperatura y velocidad del flujo del agua. Los factores químicos incluyen fuerza iónica, especies y pH. Los factores microbiológicos incluyen hidrofobicidad, quimiotaxis, cargas electrostáticas en la superficie celular entre algunas otras características de la superficie celular y concentración bacteriana (Stevik et al. 2004)

#### **2.3.2.4. Mecanismos biológicos de remoción en filtración lenta en arena.**

##### **2.3.2.4.1. Biopelículas**

Se le denomina biopelícula a las agrupaciones de células bacterianas adheridas a una superficie y embebidas en una matriz adhesiva formada por excreciones celulares y restos de células muertas. La matriz es normalmente una mezcla de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos que unen las células entre sí. Las biopelículas atrapan los nutrientes para el crecimiento microbiano e impiden que las células se desprendan de las superficies dinámicas tales como las que se encuentran en sistemas que fluyen.

Las biopelículas pueden contener solo una o dos especies o, con más frecuencia, muchas especies de bacterias. Las biopelículas son, por lo tanto, comunidades microbianas funcionales y en crecimiento (Madigan et al., 2015).

Los estudios indican que las biopelículas son un punto estable en un ciclo biológico que incluye la iniciación, maduración, mantenimiento y disolución. Parece que las bacterias inician el desarrollo de las biopelículas en respuesta a señales medioambientales específicas, tales como la disponibilidad de nutrientes. A pesar de que esas condiciones varían ampliamente, los organismos Gramnegativos se someten a una transición de células planctónicas de vida libre, a células sésiles, adheridas a las superficies en respuesta a un medio rico en nutrientes. Estas biopelículas continúan su desarrollo mientras los nutrientes sean suministrados, pero cuando carecen de nutrientes se separan de la superficie y regresan al modo de crecimiento planctónico (Figura 1) (O'Toole et al. 2000).

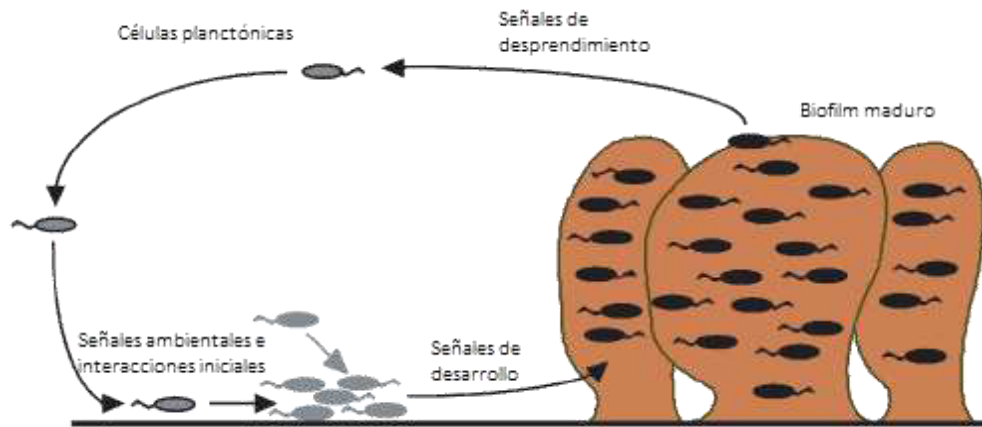


Figura 1. Modelo del desarrollo de una biopelícula. Las células planctónicas pueden formar contactos célula-superficie y célula-célula resultando en la formación de microcolonias. La arquitectura distintiva de las biopelículas se forma en un proceso dependiente de lactona acilhomoserina. Las células de la biopelícula pueden volver a un estilo de vida planctónico para completar el ciclo de desarrollo de la biopelícula (tomado de O'Toole et al. 2000).

#### 2.3.2.4.2. Schmutzdecke

El compartimiento de eliminación más eficaz de un filtro lento de arena es el *Schmutzdecke* (alemán para “cubierta de suciedad”), una capa de la biopelícula que se desarrolla en la parte superior del lecho filtrante de arena en la que se conservan más de 90% de las bacterias indicadoras de patógenos y los colífagos.

Se supone que la formación de esta estructura se inicia a través de la absorción de la materia orgánica de las partículas de arena, por lo que se genera una zona rica en nutrientes



con el crecimiento microbiano concomitante en la que más material puede ser atrapado por el esfuerzo físico (filtración mecánica) o adsorción (Pfannes et al. 2015).

Las bacterias pueden crecer juntas en colonias en la superficie de los granos de arena, formando biopelículas que pueden absorber partículas en el agua cruda. Los microorganismos también pueden producir polímeros exocelulares que se pegan a las partículas y mejoran su eliminación. Los procesos de transporte, adsorción y movilización de material orgánico e inorgánico también se ven afectados por la actividad microbiana (Joubert y Pillay 2008).

Los mecanismos fisicoquímicos para eliminar los microorganismos en la arena, no son tan eficaces como los procesos de filtrado que se producen en el *Schmutzdecke*, que consta de bacterias, algas, y otros organismos unicelulares múltiples (Joubert y Pillay 2008; Clark et al. 2012).

Las bacterias aeróbicas oligotróficas crecen en los medios de arena para formar un biofilm denso. Se sabe que esta biopelícula pegajosa, a veces referida como zooglea, absorbe material coloidal. Algunos investigadores postulan que la eficiencia de filtración es parcialmente una función de la adsorción de partículas a la biopelícula pegajosa. Se sabe que bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa* son las responsables de producir sustancias poliméricas extracelulares (EPS), polisacáridos y proteínas, que sirven para anclar las bacterias a superficies. Los polímeros actúan para flocular organismos y desestabilizar la arcilla y las bacterias para facilitar la unión. Cada capa del lecho de arena tiene su propio potencial de inactivación dependiendo de la distribución vertical de la biomasa (Guchi 2015).

La eficacia de la filtración inicial sin una capa de *Schmutzdecke* es del 60%. A medida que más organismos pasan a través del *Schmutzdecke*, nuevos microorganismos se adhieren a la materia biológica depositada previamente y se van acumulando en las capas superiores de la arena (Clark et al. 2012). La depredación de algas y bacterias, la compactación de los detritos por gusanos acuáticos que se encuentran principalmente en la región más profunda de la cama de arena, la muerte natural, la descomposición metabólica (es decir, la reducción del carbono orgánico), y la adsorción a la superficie zoogleal pegajosa de la arena son los principales mecanismos biológicos responsables de la eliminación de partículas por el filtro

lento de arena (Clark et al. 2012; Guchi 2015), por lo que el proceso de maduración de la arena es un factor crítico que influye en la remoción de partículas y microorganismos. Una capa efectiva de la biopelícula toma entre una a tres semanas en desarrollarse (Clark et al. 2012).

Los organismos más comunes que se pueden encontrar en el lecho de arena son flagelados, ciliados, rotíferos, los gusanos planos (*Microturbellaria*), gastrotriches, nemátodos (gusanos redondos), anélidos (gusanos segmentados) y artrópodos (*Harpacticids*). De todos ellos, los organismos predominantes son bacterias pigmentadas Gramnegativas, tales como *Pseudomonas* y *Aeromonas*, así como algas, protozoos, y eucariotas de orden superior. Las bacterias que están típicamente presentes en los procesos biológicos son generalmente clasificadas como oligotróficas. Una especie que se ha demostrado está implicada como depredador bacteriano es *Crisofita*. Otra fauna depredadora incluye especies de meiofauna (0.1 a 1 mm), que se alimentan de las células bacterianas o de algas individuales, partículas en suspensión o de otras especies. Algunos eucariotas son conocidos por ser depredadores de bacterias, mientras que algunos microorganismos simplemente producen sustancias que son tóxicas para las bacterias entéricas (Guchi 2015).

#### **2.3.2.4.3. Asociaciones microbianas**

En cualquier ecosistema que se analice se dan asociaciones entre los miembros de la población. Dichas asociaciones pueden ser neutrales, benéficas o perjudiciales para al menos uno de los organismos involucrados. Generalmente, los microorganismos interaccionan de una manera positiva o negativa. Las asociaciones positivas se clasifican como mutualismo, comensalismo, simbiosis y sinergismo; en tanto que las negativas incluyen depredación, parasitismo y competencia por el propio hábitat/nicho. En una comunidad, las interacciones positivas tienden a optimizar el uso de los recursos disponibles, mientras que las negativas actúan como controles de retroalimentación, pues tienden a limitar el agotamiento de los recursos y la posible desaparición de poblaciones (Cavallini 2005). Se ha observado que las principales asociaciones microbianas encargadas

de la eliminación de los microorganismos patógenos que se dan en el *Schmutzdecke* de un filtro lento de arena son antagonismo y depredación (Guchi 2015).

#### **2.3.2.4.3.1. Antagonismo**

El antagonismo microbiano es un fenómeno biológico en el cual ciertos microorganismos suprimen el crecimiento de otros microorganismos a través de la competencia por nutrientes y la secreción de sustancias inhibitorias (Shaekh et al. 2013). Existen dos categorías: directa e indirecta. El antagonismo directo se debe a la producción de metabolitos inhibitorios (ácidos orgánicos, H<sub>2</sub>S), toxinas (bacteriocinas) y/o competencia por nutrientes o sitios de adhesión. El antagonismo indirecto es el resultado de alteraciones de la respuesta fisiológica del hospedero por la microbiota nativa, que a su vez influye en la composición del ecosistema microbiano como en la inmuno-modulación o estimulación de peristalsis (cambios de pH, presión osmótica y presión de superficie) (Gomes et al. 2006; Shaekh et al. 2013).

En el amensalismo se presentan dos fenómenos: alelopatía y antibiosis. El término alelopatía se refiere a los efectos nocivos de un compuesto químico producido por una planta sobre otra (Sampietro 2002). El término antibiosis es similar al de alelopatía, solo que se emplea en microorganismos, se define como la supresión o muerte de un organismo debido a químicos tóxicos secretados por otro, y es considerado como un fenómeno ubicuo dentro de las comunidades microbianas. En conjuntos bacterianos, los agentes de interacciones de antibiosis son las bacteriocinas. Las bacteriocinas son proteínas antimicrobianas de espectro reducido y se encuentran en casi todos los linajes principales de bacterias. Se sabe que la excreción de sustancias antimicrobianas está extendida entre bacterias, levaduras y otros hongos (Czárán et al. 2002). Dado que las cepas bacteriocinogénicas (productoras de toxina) matan las cepas no productoras estrechamente relacionadas, las bacteriocinas se interpretan comúnmente para ser compuestos anticompetitivos (Kerr 2007). Dentro de las bacteriocinas más estudiadas se encuentran las colicinas de *Escherichia. coli* y las nisinas de bacterias ácido lácticas (Czárán et al. 2002).

Específicamente hablando de los filtros lentos de arena se utiliza el término bioantagonismo, el cual es explicado como un mecanismo de remoción en donde los microorganismos patógenos entrantes son puestos fuera de competencia, o bien, inactivados por las bacterias autóctonas de la arena y el biofilm que se encuentra en el filtro. El razonamiento es que las bacterias patógenas, están acostumbradas a las altas concentraciones de materia orgánica, donde se desarrollan y experimentan una alta tasa de crecimiento. Sin embargo, a bajas concentraciones de materia orgánica, su tasa de crecimiento es baja. En contraste, la tasa de crecimiento de las bacterias autóctonas sigue siendo elevada incluso a bajas concentraciones de materia orgánica (menos de 1 mg/L) de carbono, por lo tanto los patógenos quedan fuera de competencia (Guchi 2015).

#### **2.3.2.4.3.2. Depredación**

Se le llama depredación a la interacción entre microorganismos en la cual uno se beneficia y el otro es perjudicado, basado en la ingestión del organismo más pequeño, la presa, por el organismo más grande, el depredador (Wang et al. 2010).

Se considera que las principales fuentes de mortalidad microbiana en aguas son la lisis mediada por virus y pastoreo por protistas fagotróficos (Pernthaler 2005; Haig et al. 2014b).

Generalmente, la alimentación por flagelados y ciliados es tamaño-selectivo. Células bacterianas de tamaño medio son más susceptibles a depredación por flagelados y ciliados, mientras las células más pequeñas y formas filamentosas grandes pueden ser en parte resistentes al pastoreo (Rønn et al. 2002).

El pastoreo de protistas sobre bacterias es también un mecanismo importante de regeneración de nutrientes, en particular de nitrógeno y fósforo. Estos dos elementos (así como el hierro y silicio) limitan el crecimiento de procariotas y eucariotas autótrofos en muchos sistemas acuáticos. Modelos teóricos predicen que las bacterias están más estrechamente controladas por la depredación protista en sistemas altamente oligotróficos, mientras que su crecimiento está limitado por la competencia por los nutrientes en las aguas

más productivas. El crecimiento de los depredadores protistas está limitado por la baja disponibilidad de presas (Pernthaler 2005).

De los mecanismos biológicos implicados en la filtración lenta en arena, la depredación de las bacterias es el más importante. Se ha encontrado que la depredación por protozoos juega un rol importante en la eliminación de patógenos en aguas tratadas por filtros lentos de arena. En estudios previos se encontró que la cantidad de *Escherichia coli* disminuyó en el sobrenadante del agua durante la retención hidráulica. Esto fue atribuido al pastoreo por protozoos u otros predadores que migraron de la superficie del filtro (Guchi 2015).

Haig y colaboradores reportaron en el 2014 que la eliminación de *Escherichia coli* se debe principalmente a las interacciones tróficas, como el pastoreo por protozoarios como *Monosiga brevicollis* y *Tetrahymena* spp. y lisis viral por fagos.

También se ha demostrado que el pastoreo afecta indirectamente la estructura de la comunidad bacteriana por la disminución de bacterias y nutrientes mineralizados; por lo tanto, es menor la competencia por sustratos y nutrientes. El pastoreo por protozoos puede afectar la interacción entre bacterias y otros organismos en suelo. Por ejemplo, se encontraron protozoos para estimular la actividad viral en sistemas de agua dulce (Rønn et al. 2002).

### **2.3.3. Rendimiento de la filtración lenta en arena**

La filtración lenta en arena produce un efluente bajo en turbidez, libre de impurezas y más importante, virtualmente libre de bacterias, virus entéricos y protozoos (Tabla 2) (Guchi 2015).

Tabla 2. Eficiencia de tratamiento de los filtros lentos de arena <sup>1</sup>

<b>Parámetros de calidad del agua</b>	<b>Rendimiento o capacidad de remoción</b>	<b>Comentarios</b>
Bacterias entéricas	90-99.9%	Reducidas por bajas temperaturas; aumento de las tasas hidráulicas; camas de arena gruesas y poco profundas; altos niveles de contaminación del agua.
Virus entéricos	99-99.99%	A 20°C: 5 log a 0.2 mh <sup>-1</sup> y 3 log a 0.4 mh <sup>-1</sup> A 6°C: 3 log a 0.2 mh <sup>-1</sup> y 1 log a 0.4 mh <sup>-1</sup>
Quistes de <i>Giardia</i>	99-99.99%	Alta eficiencia de eliminación, incluso directamente después de la limpieza (eliminación de la piel del filtro).
<i>Cryptosporidium</i>	> 99.9%	Oocistos de <i>Cryptosporidium</i> . Estudios a escala piloto.
<i>Cercaria</i>	100%	Eliminación prácticamente completa.
Turbidez	< 1 UNT	El nivel de turbidez y la naturaleza y distribución de las partículas afecta la capacidad de tratamiento.
Pesticidas	0-100%	Afectados por la velocidad de biodegradación.
COD <sup>1</sup>	5-40%	Media alrededor de 16%. La eliminación parece ser específica del sitio y varía con agua sin tratar y O&M (Operación y Mantenimiento).
Absorbancia UV (254 nm)	5-35 %	Una ligera diferencia, pero no significativo en el tratamiento de las Fuentes de las tierras altas y tierras bajas. Media de 16-18%. Color asociado con material orgánica y ácidos húmicos.
Color verdadero	25-40%	Color asociado con material orgánico y ácidos húmicos. Media de 30%.
Absorbancia UV (400 nm)	15-80%	Media 34%, pero las fuentes de agua de las tierras altas 42% y tierras bajas 26%.

COT <sup>2</sup> ; DQO <sup>3</sup>	< 15-25%	Carbono orgánico total; demanda química de Oxígeno
COA	14-40%	Carbono orgánico asimilable. Media de 26%.
COBD	46-75%	Carbono orgánico biodegradable disuelto. Media de 60%
Hierro, manganeso	30-90%	Niveles Fe > 1 mg/l <sup>1</sup> reducen el funcionamiento del filtro.

<sup>1</sup>Tomado de Galvis et al. (2002).

#### 2.3.4. Limpieza del filtro lento de arena

Normalmente, el filtro funciona dentro de un rango de 30 a 60 días, pero se ha demostrado que la filtración lenta en arena puede llegar a funcionar hasta después de 100 días. El método tradicional de limpieza de filtros lentos de arena implica drenar el nivel de agua hasta justo debajo de la superficie de la arena y el escarpe de la parte superior de 1 ó 2 cm de la biopelícula (Guchi 2015).

La limpieza de la superficie de la arena se efectúa por raspado del lecho en su capa de arena a nivel superior (aproximadamente 5 cm de arena), lavado y almacenamiento de la arena, y la posterior reconstrucción del lecho filtrante (Torres y Villanueva 2014).

La eliminación de patógenos puede verse comprometida por un par de días después de la limpieza hasta que se reestablezca la madurez de la biopelícula. Sin embargo, en algunos casos la limpieza puede no tener efecto sobre la eficiencia del tratamiento (Guchi 2015). Para evitar esto se recomienda raspar una capa adicional de 5 cm del sistema de filtración, y disponerla encima del nuevo material, esto con el objetivo de acelerar la maduración del filtro de arena (Torres y Villanueva 2014).

## 2.4. Uso de metales como antimicrobianos

Se ha visto que el hierro (Fe), cobre (Cu) y latón tienen propiedades antimicrobianas debido a un efecto oligodinámico. Cuando los iones metálicos son liberados dentro de las células bacterianas, se unen al ADN, enzimas y proteínas celulares, causando una ruptura física de las estructuras celulares y disturbios en la permeabilidad y la respiración. Los iones metálicos dañan el ADN o las proteínas enzimáticas y causan la muerte de la célula (Yildiz 2016).

### 2.4.1. Cobre

Para muchos organismos, el oligoelemento cobre es un nutriente esencial. Sirve como cofactor en la respiración, por lo que se requiere para el metabolismo aerobio. Sin embargo, cuando el cobre se encuentra en exceso, es tóxico. Esto se debe a que la acumulación de iones de cobre o la liberación intracelular de iones de cobre de proteínas causan daño celular. Los iones de cobre inactivan proteínas dañando los grupos de Fe-S en hidratasa citoplasmáticas. En *Escherichia coli*, estas son dihidroxi-ácido-deshidratasa (IlvD) en la ruta de síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, isopropilmalato deshidratasa (LeuC) en la rama específica de leucina, fumarasa A (FumA) en el ciclo del ácido tricarbónico y 6-fosfogluconato deshidratasa en la vía de las pentosas fosfato. En *Bacillus subtilis*, la toxicidad por iones de cobre ha demostrado que interfiere con la biosíntesis de grupos de Fe-S e incrementa la producción de conjuntos de andamios y proteínas diana. *In vitro* la exposición del ADN a iones de cobre causa mutaciones (Santo et al. 2011).

Se ha visto que las superficies de cobre tienen una alta capacidad antimicrobiana llegando a eliminar diversas especies bacterianas como *E. coli* O157, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, y *Mycobacterium tuberculosis*. Esto debido a un mecanismo conocido como “muerte por contacto” (Mathews et al. 2013). En este mecanismo la toxicidad directa mediada por iones de cobre, apuntando a las enzimas metabólicas como hidrolasas implicadas en la síntesis de aminoácidos es poco probable que sea la razón de muerte por contacto debido a las



cinéticas rápidas de muerte. Además la suplementación extracelular con sustancias conocidas por proteger contra el estrés oxidativo, como la catalasa, superóxido dismutasa, o el radical hidroxilo manitol, retrasan la muerte de células de *E. coli* en las superficies secas de cobre. Mientras se tiene cierto conocimiento en el modo de acción molecular ejercido por los iones de cobre sobre las bacterias, los mecanismos de acción específicos del estrés ejercido por las superficies de cobre metálicas y la identidad de los blancos celulares sensibles todavía no se han aclarado (Santo et al. 2011).

En la actualidad existe mucho interés por el uso del cobre como material auto desinfectante, recientes publicaciones tratan aspectos mecánicos de la muerte por contacto llevada a cabo por el cobre. En diversos estudios se ha visto que los sistemas bacterianos de resistencia al cobre no ofrecen protección a la muerte por contacto, pero prolongan su supervivencia. Esto sugiere la participación de iones de cobre disueltos en el proceso de muerte. El nivel de los iones de cobre permanece elevados durante la fase de muerte, sugiriendo que las células se ven desbordadas por el cobre intracelular. Otro factor que influye en la supervivencia celular del cobre metálico es el estrés oxidativo. La generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) es mediada probablemente por el ciclo redox entre las tres diferentes especies de cobre, Cu(0), Cu(I), Cu(II). También se ha visto que el ADN es el principal blanco de la toxicidad del cobre, ocasionando una rápida fragmentación del ADN y muerte celular; sin embargo, recientemente se ha sugerido que el daño primario a la célula es a la membrana, por lo que es probable que el daño al ADN se produzca solamente como un evento secundario, después de la muerte celular. Hasta el momento, parece que la muerte por contacto procede por un daño sucesivo a la membrana, entrada de cobre a las células, daño oxidativo, muerte celular y degradación del ADN (Figura 1) (Grass et al. 2011).

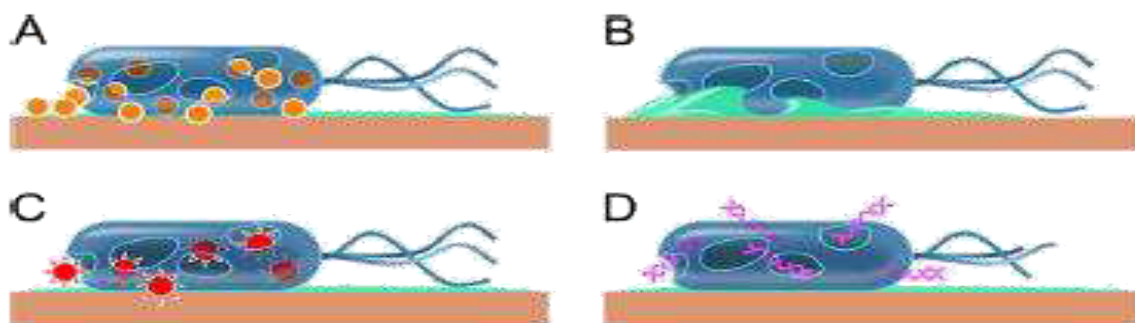


Figura 2. Eventos tentativos de la muerte por contacto. (A) El cobre se disuelve de la superficie de cobre y causa daño celular. (B) Ruptura de la membrana celular a causa del cobre y otros fenómenos de estrés, conlleva a una pérdida del potencial de membrana y el contenido citoplasmático. (C) Los iones de cobre inducen la generación de especies reactivas de oxígeno, que causan posterior daño celular. (D) El ADN genómico y plasmídico es degradado.

#### 2.4.2. Hierro

Para que un metal sea considerado como antimicrobiano deben de cumplirse dos condiciones: (1) que tenga una superficie redox activa bajo condiciones ambientales y (2) que libere iones tóxicos para las células. El potencial redox del  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  (-0.77 V) está en el rango del de cobre (-0.52 y -0.35 V) y la plata (-0.8 V) que son metales con actividad antimicrobiana. Es factible que esta química redox cause daño en la membrana celular (Mathews et al. 2013). Por lo que el mecanismo por el cual se da la actividad antimicrobiana es similar al del cobre.

Además se ha visto que los óxidos de hierro pueden remover e inactivar virus en agua, y a pesar de que el mecanismo no se conoce se ha sugerido que el proceso involucra la adsorción de las partículas virales a los óxidos de hierro por medio de atracciones electrostáticas. Esto es seguido por una inactivación de los virus adsorbidos debido a la fuerte fuerza de adhesión, que causa que el virus sea desintegrado o se convierta en no infectivo (You et al. 2005).

### 2.4.3. Zinc

El zinc ( $Zn^{+2}$ ) es un elemento esencial para los microorganismos y organismos superiores debido a que en bajas concentraciones participa en varias reacciones celulares que son vitales para el buen funcionamiento de la célula. También se ha comprobado que se encuentra involucrado en más de 300 reacciones enzimáticas como cofactor (Pasquet et al. 2014a)

Las células necesitan rangos óptimos de Zinc para actividades catalíticas y estructurales. La concentración de Zinc es regulada bajo condiciones fisiológicas por varios transportadores, de esta manera no es tóxico para las células. La homeostasis regula la entrada del Zinc a la célula, pero no controla la absorción a las membranas celulares. Un incremento de la concentración de Zinc por encima de los niveles óptimos ( $10^{-7}$  M y  $10^{-5}$  M dependiendo de la cepa bacteriana) perturba la homeostasis de  $Zn^{+2}$  y permite su entrada a las células, de esta manera el zinc comienza a ser citotóxico a una concentración por encima de  $10^{-4}$  M aproximadamente. De esta manera el Zinc ejerce su acción antimicrobiana.

Esta actividad antimicrobiana se puede explicar por dos mecanismos propuestos que conducen a la muerte celular: (i) una interacción directa con las membranas microbianas conllevan a una desestabilización de la misma e intensifican su permeabilidad; (ii) una interacción con los ácidos nucleicos y desactivación de enzimas (Pasquet et al. 2014b).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La falta de acceso a agua potable en las comunidades rurales es de gran preocupación a causa de los problemas de salud asociados. Debido a esto, es necesario implementar un sistema de saneamiento del agua que sea asequible, de bajo mantenimiento y con alta capacidad de remoción de enteropatógenos. Además de evaluar el efecto de la adición de acero, cobre y latón sobre la comunidad bacteriana presente en un sistema de filtración lenta en arena que permita mejorar su rendimiento.

#### **4. HIPÓTESIS**

La adición de acero, cobre y latón modifica la composición de la comunidad bacteriana presente en los filtros lentos de arena.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

- ✓ Evaluar el efecto de la adición de acero, cobre y latón sobre la comunidad bacteriana presente en un sistema de filtración lenta en arena.

### 5.2. Objetivos particulares

1. Diseñar e implementar filtros lentos de arena adicionados con los metales acero, cobre o latón.
2. Analizar y comparar el rendimiento de los filtros lentos de arena mediante análisis microbiológicos y fisicoquímicos.
3. Analizar la comunidad bacteriana presente en el *Schmutzdecke* de los filtros lentos de arena, cuando se encuentren en estado de maduración, mediante secuenciación por la plataforma MiSeq Illumina.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Diseño y construcción de los filtros lentos de arena.

#### 6.1.1. Entrada de agua a los filtros lentos de arena

Para el soporte de los filtros lentos de arena y el sistema de alimentación, se construyó una base de metal de 1.69 m de altura por 1.30 m de longitud y 0.40 m de ancho. El contenedor se colocó en la parte superior y a la altura de 0.33 se colocó una lámina para colocar la bandeja reguladora de nivel. Se colocaron tres rieles, el primero a los 0.33 m y los siguientes separados 0.4 m entre sí, para la instalación de abrazaderas que sostuvieron los filtros (Figura 3).

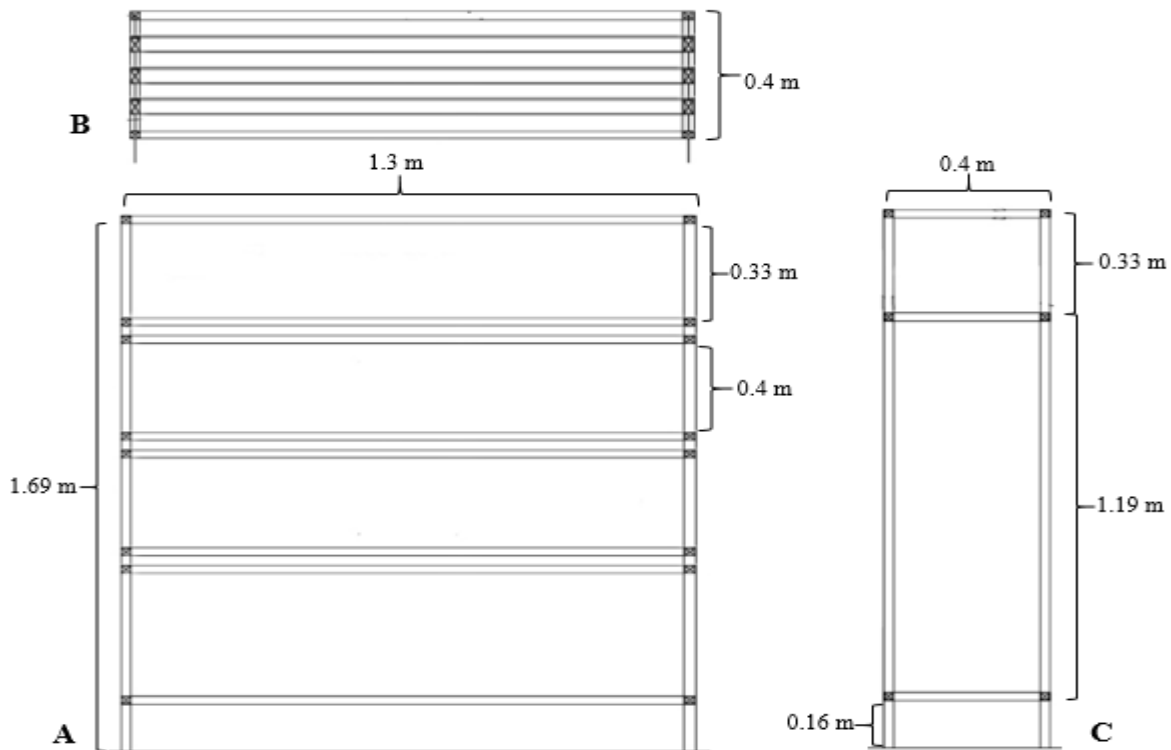


Figura 3. Diagrama de la base de metal utilizada como soporte del sistema de filtración lenta en arena. A. Vista frontal de la base. B. Vista desde arriba de la base. C. Vista lateral de la base.

El contenedor consistió en un bote rectangular, fabricado de polietileno de alta densidad (PEAD) grado alimenticio con capacidad de 50 L (Plastienvases, Edo de México, México), al cual se le realizó un orificio en la parte inferior para colocarle un adaptador macho de CPVC de  $\frac{3}{4}$  (Durman ®, Querétaro, México) de manera que la parte con rosca sobresaliera hacia el exterior para así añadirle un reductor de campana a  $\frac{1}{2}$ " con un niple que se conectó a una válvula de bola de PVC roscada de  $\frac{1}{2}$ " (LD, Taichung, Taiwan), a la cual se le unió un adaptador macho de CPVC de  $\frac{1}{2}$ " , una vez realizado esto se acopló un codo al adaptador macho con ayuda de un trozo pequeño de tubo de CPVC (todo de  $\frac{1}{2}$ " ), del otro lado del codo se acopla un tubo de CPVC de  $\frac{1}{2}$ " de 19 cm de largo al cual se le unió otro codo unido a un adaptador macho con ayuda de un trozo pequeño de tubo (todo de CPVC de  $\frac{1}{2}$ " ), del lado roscado del adaptador se unió un reductor Bushing galvanizado de  $\frac{1}{2}$ " a  $\frac{1}{4}$ " (Genérico) para conectarse a una válvula con flotador, que controló la entrada de agua a una bandeja de plástico colocada a la altura de inicio del sobrenadante de los filtros, encargada de regular el nivel de agua de los filtros al mismo tiempo. Se conectó a la bandeja un tubo de CPVC de  $\frac{1}{2}$ " de 105 cm de largo por medio de una TEE de  $\frac{1}{2}$ " (Durman ®, Querétaro, México), asegurada con sellador para evitar fugas de agua (Ceys, S.A. Barcelona, España). A este tubo se le conectaron seis válvulas de bola de PVC de  $\frac{1}{2}$ " para cada filtro, por medio de TEEs, codos y adaptadores machos todos de CPVC de  $\frac{1}{2}$ " a una distancia de 19 cm entre cada una. Cada válvula se unió a un filtro por medio de una perforación realizada a la altura del sobrenadante y se aseguró, por medio de un sellador, que no hubiera fugas (Figura 4).



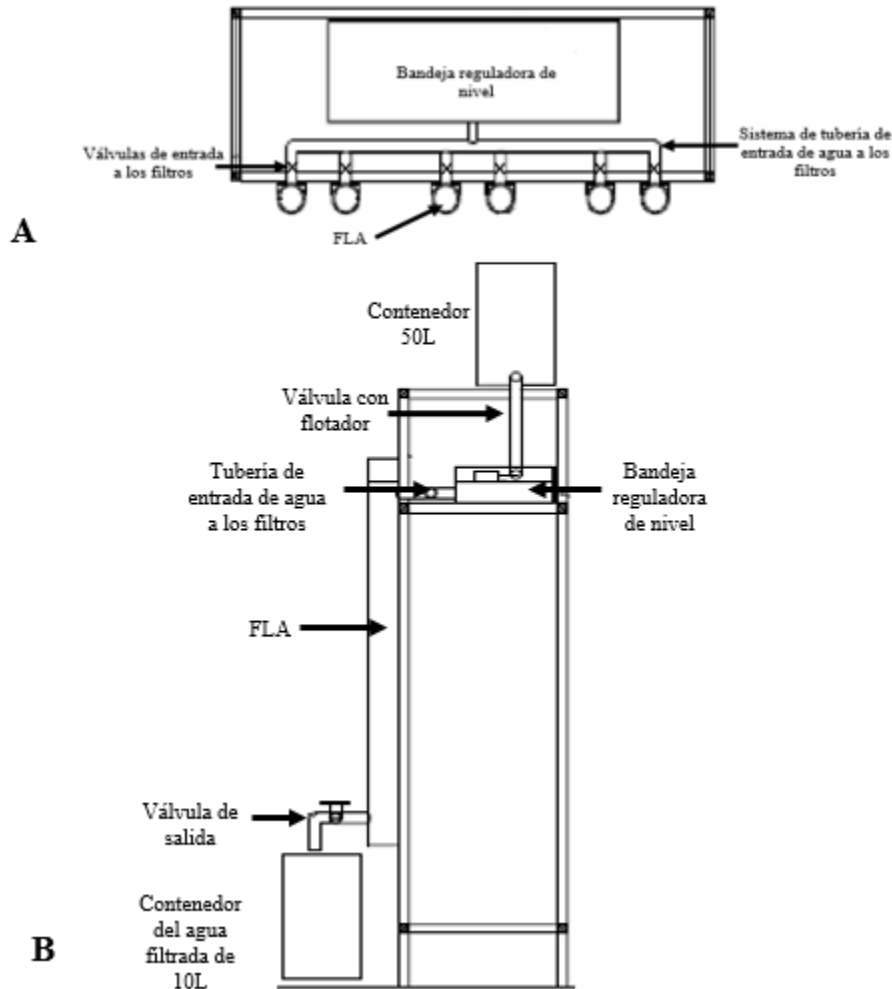


Figura 4. Diagrama del sistema de entrada de agua a los filtros lentos de arena. **A.** Vista desde arriba de la bandeja reguladora de nivel y el sistema de tubería. **B.** Vista lateral del sistema.

Se construyeron un total de seis filtros, esto con la finalidad de tener dos filtros de repuesto. Los filtros fueron construidos utilizando una manguera industrial de PVC transparente (Surtek Mega Store, Guadalajara, Jalisco) de 2" de diámetro por 1.10 m de alto, en la base del filtro se conectó un adaptador de inserción de poliducto de 2" que sirvió como tapón. Una vez construidos se colocaron en los rieles del soporte de metal, por medio de abrazaderas. La red de drenaje consistió en una TEE de CPVC de ½" con tapones unidos a sus extremos perforada de manera uniforme sobre toda su superficie, una vez limpia de los residuos de la perforación se unió a la salida del filtro por medio de un tubo de CPVC unido a un adaptador macho conectado a una válvula de bola de ½" .

La salida del filtro consistió en una válvula de bola de  $\frac{1}{2}$ " que se conecta a una válvula de aguja de  $\frac{1}{4}$ " (cnx válvulas, conexiones y accesorios, Guadalupe, N.L.), por medio de dos adaptadores machos, un codo (CPVC  $\frac{1}{2}$ " ), y una reducción de campana galvanizada de  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{1}{4}$ " (Mueller comercial ®, Monterrey, N.L.) esto con el fin de que la válvula de bola se utilice para el cierre total de la salida de agua del filtro, y la válvula de aguja para el control del flujo. Por último se ajustó la tasa de filtración a 0.1 m/h (Figura 5).

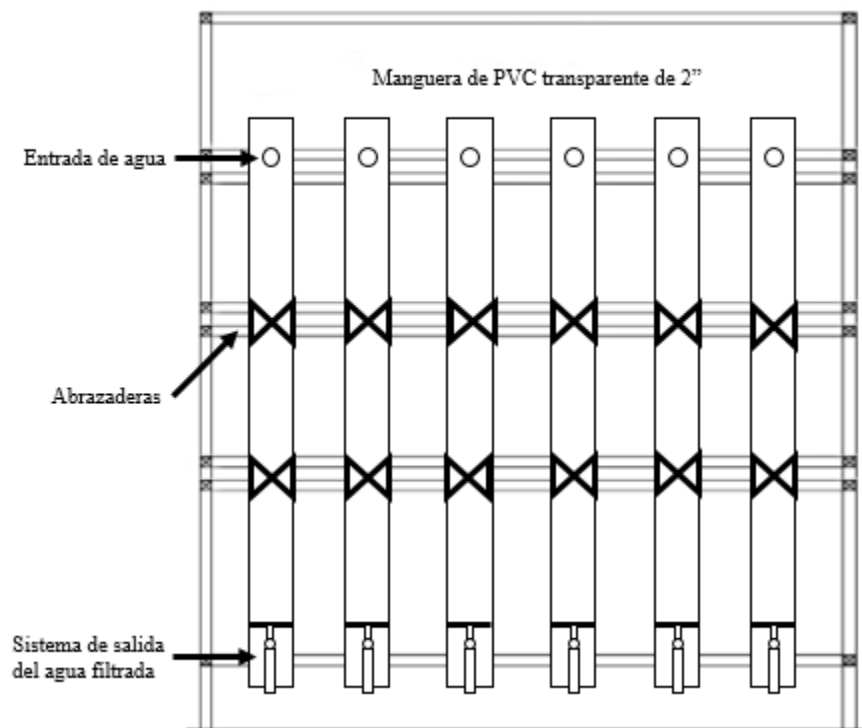


Figura 5. Diagrama de la vista frontal del sistema de filtración lenta en arena. Representación del ensamblaje de los filtros lentos de arena a la base de metal por medio de abrazaderas.

Ya instalados los filtros se procedió a llenarlos con los medios granulares.

Antes del llenado de los filtros, todo el material granular se cernió y se lavó con abundante agua para remover arcilla, limo fino y otras impurezas que pudiera contener. Para el cernido de la arena fina se utilizó un tamizador de acero inoxidable de 20 cm (tamaño de poro de 0.45 mm; IBILI, Guipúzcoa, España) y para la arena gruesa un tamiz de latón de 8" de diámetro con un tamaño de malla de 20 (0.85 mm; USA standard ASTM E-11). Una vez

lavada la arena y grava, se llenaron los filtros con agua de la llave hasta la mitad para prevenir la formación de bolsas de aire en el medio (Lea 2014). La disposición del material granular se realizó de la manera siguiente: primero se añadió la grava de un tamaño mayor a los orificios del sistema de drenaje hasta una altura de 0.05 cm para cubrir el drenaje en sus totalidad. Luego se añadió la arena gruesa de un grosor de 0.8 mm hasta una altura de 0.05 cm (Lea 2008). La última capa que se añadió fue arena fina de un tamaño de 0.4 mm hasta una altura de 0.6 m (Huisman et al. 1974; Bradley et al. 2011). Para el sobrenadante se llenaron los filtros hasta una altura de 0.35 m por encima de la cama de arena.

### **6.1.2. Adición de los distintos metales**

Se añadieron 0.253 g del metal (10% del volumen total del lecho de arena) mezclados perfectamente a través de los 20 cm superiores del lecho de arena (Bradley et al. 2011). El filtro número uno fue utilizado como control, por lo que no contenía ningún metal.

Para el filtro número dos se utilizaron clavos de acero (2 cm, 3 mm) (Casa Myers S.A, Chihuahua, Chih.), con un porcentaje de 98% de hierro. El filtro número tres contenía cobre en presentación de alambre grueso cortado en pedazos de 2 cm aproximadamente (99.9% Cu). Por último el filtro número cuatro contenía una aleación de cobre-zinc (68.5-71.5% Cu; 0.07% Pb; 0.05% Fe; 28.38-31.38% Zn) (Sommer, Chihuahua, Chih.) en presentación de lámina cortada en pedazos pequeños de aproximadamente 2 cm (Bradley et al. 2011).

### 6.1.3. Caracterización de la arena.

La caracterización de la arena se realizó de acuerdo a lo indicado en la NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

#### 6.1.3.1. Determinación de textura y plasticidad al tacto.

Se realizó un pequeño cúmulo de arena húmeda de manera manual y mediante la palpación y observación se determinó el tipo de textura.

Tabla 3. Determinación de textura y plasticidad.

<b>Tipo de textura</b>	<b>Características</b>
Arenosa	Suelo sólo puede ser amontonado en forma de pirámide.
Franco arenosa	Suelo puede ser moldeado en forma de esfera.
Franco limosa	Solo puede ser enrollado formando un cilindro grueso y corto.
Franca	Suelo puede ser enrollado formando un cilindro delgado y largo.
Franco arcillosa	Suelo forma un cilindro en “U”.
Arcillosa	Suelo forma un anillo.

### 6.1.3.2. Determinación de pH.

Se adicionaron 20 mL de agua destilada a 10 g de arena, la mezcla se agitó vigorosamente durante 5 min y se dejó reposar 30 min. Pasado este tiempo se procedió a medir el pH por medio de un potenciómetro (HANNA Instruments, Cd. México, México).

### 6.1.3.3. Determinación de densidad aparente, densidad real y porcentaje de porosidad.

Para la determinación de la densidad aparente primero se pesó una probeta de 50 mL y se anotó el peso ( $W_1$ ), después se adicionó la arena paulatinamente dando pequeños golpes en la probeta para compactar la muestra hasta aforarla a un volumen de 10 mL y se anotó el peso de la probeta con los 10 mL de arena ( $W_2$ ). Finalmente la densidad aparente se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad aparente (DA)} = \frac{w_2 - w_1}{\text{Vol. suelo}}$$

Para determinar la densidad real se pesó una probeta de 50 mL y se anotó el peso ( $W_1$ ), se adicionaron 25 mL de agua. A la probeta con los 10 mL de arena se le adicionó más arena hasta aforar a 25 mL, se anotó el peso de la probeta con los 25 mL de arena ( $W_2$ ). Posteriormente los 25 mL de arena ( $W_2$ ) se transfirieron lentamente a la probeta con los 25 mL de agua. Se dejó reposar y se midió el volumen desplazado. Se realizó el cálculo de la densidad real mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad real (DR)} = \frac{w_2 - w_1}{\text{Vo. desplazado por la arena}}$$

Una vez obtenida la densidad aparente y la densidad real, se determinó el porcentaje de porosidad de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de porosidad} = \left[ 100 \times \left( 1 - \frac{DA}{DR} \right) \right]$$

## **6.2. Análisis microbiológico y fisicoquímico del afluente y efluente de los filtros lentos de arena.**

### **6.2.1. Recolección de agua para llenado de los filtros.**

Se seleccionó a la presa Chihuahua como lugar de recolección de agua para filtrar (28°33'46.5"N 106°10'31.5"W). Se recolectaron ocho bidones con capacidad de 20 L (Plastienvases, México, Edo de México), de manera semanal. Para la toma de agua cada bidón se enjuagó tres veces para impregnarlo del agua a tomar, posteriormente se sumergió a una profundidad de 15 a 30 cm y se llenó hasta la marca de 20 L. Para aumentar el nivel de contaminación del agua con organismos coliformes totales y fecales y acelerar el proceso de maduración se adicionó 1% de agua del Río Sacramento de la ciudad de Chihuahua (28°39'40.9"N 106°03'58.3"W) al agua de la Presa (Jenkins et al. 2011). Para esto, se recolectaron 2 L de agua del río cada 15 días.

Una vez recolectada el agua los bidones se trasladaron hacia el laboratorio para el llenado del contenedor de agua. El gasto de agua por día de los filtros fue de aproximadamente 20 L, por lo que solamente se utilizó un bidón al día. Los bidones restantes se almacenaron a 4°C hasta su posterior utilización. Antes del llenado del contenedor con un bidón nuevo se aatemperó el agua dejándola 24 h a temperatura ambiente

### **6.2.2. Toma de muestras**

Para los análisis microbiológicos y fisicoquímicos, la toma de muestra se realizó de acuerdo a lo indicado en la NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM-014-SSA1-1993 "*Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados*".

Para análisis bacteriológicos del efluente, se limpió el orificio de salida con una torunda de algodón impregnada de solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 100 mg/l. Se dejó correr el agua aproximadamente 3 min o hasta asegurarse que el agua que

contenían las tuberías se había vaciada totalmente. Cerca del orificio de salida, se quitó el tapón del frasco para evitar su contaminación. Se procedió a tomar la muestra sin enjuagar el frasco, dejando un espacio libre para la agitación de la muestra previa al análisis (10% del volumen del frasco). Efectuada la toma de muestra se colocó el tapón al frasco.

Para análisis fisicoquímicos la toma de muestra fue igual al de los análisis bacteriológicos, solamente que sin limpiar el orificio de salida.

### **6.2.3. Análisis fisicoquímicos de las muestras de agua**

Los análisis fisicoquímicos se mandaron a realizar en el laboratorio de Química IV de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos de manera semanal, determinando pH, turbidez y sólidos disueltos totales (SDT) (Haig et al. 2014a; Pfannes et al. 2015).

### **6.2.4. Análisis microbiológicos de las muestras de agua**

El análisis microbiológico del afluente y efluentes de los filtros se realizó mediante la técnica del NMP descrita en la norma NMX-AA-042-SCFI-2015 “*Análisis de agua - enumeración de organismos Coliformes totales, organismos Coliformes fecales (termotolerantes) y Escherichia coli – método del número más probable en tubos múltiples*”.

#### **6.2.4.1. Prueba presuntiva**

Para la inoculación se agitaron las muestras con movimientos de arriba hacia abajo, de derecha a izquierda y formando un número ocho; en 8 movimientos de cada uno, se colocaron 1, 0.1 y 0.01 mL de muestra en serie de tres tubos cada uno en 10 ml de caldo lactosado (Becton, Dickinson and Company, Bioxon, México, DF.) a concentración sencilla y se incubaron a 35°C, se examinó el crecimiento a las 18 y 24 h, si se presentaba

turbidez debido al crecimiento bacteriano y formación de gas en la campana de Durham. Los tubos que no presentaron estos cambios se reincubaron hasta cumplir las 48 h para detectar reacciones positivas tardías.

#### **6.2.4.2. Prueba confirmativa**

Los tubos con medio de aislamiento con muestras positivas se resembraron en un número igual de tubos con medio de confirmación, caldo bilis lactosa verde brillante (Becton) para coliformes totales, se incubaron a 37°C durante 48 h. Para confirmar la presencia de coliformes fecales termo-tolerantes la inoculación de los tubos positivos se llevó a cabo en caldo EC (Becton), incubados a 44°C por 24 h. En ambos medios se examinó nuevamente la presencia de turbidez y la producción de gas en las campanas de Durham. La determinación del índice del número más probable por 100 mL de muestra y el límite confiable de 95% se realizó mediante el cálculo con la siguiente fórmula:

$$NMP / 100 ml = \frac{10}{V} \times F (NMP/100 mL)$$

Dónde:

F= Valor de tablas NMP/mL, este se obtiene de la combinación de tubos positivos y negativos donde se tengan todos los tubos positivos en una misma dilución y las 2 diluciones posteriores a esa combinación.

V= volumen mayor de muestra.

10= factor de dilución.



### **6.2.4.3. Determinación de eficiencia de remoción de coliformes totales.**

La determinación de la eficiencia en la remoción de coliformes se efectuó mediante el cálculo del porcentaje en reducción bacteriana de organismos coliformes totales de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-244-SSA1-2008, que indica los requisitos sanitarios y características que deben cumplir los equipos y sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua. El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% RBCT = \frac{(coliformes\ totales)_{APST} - (coliformes\ totales)_{APT}}{(coliformes\ totales)_{APST}} \times 100$$

En donde:

% RBCT. Porcentaje en reducción bacteriana de organismos coliformes totales.

(Coliformes totales) APST. Cuenta de organismos coliformes totales en NMP/100 mL de agua sin tratar.

(Coliformes totales) APT. Cuenta de organismos coliformes totales en NMP/100 mL de agua tratada.

## **6.3. Análisis de la comunidad bacteriana presente en los filtros lentos de arena.**

### **6.3.1. Obtención de las muestras**

Las muestras se tomaron a la semana 16 del inicio de operación de los filtros debido a que los filtros ya se encontraban maduros. Para el análisis del *Schmutzdecke* se tomaron 5 g de los primeros 5 cm del lecho de arena (peso seco) de cada uno de los filtros con un descorazonador de metal estéril (Tramontina, Huixquilucan, Edo. De México). La muestra se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización (Zhou et al. 1996; Calvo-bado et al. 2003).

### 6.3.2. Extracción de ADN del *Schmutzdecke*

Las muestras del *Schmutzdecke* fueron mezcladas con 13.5 mL de Buffer de extracción de ADN (Tris-HCl [pH 8.0] 100mM; USB, Clevelando, Ohio, EDTA de sodio [pH 8.0] 100 mM; Laboratorios LAITZ S.A., México, D.F., fosfato de sodio [pH 8.0] 100 mM, NaCl 1.5 M, CTAB 1%, -Sigma-Aldrich Química, S.L., Toluca, México-) y 50 µL de proteinasa K (10 mg/mL; Invitrogen™ Carlsbad, CA, EUA) en tubos Falcon de 50 mL por agitación a 225 rpm durante 30 min a 37°C. Después del tratamiento de agitación, 1.5 mL de SDS al 20% fueron añadidos, y las muestras fueron incubadas en un baño María a 65°C durante 2 h con inversiones suaves de extremo a extremo cada 15 o 20 min. Los sobrenadantes fueron recolectados después de una centrifugación a 6,000 x g durante 10 min a temperatura ambiente y se transfirieron a tubos Falcon limpios de 50 mL. Los pellets se extrajeron dos veces más mediante la adición de 4.5 mL del buffer de extracción y 0.5 mL de SDS al 20%, vórtex (Thermolyne©, Proveedor Científico, S.A., Ciudad de México) durante 10 s, incubando a 65°C durante 10 min, y centrifugando como antes. Los sobrenadantes de los tres ciclos de extracción fueron combinados y mezclados con un volumen igual de cloroformo-álcohol-isoamílico (24:1, vol/vol; Sigma-Aldrich Química, S.L., Toluca, México). La fase acuosa fue recuperada por centrifugación y se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol (Sigma-Aldrich Química) durante toda la noche a -20°C. El sedimento de ácidos nucleicos crudo se obtuvo por centrifugación a 16,000 x g durante 3 min a temperatura ambiente, se lavó con etanol frío al 70% (Jalmek Científica S.A. de C.V., San Nicolás de los Garza, N.L.), y se resuspendió en agua desionizada estéril, para dar un volumen final de 200 µL (Zhou et al. 1996).

### **6.3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%**

Para comprobar la presencia e integridad del ADN extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, de la siguiente manera.

Se disolvieron 0.3 g de agarosa (Sigma-Aldrich Química) en buffer TBE 1X y se disolvió en un horno de microondas, se le adicionaron 3  $\mu$ L de bromuro de etidio 1X (1mg/mL) y se vació la agarosa en el portagel, se colocó el peine y se dejó polimerizar 30 minutos. Se llenó la cámara de electroforesis (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, UUA), con buffer TBE 1X hasta la marca indicada. Se colocó el gel dentro de la cámara y se cargó cada pozo con 4 $\mu$ L de muestra y 2 $\mu$ L de buffer de carga 5X previamente mezclados.

Se corrió el gel a 70 volts durante 60 min para finalmente visualizarse en el transiluminador UV GelLogic 200 (Eastman Kodak Company, NY, USA) con ayuda del programa KODAK 1D 3.6.

### **6.3.5. Purificación y cuantificación del ADN.**

Las muestras de ADN fueron purificadas mediante el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V., Monterrey, N.L.) de acuerdo a lo especificado en su protocolo.

Una vez purificadas las muestras, fueron cuantificadas por medio de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000-UV-Vis (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

### **6.3.8. Secuenciación.**

Las muestras de ADN purificadas se enviaron a la empresa Macrogen Inc. (Macrogen Inc., Seoul, Rep. De Korea), para la amplificación “*paired-end*” del gen 16S rRNA bacteriano mediante la plataforma MiSeq de Illumina.

El proceso experimental que se realizaron se muestra resumido en la figura 6.



Figura 6. Pasos del proceso experimental utilizado por Illumina NGS.

El flujo de trabajo empleado en la plataforma de Illumina NGS incluye cuatro pasos:

1. Preparación de la muestra.

Se realizó el control de calidad (CC) de las muestras de ADN, después se procedió con la construcción de la librería.

2. Construcción de la librería.

La biblioteca de secuenciación se preparó mediante la fragmentación aleatoria de la muestra de ADN, seguido por la ligación del adaptador 5' y 3'. Los fragmentos ligados al adaptador se amplificaron por PCR y se purificaron por medio de gel.

3. Secuenciación.

Para la generación de clúster, la librería se cargó en una célula de flujo en donde los fragmentos se capturaron en un césped de oligonucleótidos unidos a la superficie que son complementarios a los adaptadores de la librería. A continuación, cada fragmento fue amplificado en distintos clústeres clonales a través de una amplificación en puente. Cuando se completa la generación de clústeres, las plantillas se analizaron por secuenciación.

4. Datos sin filtrar (Raw Data).

Los datos de la secuenciación se convirtieron en datos sin filtrar para el análisis.

La plataforma Miseq de Illumina genera imágenes en bruto utilizando el Software MCS (MiSeq Control Software v2.2) para el control del sistema y llamada básica a través de un software de análisis primario integrado llamado RTA (Real Time Analysis, v1.18). El

binario BCL (llamadas base) se convierte en FASTQ utilizando el paquete illumina bcl2fastq (v.8.4).

### **6.3.9. Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas se analizaron por medio del programa bioinformático QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology v.1.9.1-20150604).

Una vez obtenidas las secuencias se realizó el análisis bioinformático, para esto, se siguió el tutorial mostrado en la página de internet de QIIME (<http://www.qiime.org>) mediante los siguientes pasos generales:

1. Generación y validación del archivo de mapeo (Mapping file).

Este archivo contiene todos los metadatos por muestra. Como mínimo, debe contener el nombre de cada muestra, la secuencia del adaptador utilizado en cada muestra y la secuencia de los oligonucleótidos (Forward) utilizados para amplificar las muestras.

Una vez que se realizó el archivo de mapeo se validó para ver si se realizó de la manera correcta y no contenía errores.

2. Recolección de OTUs (*Operational Taxonomic Units*).

Con esto se llevaron a cabo una serie de análisis:

- a. Recolección de OTUs: todas las secuencias de todas las muestras se agruparon en unidades taxonómicas operacionales basadas en el método de agrupación PyNAST y el límite de similitud de secuencia de 97%.
- b. Selección de un conjunto de secuencias representativas, una secuencia, la más abundante, por OTU: Esta secuencia representativa se utilizó para la identificación taxonómica del OTU y para la alineación filogenética.
- c. Asignación de taxonomías a las secuencias representativas: Las secuencias fueron comparadas con bases de datos establecidas para definir las identidades taxonómicas, por medio del sistema de clasificación de Máxima verosimilitud.

- d. Construcción de una tabla de OTU: Utilizando el mapa de OTU y las asignaciones taxonómicas se ensambló una matriz de abundancia de OTU en cada muestra con identificadores taxonómicos significativos para cada OTU.

#### **6.4. Análisis estadístico**

Para los análisis fisicoquímicos se realizó un análisis de ANOVA de una vía, esto con el fin de determinar si había una diferencia significativa entre los tratamientos (control, acero, cobre y latón).

Para el análisis de coliformes totales y fecales los valores obtenidos se transformaron a unidades  $\text{Log}^{10}$  y se calculó la reducción de ciclos logarítmicos en cada tratamiento (control, acero, cobre y latón), posteriormente, se realizaron análisis de ANOVA de una vía, considerando tiempo de muestreo y tratamientos. Las variables dependientes fueron la reducción de ciclos logarítmicos en cada uno de los datos. Esto con el fin de observar si existe diferencia significativa entre tratamientos y con respecto al filtro control.

Con el fin de determinar si factores como la toma de muestra de la biopelícula afectaron de manera significativa los resultados de coliformes totales y fecales, se realizó un análisis de Covarianza.

Todos estos análisis se realizaron por medio del programa SPSS v.22 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Diseño y construcción de los filtros lentos de arena.

Se construyó un sistema de filtración lenta en arena, que consistió en seis filtros (cuatro en funcionamiento y dos de repuesto) conectados a la misma fuente de agua por medio de un sistema de alimentación que consistió en una bandeja reguladora de nivel de agua, una válvula con flotador y un tubo de CPVC (1/2") ensamblado a cada filtro por medio de válvulas de bola (1/2"), esto con el fin de que el sobrenadante de los filtros siempre se mantuvieran en el mismo nivel y evitar el derrame de agua. Todo el sistema de filtración se montó sobre una base de metal construida especialmente para este fin. El flujo fue ajustado a 0.1 m/h (3.3 mL/min) por medio de una válvula de aguja y el agua filtrada fue recolectada en contenedores de polietileno con capacidad de 10 L (Figura 2).

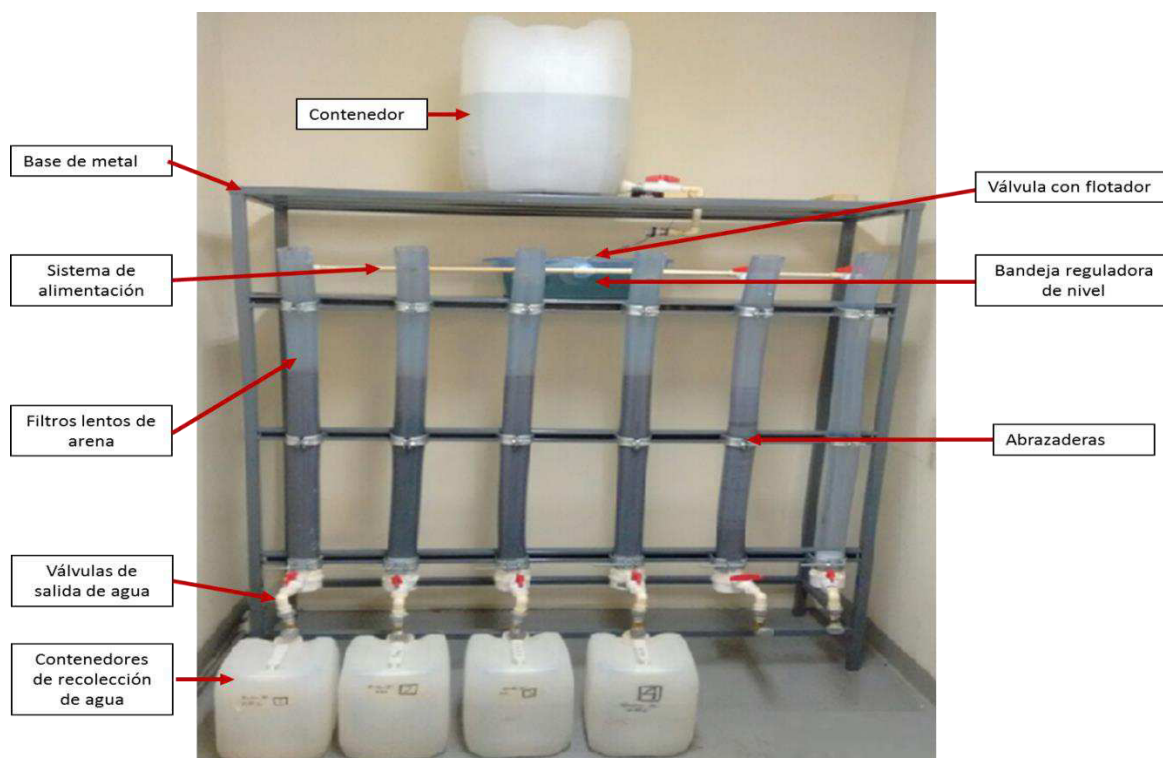


Figura 7. Sistema de filtración lenta en arena.

### 7.1.1. Caracterización de la arena.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de la arena utilizada en los filtros lentos de arena se muestran en la tabla 5.

Tabla 4. Resultados de la caracterización de la arena utilizada en el experimento.

<b>Características</b>	<b>Resultado</b>
Textura	Suelo arenoso
Densidad aparente	1.41 g/mL
Densidad real	2 g/mL
Porcentaje de porosidad	30%
pH	8.57

Como se puede observar el suelo utilizado es arenoso, lo que indica que tiene un porcentaje de arena  $\geq$  a 85% y  $\leq$  al 15% de limo y arcilla (Gisbert et al. 2009). Por lo que el agua pasará por el lecho de arena sin que sea retenida, además de que el lecho posee un buen drenaje y aireación (Rucks et. al. 2004).

En cuanto a la densidad aparente se considera que un valor ideal se encuentra entre 1.2 – 1.3 g/mL. En el suelo estudiado se obtuvo un valor de 1.41 g/mL, esto es debido a que los suelos arenosos tienden a tener un valor más alto ya que las partículas de arena están en íntimo contacto debido a que tienen bajo contenido de materia orgánica (Casanova 2005). La densidad real tuvo un valor de 2 g/ml indicando que los minerales más abundantes en la arena son silicatos, por lo que concuerda con el material granular utilizado ya que la arena está compuesta principalmente por sílice. (Thompson y Troeh 1998).

Mediante los datos obtenidos de la densidad aparente y real, se realizó el cálculo de la porosidad que se expresa como el porcentaje de volumen del suelo que está ocupado por poros. Por lo que en el suelo estudiado el 30% corresponde al volumen que no está ocupado por sólidos. Esta porosidad obtenida es baja y concuerda con la textura arenosa obtenida, ya que cuando la porosidad es muy grande indica que es un suelo arcilloso, en cambio cuando



es menor indica que es un suelo arenoso. Esto se explica porque en texturas arenosas el tamaño de poro es más grande que en texturas arcillosas (Rucks et al. 2004; Flores y Alcalá 2010). Debido a que el tamaño de poro es más grande el agua pasará libremente por el lecho de arena y habrá más aireación por lo que se beneficia la actividad de microorganismos.

## **7.2. Rendimiento de los filtros lentos de arena.**

### **7.2.1. Análisis fisicoquímicos.**

El análisis de los parámetros de calidad del agua y el rendimiento de cada uno de los filtros mostró que el agua filtrada se encontró siempre dentro de los límites máximos permisibles, además de que se mejoró la calidad del agua.

En cuanto al pH se observó que aumentó con respecto al afluente obteniendo un pH de 8.32 para el control, 8.28 acero, 8.35 cobre y 8.37 y latón (Figura 7). Este aumento pudo deberse a que el pH de la arena utilizada en los filtros es alcalino (8.57), por lo que al entrar en contacto el agua del afluente que tenía un pH de 7.89 con la arena el pH aumentó un poco. Sin embargo a pesar de este aumento, los valores se encuentran dentro del límite máximo permisible indicado en la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, que establece que el agua para uso y consumo humano debe de estar en un rango de 6.6 a 8.5. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ).

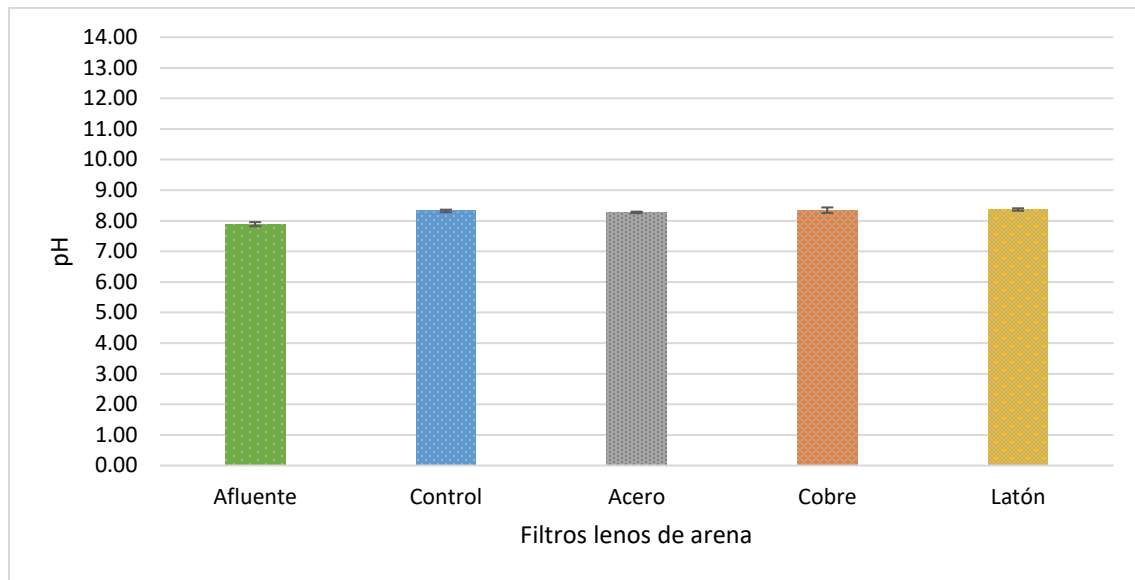


Figura 8. Valores de pH del afluente y los efluentes de cada uno de los filtros lentos de arena.

La turbidez del afluente osciló entre 0.98 a 7.45 UNT, obteniendo un promedio de 2.19 UNT. Los efluentes de los filtros tuvieron un promedio de 1.68, 1.38, 1.27 y 1.15 UNT para el control, acero, cobre y latón, respectivamente. Se redujo la turbidez en todos los filtros lentos de arena y se obtuvo una mayor remoción en los filtros añadidos con metales con respecto al control (Figura 8), esto pudo deberse a que los filtros que contienen metales al interactuar con los sulfatos presentes en el afluente producen coagulantes, que se unen a la materia orgánica presente en el agua, causando su floculación y coagulación, disminuyendo de esta manera la turbidez, o a la formación de precipitados de los metales que pudieron unirse a la materia orgánica causando que no se filtrara (Jiang y Graham 1998; Liu et al. 2007) . Sin embargo este aumento no fue significativo ( $P > 0.05$ ). La disminución en la turbidez en todos los filtros probablemente se debió a que al madurar los filtros lentos de arena, la biopelícula formada en la superficie y entre los granos de la arena atrapa a las partículas sólidas contenidas en el agua (Elliott et al. 2008; Bagundol et al. 2013).

A pesar de observar una disminución en los valores de turbidez en todos los filtros lentos de arena, estos no son tan altos como los reportados por Pfannes et al. en el 2015 (>70%); Bagundol et al. en el 2013 (99.9%); Duke et al. en el 2006 (85.5%) y Elliott et al. en el 2008 (74.9%). Esta menor efectividad puede atribuirse a que estos autores emplearon arena

de menor tamaño que la utilizada en este trabajo (0.45 mm), favoreciendo la retención de partículas más pequeñas. Sin embargo, los valores de turbidez obtenidos en los diferentes filtros de arena son menores a los recomendados por la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, que establece un valor máximo de 5 UNT en aguas para consumo.

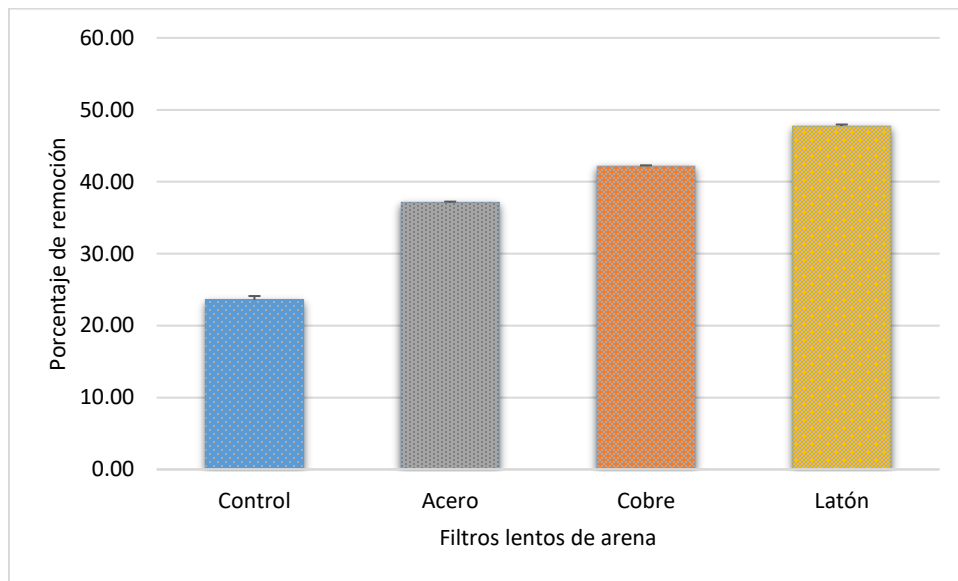


Figura 9. Porcentaje de remoción de turbidez (UNT) de cada uno de los filtros lentos de arena. Control 17.27%; Acero 37.32 %; Cobre 36.09 %; Latón 41.44 %.

En lo referente a los sólidos disueltos totales (SDT) se observó que todos los filtros aumentaron sus valores con respecto al afluente, esto se puede asociar a que una vez formado y estabilizado el *schmutzdecke*, los microorganismos que se encuentran en él desintegran y consumen las partículas provenientes del afluente, formándolas en material celular. El cual es asimilado por otros microorganismos y convertido en materia inorgánica como agua, CO<sub>2</sub>, nitratos, fosfatos y sales similares (Huisman y Wood 1974). Todos estos compuestos inorgánicos son sólidos disueltos, por lo que se da un aumento en el efluente de cada uno de los filtros (Figura 9). A pesar del aumento de los SDT, estos no exceden los valores recomendados para buenas propiedades organolépticas del agua (500 mg/L) (Jiménez 2001). La diferencia de sólidos disueltos totales entre los filtros no fue significativa ( $P > 0.05$ ).

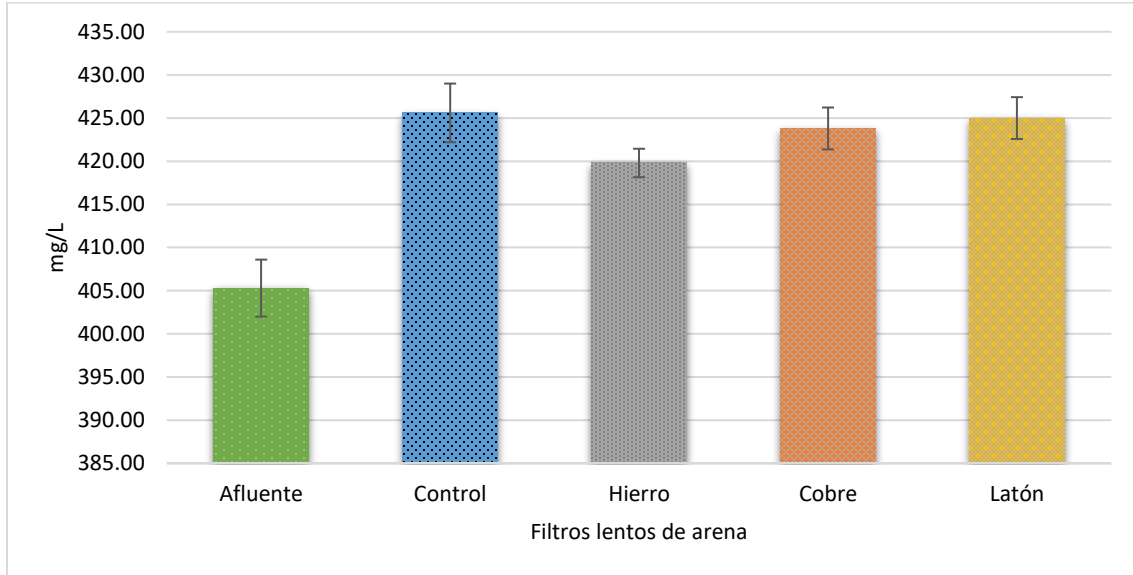


Figura 10. Valores de los Sólidos disueltos totales (SDT) del afluente y efluentes de los filtros lentos de arena.

### 7.2.2. Análisis microbiológicos

El análisis del número más probable (NMP) se realizó hasta la semana 24 de funcionamiento de los filtros lentos de arena.

Los resultados obtenidos de coliformes totales y fecales en NMP/100 mL se convirtieron a logaritmo base 10 para normalizar los datos. En las primeras cuatro semanas de operación de los filtros lentos de arena se obtuvieron bajas cantidades de coliformes, esto debido a que durante este periodo solamente se utilizó agua de la Presa Chihuahua como afluente. Debido a esto en la semana cinco se decidió agregar 1% de agua del Río Sacramento ( $\geq 2400$  NMP/100 mL) al agua de la Presa para de esta manera aumentar la carga microbiana y acelerar el tiempo de maduración de los filtros lentos de arena (Elliott et al. 2008; Jenkins et al. 2011). Por lo cual se empezó a contar como semana uno de estudio el momento en el que se inoculó el agua del Río Sacramento. Al hacer esto se observó que aumentó la cantidad de coliformes totales y fecales (Figura 10A y 10B). También se pudo observar que aun cuando hay una disminución tanto de bacterias coliformes totales y fecales en el agua

filtrada, los valores están por encima del límite máximo permisible indicado en la NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización (2 NMP/100 mL ó 0.3 NMP/100mL en logaritmo para coliformes totales y 0 NMP/100 mL para coliformes fecales). Por lo que el agua filtrada no es apta para consumo humano. No obstante, los valores de coliformes fecales estuvieron por debajo de lo permitido en la NORMA Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (2000 NMP/100 mL ó 3.3 NMP/100 mL en logaritmo) en todos los filtros. Por lo que pueden ser utilizados como un tratamiento de agua de deshecho y ser vertidos en cuerpos de agua naturales sin generar contaminación fecal.

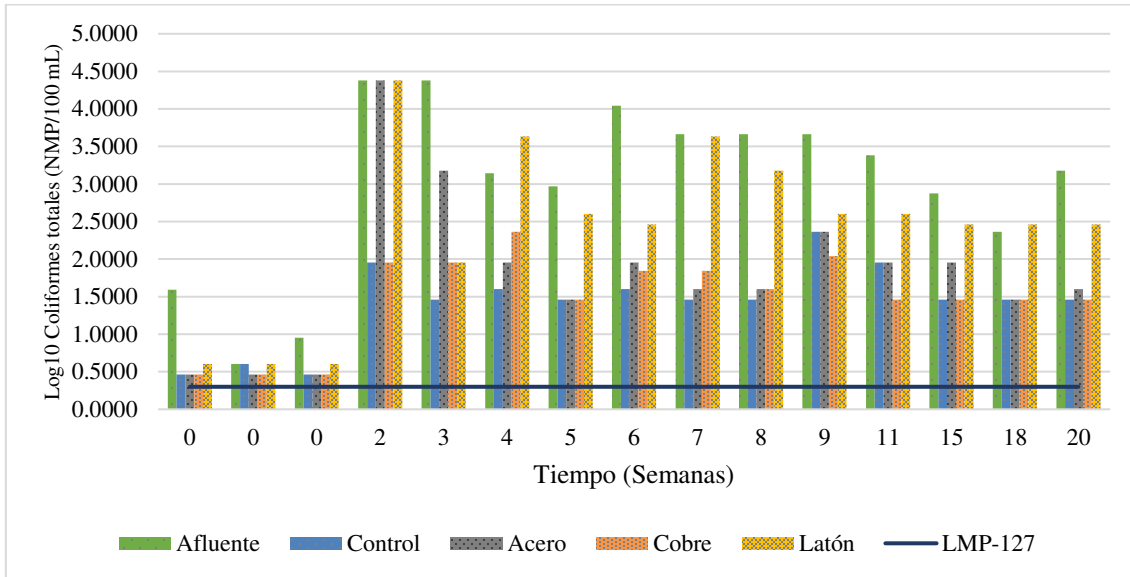
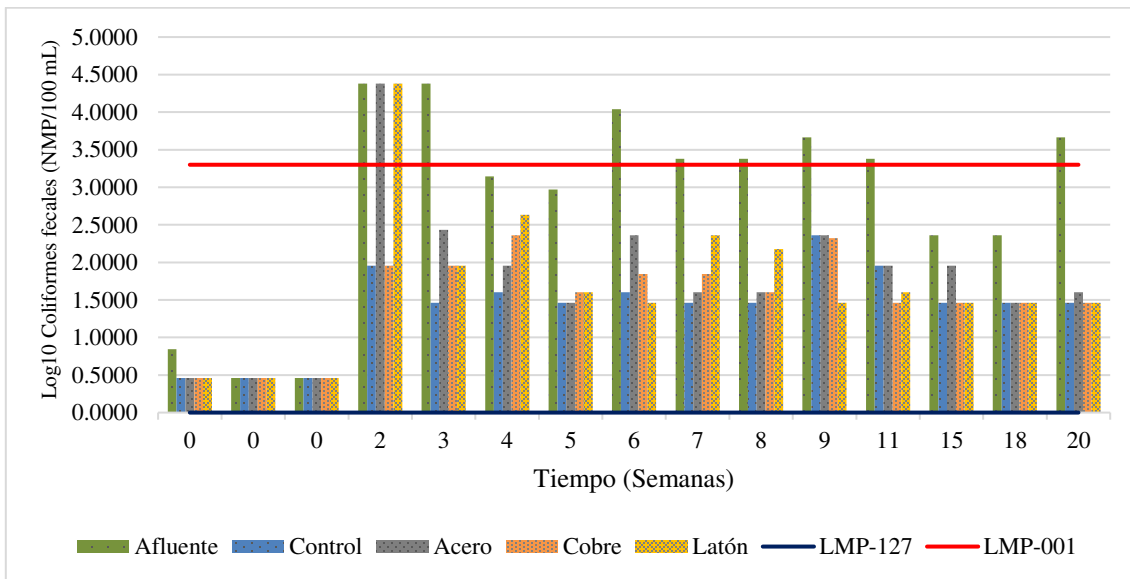
**A****B**

Figura 11. Coliformes totales y fecales expresadas en logaritmo base 10, **A)** Coliformes totales. **B)** Coliformes fecales. La línea de color rojo indica el límite máximo permisible descrito en la NOM-127-SSA1-1994. La línea de color verde indica el límite máximo permisible descrito en la NOM-001-ECOL-1996.

Al agregar agua del Río Sacramento ( $\geq 2400$  NMP/100 mL) al agua de la Presa se observó que en la semana dos aún había una remoción variada en los filtros lentos de arena, ya que se necesitan varios días para que los microorganismos presentes en el *Schmutzdecke* se adapten a la nueva fuente de agua (Lea 2008). Sin embargo a partir de la semana tres se observó que la remoción de organismos coliformes totales fue mayor al 90% (con excepción del filtro añadido con cobre y el añadido con latón en la semana 4 que presentaron una remoción del 83.5 y 69%, respectivamente, y todos los filtros en la semana 18), indicando que la maduración de cada uno de los filtros lentos de arena fue en esta semana (Farooq y Ai-yousef 1994; Bauer et al. 2011).

En la semana 18 se observa un decremento en el porcentaje de remoción en todos los filtros (87.39%), debido a que en la semana 16 se realizó la extracción de una parte del *Schmutzdecke* para su análisis, causando que la comunidad microbiana restante se desestabilizara y tardara unos días en volver a adaptarse, como se puede observar en la semana 20 que la remoción aumenta hasta  $> 95\%$  en todos los filtros (Figura 12), sin embargo, la toma de muestra del *Schmutzdecke* no afectó de manera significativa los valores de coliformes totales ( $P > 0.05$ ).

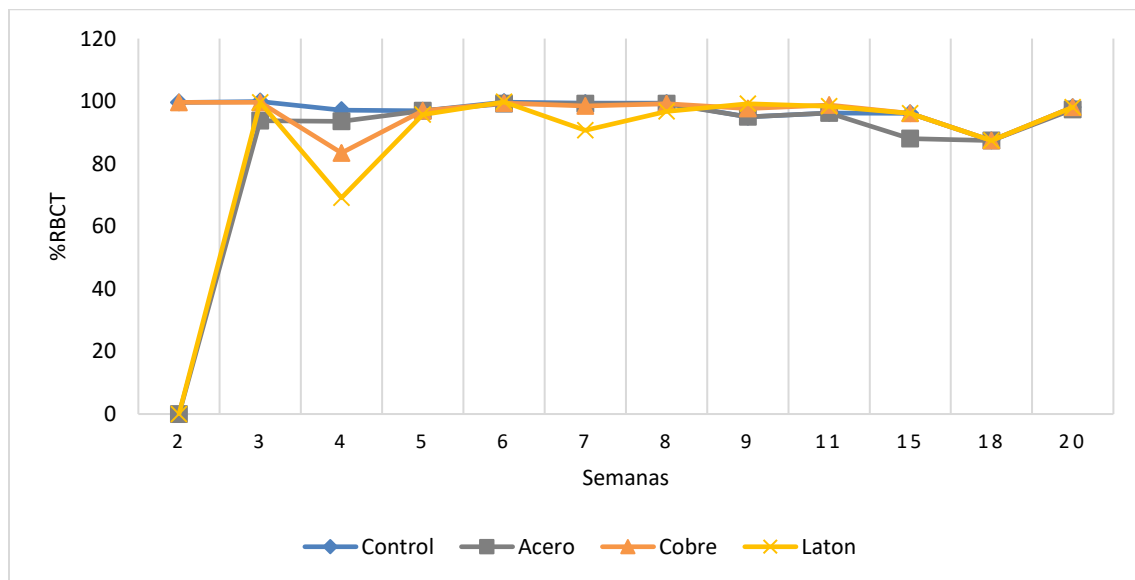


Figura 12. Porcentaje de remoción de organismos coliformes totales de cada uno de los filtros lentos de arena, a través del tiempo.

En promedio la eficiencia de remoción fue de un 96.8% para el filtro control; 95.05% acero; 95.9% cobre y 93.7% latón (Figura 13). Se obtuvieron resultados muy similares a los reportados por Jenkins y colaboradores., que tuvieron una remoción del 98.5%. Para coliformes totales los resultados se asemejan a los obtenidos por D'Alessio y colaboradores, con más del 99% de remoción.

Al realizar el análisis estadístico se observó que no hay diferencia significativa entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Por lo que, la adición de los metales no ayuda de manera significativa a mejorar el rendimiento de los filtros lentos de arena.

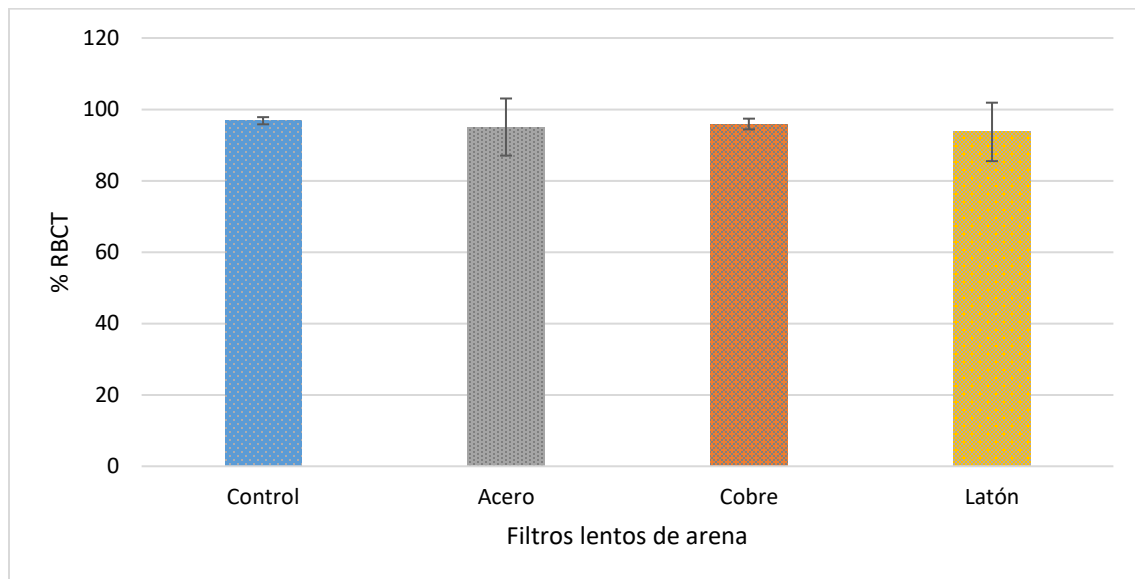


Figura 12. Porcentaje final de remoción de organismos coliformes totales de cada uno de los filtros.



### 7.3. Análisis de la comunidad bacteriana

#### 7.3.1. Extracción y cuantificación de ADN.

Al realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 1% se observó la presencia de bandas en la parte superior del gel indicando la presencia de ADN en cada una de las muestras (Figura 14).

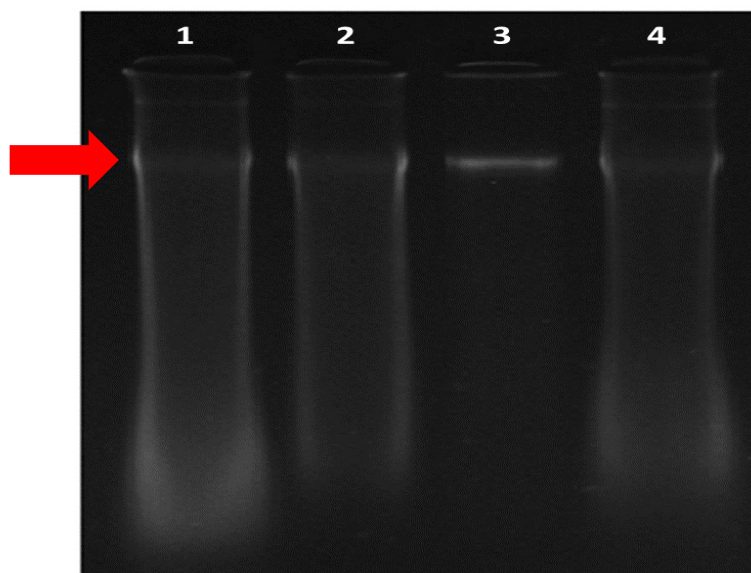


Figura 13. ADN del *Schmutzdecke* de cada uno de los filtros lentos de arena. La flecha de color rojo indica la presencia de ADN genómico. Carril 1, Control; Carril 2, Acero; Carril 3, Cobre; Carril 4, Latón.

Una vez obtenidas las muestras de ADN, se cuantificaron por medio de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000-UV-Vis (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) (Tabla 5).

Tabla 5. Cuantificación de ADN de las muestras del *Schmutzdecke* de cada uno de los FLA.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>A 260/280</b>
Control	386.57	1.73
Acero	292	1.62
Cobre	331.13	1.85
Latón	381.32	1.71

Debido a que el ratio de A260/280 se encontraba por debajo del valor de 1.8 (a excepción del Cobre) el ADN obtenido no es de buena calidad, por lo que se procedió a purificar las muestras y a cuantificarlas de nuevo (Tabla 6).

Tabla 6. Cuantificación de ADN de las muestras del *Schmutzdecke* de cada uno de los FLA después de su purificación.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (ng/μl)</b>	<b>A 260/280</b>
Control	12.3	1.92
Acero	16.5	1.97
Cobre	17.1	2.07
Latón	14	1.8

Después de la purificación disminuyó la concentración de ADN, sin embargo, se obtuvo la cantidad requerida para el análisis por MacroGen Inc (> 6 ng/μL), además, se mejoró la calidad del ADN ya que se encontró dentro del rango de 1.8-2.0 del ratio 260/280.

Una vez obtenida una buena calidad y suficiente concentración de ADN, se enviaron las muestras a la empresa MacroGen Inc. para su posterior análisis. Para una identificación más sencilla de las muestras enviadas, éstas se renombraron de la siguiente manera: MGA1 (control), MGA2 (acero), MGA3 (cobre), MGA4 (latón). Por lo que a partir de ahora serán nombradas de ese modo para evitar confusión.

### 7.3.2. Secuenciación.

Se realizó la secuenciación de las muestras de ADN del *Schmutzdecke* de cada filtro lento de arena.

Se calculó el número total de bases, lecturas, porcentaje de Guanina y Citosina (% GC), radio de lecturas que tienen puntuación de calidad de phred de más de 20 y 30 (% Q20; % Q30) para las cuatro muestras.

Para los datos sin filtrar se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 7.

Tabla 7. Estadísticas datos crudos.

<b>ID muestra</b>	<b>Total de bases leídas (pb)</b>	<b>Total de lecturas</b>	<b>GC (%)</b>	<b>AT (%)</b>	<b>Q20 (%)</b>	<b>Q30 (%)</b>
MGA1	100,465,974	333,774	56.035	43.97	87.715	80.619
MGA2	137,936,862	458,262	55.297	44.7	88.533	81.610
MGA3	123,472,608	410,208	55.501	44.5	88.514	81.691
MGA4	174,994,176	581,376	55.016	44.98	88.893	81.398

Como se puede observar la muestra que más lecturas tuvo fue la MGA4 y la muestra con menos lecturas fue la MGA1, el porcentaje de GC y AT fue similar en todas las muestras y se obtuvo una buena calidad Q20 y Q30 por encima del 80%.

Las secuencias adaptadoras fueron removidas por medio de los programas Scythe (v0.994) y Sickle, si las lecturas eran menores que 36 pb, esas lecturas se eliminan para producir datos limpios (Tabla 8).

Tabla 8. Estadísticas datos sin adaptadores.

<b>ID muestra</b>	<b>Total de bases leídas (pb)</b>	<b>Total de lecturas</b>	<b>GC (%)</b>	<b>AT (%)</b>	<b>Q20 (%)</b>	<b>Q30 (%)</b>
MGA1	99,382,104	332,502	56.072	43.93	88.454	81.306
MGA2	136,589,722	456,430	55.328	44.67	89.204	82.235
MGA3	122,200,031	408,362	55.543	44.46	89.210	82-341
MGA4	173,617,920	579,792	55.031	44.97	89.434	81.897

Al quitar los adaptadores no se observa mucha diferencia en el total de lecturas obtenidas (1000-1800), así como en el % GC, AT, Q20 y Q30.

### 7.3.3. Análisis de las secuencias.

Una vez realizada la recolección de OTUs se obtuvieron las secuencias por cada muestra y su tamaño medio (Tabla 9).

Tabla 9. Total de secuencias de cada muestra antes y después del filtro de calidad.

<b>ID muestra</b>	<b>Total secuencias</b>	<b>Total secuencias después de filtro de calidad</b>	<b>Tamaño medio de la secuencia (Pb)</b>
MGA1	166,251	143,589	286
MGA2	228,215	200,639	289
MGA3	204,181	178,255	289
MGA4	289,896	264,346	286

Se obtuvieron un total de 787,829 secuencias, la muestra que menos secuencias obtuvo fue la MGA1 con 143,589 y la muestra con mayor número de secuencias fue la MGA4. El tamaño medio de cada secuencia se encontró entre 286 y 289 pb.

### 7.3.4. Riqueza y abundancia bacteriana.

La riqueza y abundancia de cada una de las muestras se analizaron mediante los índices alfa, Shannon ( $H'$ ) y Simpson ( $D$ ).

Los dos índices analizan la diversidad, pero Shannon se basa más en la riqueza y Simpson en la abundancia relativa, de tal manera que uno, nos indica cuantas especies están presentes (Shannon) y el otro cuál de las especies tiene mayor dominancia en la comunidad (Simpson).

Se observó que la muestra con mayor diversidad según Shannon fue la MGA2 ( $H'=11.03$ ), seguida de las muestras MGA3 ( $H'=10.49$ ), MGA1 ( $H'=10.22$ ) y MGA4 ( $H'=6.45$ ). Como se puede observar todas las muestras tuvieron un número elevado de especies, esto concuerda con el número de OTUs obtenidos (Tabla 10).

La diversidad basada en la abundancia relativa según Simpson correspondió con lo que se observó en Shannon, siendo MGA2 ( $D=0.9978$ ) la muestra con mayor abundancia relativa, seguida de las muestras MGA1 ( $D=0.9971$ ), MGA3 ( $D=0.9942$ ) y por último MGA4 ( $D=0.9643$ ). En esta última muestra que tuvo un valor significativamente menor en Shannon (6.45 contra 11.03, 10.49 y 10.22 de las demás) el valor de Simpson indica que la abundancia fue uniforme en las 4 muestras.

Tabla 10. Número de OTUs obtenidos de cada clasificación taxonómica por cada muestra (Anexo 1).

<b>ID muestra</b>	<b>Filo</b>	<b>Clase</b>	<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>
MGA1	31	88	169	268	419
MGA2	38	109	219	362	570
MGA3	35	99	190	306	498
MGA4	17	37	63	114	177

También se observó que las muestras no compartían todos los filos entre sí, siendo las muestras MGA2 y MGA3 las que compartieron el mayor número de filos y la muestra MGA4 la que menor número de filos compartió (Tabla 11), esto concuerda con lo reportado en los índices de Shannon y Simpson, ya que sus valores están muy cercanos entre sí.

Tabla 11. Número de OTUs en común entre las muestras a nivel de filo.

<b>ID muestra</b>	<b>MGA1</b>	<b>MGA2</b>	<b>MGA3</b>	<b>MGA4</b>
<b>MGA1</b>				
<b>MGA2</b>	28			
<b>MGA3</b>	29	33		
<b>MGA4</b>	12	13	12	

Asimismo se observó que fueron muy pocos los filos encontrados solo en una muestra (MGA1, MGA2 y MGA3), en cambio en la muestra MGA4 se encontró una mayor cantidad de filos únicos (Tabla 12). Esto también concuerda con los índices Shannon y Simpson, ya que se observó que la muestra MGA4 tenía menor riqueza y menor abundancia relativa indicándonos que su comunidad microbiana es diferente de las otras muestras.

Tabla 12. Número de OTUs únicos en cada muestra a nivel de filo.

<b>ID muestra</b>	<b>Filos</b>
MGA1	1
MGA2	2
MGA3	1
MGA4	4

### 7.3.5. Composición de la comunidad bacteriana.

El filo dominante en todas las muestras fue *Proteobacteria* con un 42.89, 43.2, 37.57, y 42.54% en el filtro MGA1, MGA2, MGA3 y MGA4, respectivamente. Esto es consistente con lo reportado en estudios previos de la composición bacteriana en filtros lentos de arena (Wakelin et al. 2011; Haig et al. 2014a; Wang et al. 2014; Pfannes et al. 2015; Nitzsche et al. 2015). La dominancia del filo *Proteobacteria* se entiende ya que es el filo más extenso y diverso del reino *Bacteria*. Más de un tercio de las especies de *Bacteria* que se han caracterizado se encuentran en este filo, todas son gramnegativas y son muy variadas en cuanto a la generación de energía encontrándose especies que son quimiolitótrofas, quimioorganótrofas y fotótrofas. Así mismo son diversas en su relación con el oxígeno (O<sub>2</sub>), teniendo especies aerobias facultativas, anaerobias y microaerófilas (Madigan et al. 2015).

El segundo filo más abundante fue *Acidobacteria* en las muestras MGA1 y MGA3, con un 16.92 y 12.46 % respectivamente, y el tercero en la muestra MGA2 con un 12.05%. Esto se puede explicar ya que es particularmente abundante en hábitats del suelo que pueden representar hasta el 52% de la comunidad bacteriana total y un promedio de aproximadamente 20% de la comunidad microbiana en diversos ambientes del suelo. Debido a que hay una correlación negativa entre la abundancia de *Acidobacteria* y la concentración de carbono orgánico se cree que los miembros de este filo son oligotróficos, sin embargo se han encontrado miembros que crecen bien en ambientes con alta concentración de carbono orgánico (Kielak et al. 2016).

*Planctomyces* fue el segundo filo más abundante en la muestra MGA2 con un 14.64% y el tercer filo dominante en las muestras MGA1 y MGA3 con un 14.92 y 11.74%, respectivamente. Muchas especies de *Planctomycetes* son aerobias quimioheterótrofas, aunque a veces oligotróficas y de crecimiento lento. Muchas especies también pueden tener un rol central en la degradación de heteropolisacáridos de algas y plantas incluyendo exopolisacáridos producidos por otras bacterias. También se ha encontrado mediante estudios metagenómicos y de ecología molecular que son omnipresentes en hábitats acuáticos y del suelo (Fuerst 2017).

*Firmicutes* fue el tercer filo más dominante en la muestra MGA4 con un 15.46%. El filo *Firmicutes* contiene las bacterias formadoras de endosporas, las bacterias del ácido láctico y varios grupos más (Madigan et al. 2015).

*Cyanobacteria* el segundo filo más abundante en la muestra MGA4. Las cianobacterias son un grupo de bacterias fotótrofas oxigénicas. Todas las especies pueden fijar CO<sub>2</sub>, muchas pueden fijar nitrógeno. Las células captan la energía de la luz y fijan el CO<sub>2</sub> durante el día. Durante la noche, generan energía por fermentación o respiración aerobia de productos de almacenamiento de carbono. Algunas cianobacterias pueden asimilar compuestos orgánicos sencillos como glucosa y acetato por medio de fotoheterotrofia (Madigan et al. 2015).

Otros fillos encontrados en altas proporciones fueron *Bacteroidetes* en los filtros MGA1, MGA2, MGA3, MGA4, con un 6.46, 11.39, 10.64 y 5.46%, respectivamente. El filo *Bacteroidetes* especies que son normalmente sacarolíticas, y pueden ser aerobias o fermentadoras, comprenden aerobios estrictos, aerobios facultativos y anaerobios estrictos (Madigan et al. 2015). También se ha encontrado que los *Bacteroidetes* presumiblemente están involucrados en la degradación de materia orgánica compleja (Pfannes et al. 2015).

*Verrucomicrobia* en los filtros MGA1, MGA2 y MGA3 con un 4.38, 3.83 y 5.09%. Las especies del filo *Verrucomicrobia* son bacterias aerobias o facultativas, con capacidad de fermentar azúcares. Además, algunas especies forman asociaciones simbióticas con protistas. Los miembros de este filo están muy extendidos en la naturaleza, se pueden encontrar tanto en medios acuáticos marinos y de agua dulce, así como en suelos agrícolas y forestales (Madigan et al. 2015).

*Actinobacteria* en los filtros MGA1, MGA2, MGA3 y MGA4 con un 1.2, 0.9, 8.69 y 1.9 % respectivamente. En las *Actinobacterias* se incluyen los actinomicetos, un grupo muy grande de bacterias del suelo, mayoritariamente filamentosas. Son habitantes normales del suelo y de materiales vegetales (Madigan et al. 2015).

Estos fillos también fueron encontrados en estudios realizados en filtros lentos de arena (Hamady et al. 2008; Haig et al. 2014a; Pfannes et al. 2015; Nitzsche et al. 2015) (Figura 14).



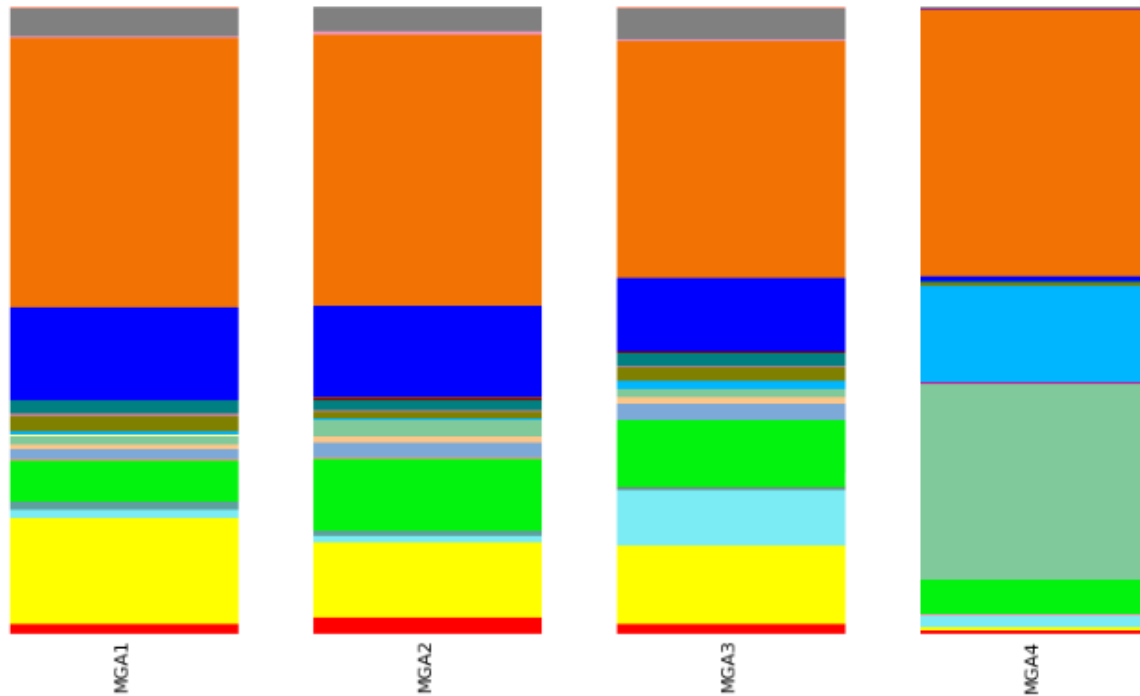


Figura 14. Filos dominantes presentes en los filtros lentos de arena. ■ *Proteobacteria*, ■ *Planctomycetes*, ■ *Verrucomicrobia*, ■ *Bacteroidetes*, ■ *Acidobacteria*, ■ *Firmicutes*, ■ *Cyanobacteria*, ■ *Actinobacteria*, ■ Sin clasificar.

Dentro de las *Proteobacterias* las clases más abundantes fueron diferentes en cada filtro, *Alphaproteobacteria* en el filtro MGA4 con un 36.7%. Las *Alphaproteobacteria* son la segunda clase más amplia dentro de las *Proteobacteria*. La mayoría de las especies son aerobias estrictas o facultativas, y muchas son también oligótrofas, que crecen con preferencia en hábitats que tienen baja concentración de nutrientes (Madigan et al. 2015). Una gran variedad de estrategias metabólicas se han encontrado en esta clase, incluyendo fotosíntesis, fijación de nitrógeno, oxidación de amoníaco y metilotropía (Williams et al. 2007).

*Betaproteobacteria* en el filtro MGA2 con un 16.2%, en el filtro MGA3 con un 11.1%. Las *Betaproteobacteria* son la tercera clase más abundante de las *Proteobacteria*. A menudo utilizan nutrientes que se difunden desde áreas de descomposición anaerobia de materia orgánica, como gas hidrógeno, amoníaco y metano. En este grupo se encuentran varias bacterias patógenas importantes (Tortora et al. 2007). En esta clase se encuentran bacterias quimiolitótrofas del hierro ferroso, compuestos del azufre, amoníaco, nitrato e hidrógeno.

Los principales tipos de metabolismo encontrados en esta clase son metilotrofia, fijación del nitrógeno y fototrofia anoxigénica.

*Gammaproteobacteria* en el filtro MGA1 con un 12.3% y en el filtro MGA3 con un 11.1%. Las *Gammaproteobacteria* son la clase más extensa y variada de las *Proteobacteria*. Los miembros de este grupo pueden ser fotótrofos, quimioorganótrofos o quimiolitótrofos y pueden presentar metabolismo respiratorio o fermentador (Madigan et al. 2015).

Dentro de los *Planctomycetes* la clase *Planctomycetia* fue la más abundante en los filtros MGA1, MGA2 y MGA3 con un 13.1, 12.5 y 9.8% respectivamente. Todos los miembros de la clase *Planctomycetia* son quimioheterótrofos. Se encuentran bacterias aerobias heterótrofas y bacterias anaerobias oxidadoras de amonio (*Anammox*), que oxidan amoniaco en gas N<sub>2</sub> usando nitrito como agente oxidante en condiciones anaerobias (Yamashita et al. 2016).

En el filo de las *Acidobacterias* se encontró la clase *Chloracidobacteria* en los filtros MGA1 (6%), MGA2 (5.8%) y MGA3 (5.1%). Los miembros de la clase *Chloracidobacterium* son bacterias aerobias fotoheterótrofas anoxigénicas (Tytgat et al. 2016).

La clase *Cytophagia* perteneciente al filo de los *Bacteroidetes* se encontró en los filtros MGA1, MGA2 y MGA3, en un 2.7, 5.3 y 5%, respectivamente. Este filo comprende casi exclusivamente aerobios estrictos, aunque algunas especies tienen capacidades fermentadoras limitadas. Las especies de esta clase están especializadas en la degradación de polisacáridos complejos. Están muy distribuidas por suelos óxicos y ambientes de agua dulce, donde probablemente llevan a cabo parte de la digestión de la celulosa (Madigan et al. 2015).

En el filtro MGA3 se encontró la clase *Actinobacteria* perteneciente al filo *Actinobacteria* en un 8.5%. La clase *Actinobacteria* juega un rol crítico en la ecología del suelo ya que miembros de esta clase fijan nitrógeno, solubilizan fósforo y movilizan otros nutrientes, degradan polímeros recalcitrantes como la lignocelulosa, quitina, etc. (Stevenson y Hallsworth 2014).

En el filtro MGA4 se encontraron clases que no fueron abundantes en los otros filtros, tales como *Chloroplast* perteneciente al filo de las *Cyanobacterias* con un 31.1% y dentro del filo de los *Firmicutes* se encontraron las clases *Bacilli* (10.9%) y *Clostridia* (4.2%). Los miembros de la clase *Clostridia* son bacterias anaerobias, mientras que los miembros de la clase *Bacilli* se caracterizan por ser aerobios obligados o facultativos (Aguilera y Rothstein 2007).

También se encontró la clase *Bacteroidia* perteneciente al filo de los *Bacteroidetes* en un 3.9%. La clase *Bacteroidia* contiene principalmente especies anaerobias estrictas que son fermentadoras (Madigan et al. 2015) (Figura 15).

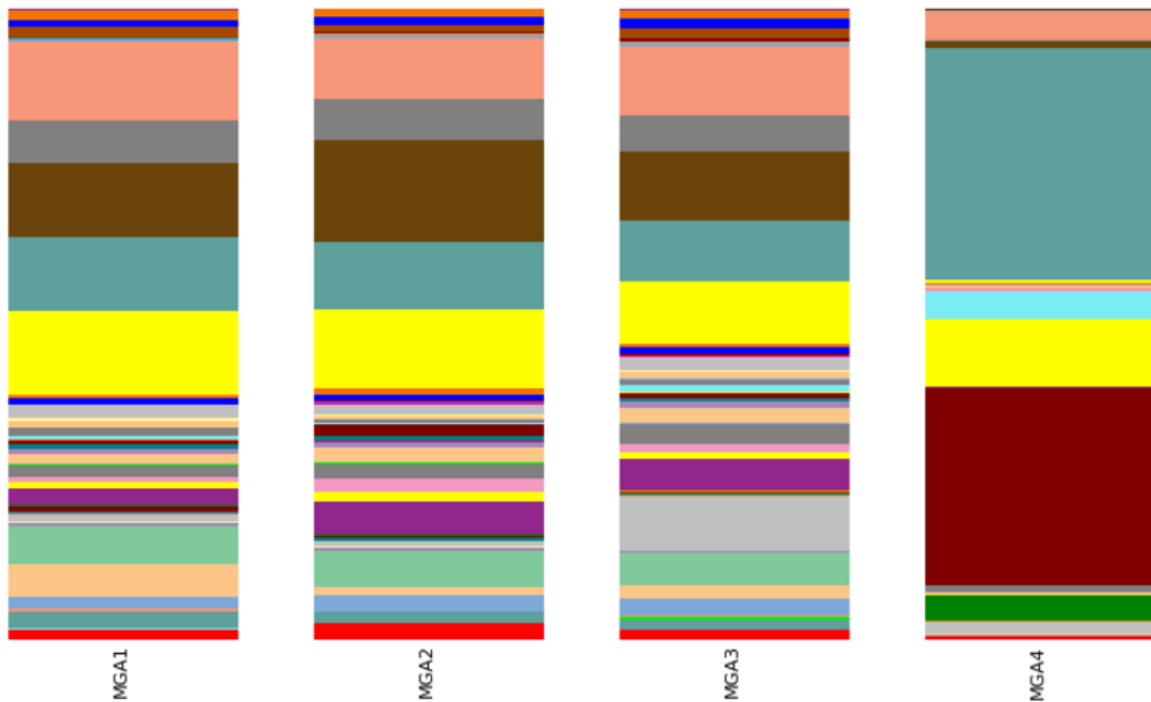


Figura 15. Clases dominantes presentes en los filtros lentos de arena. ■ *Gammaproteobacteria*, ■ *Deltaproteobacteria*, ■ *Betaproteobacteria*, ■ *Alphaproteobacteria*, ■ *Planctomycetia*, ■ *Chloracidobacteria*, ■ *Sva0725*, ■ *Cytophagia*, ■ *Actinobacteria*, ■ *Clostridia*, ■ *Chloroplast*, ■ *Bacilli*, ■ *Bacteroidia*.

Las familias dominantes en los filtros MGA1, MGA2 y MGA3 fueron las siguientes: *Planctomycetaceae* (*Planctomycetia*) con un 7.8, 7.5 y 5.5 %, respectivamente. Dentro de la familia *Planctomycetaceae* se encontró principalmente el género *Planctomyces* (Anexo 1), la dominancia de este género se puede explicar por la presencia de algas (*Chlorophyta* y *Streptophyta*) (Anexo 1) en los filtros debido a la exposición de los mismos al sol y a la presencia de nitrógeno en el agua causada por la contaminación fecal y al vertido de fertilizantes en el Río Sacramento debido a la actividad agrícola presente en las cercanías. Se ha visto que los *Planctomyces* son colonizadores de algas y poseen enzimas metabólicas que le permiten degradar los azúcares presentes en la pared celular de algas y plantas (Lage y Bondoso 2014; Haig et al. 2015; Fuerst 2017).

*Comamonadaceae* (*Betaproteobacteria*) con un 7.1, 11.3 y 5.9 %. *Comamonadaceae* es una de las familias más importantes responsables de la desnitrificación y procesos de degradación aromática (Khan et al. 2002; Lopes et al. 2016; Xu et al. 2017). Como ya se ha mencionado, el afluente probablemente contenía nitrógeno debido a la alta contaminación presente en el agua. Este proceso de desnitrificación es muy importante en el tratamiento de aguas ya que elimina el nitrógeno fijado que es uno de los grandes estimuladores para el crecimiento de algas, que como ya se ha mencionado estaban presentes en los filtros. Otras familias encontradas en menor proporción que están involucradas en el ciclo del nitrógeno fueron *Nitrosomonadaceae* que participan en la nitrificación, *Nitrospiraceae* involucradas en la oxidación de nitritos a nitratos y *Cyanobacteria*, *Rhodospirillaceae*, *Chlorobi*, y *Corynebacteriaceae* que realizan la fijación del nitrógeno (Madigan et al. 2015). En un estudio realizado para caracterizar las poblaciones de la comunidad microbiana durante la sucesión primaria en un sistema de lodos activados diseñado con una película fija para tratar aguas conteniendo arena contaminada con aceites, Huang et al. (2017) encontraron que los filos dominantes presentes en muestras de biopelículas y agregados (*flocs*) fueron *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Acidobacteria*, y *Bacteroidetes*.

De la familia *Acidobacteriaceae*, el género *Chloracidobacterium*, propuesto como una nueva especie por el aislamiento Ellin6075 (Tank y Bryant 2015) se detectó en un 4.7, 4.6 y 2.4 %, respectivamente. No se tiene mucha información del género *Chloracidobacterium*, quien pertenece al filo *Acidobacteria* encontrado principalmente en suelos, donde se ha reportado que las cepas pertenecientes a esta familia son organoheterótrofas (Saidi-

Mehrabad et al. 2013). En un estudio de la comunidad microbiana presente en biopelículas y agregados (*flocs*) en sistemas de lodos activados para la biodegradación de aceites en arena en aguas contaminadas, Huang et al. (2017) encontraron que este filo estaba en una proporción significativamente mayor en el agregado comparado con la biopelícula. Esto nos hace creer que en nuestro sistema de filtración, formaba parte del *Schmutzdecke*.

*Cytophagaceae* (*Cytophagia*) en un 2.6, 5.2 y 4.8%. Los porcentajes obtenidos de esta familia pertenecían a un género que no se pudo identificar (Anexo 1); sin embargo, esta familia comprende bacterias que se encuentran en hábitats marinos, de aguas dulces, y terrestres. Todos sus miembros son heterótrofos y la mayoría son aerobios, digieren macromoléculas tales como polisacáridos o proteínas (Mcbride 2006).

*Gemmataceae* (*Planctomycetia*) con un 3.1, 2.9 y 2.2 %. Dentro de la familia *Gemmataceae* se encontró con mayor prevalencia el género *Gemmata* (Anexo 1). Este género comprende especies que son aerobias quimioheterótrofas, aunque algunas veces las especies oligótrofas son de crecimiento lento (11 horas de tiempo de generación). Muchas tienen un papel central en la degradación de heteropolisacáridos de plantas y algas, incluyendo exopolisacáridos de otras bacterias (Fuerst 2017) .

*Sphingomonadaceae* (*Alphaproteobacteria*) en un 2.8, 3.1 y 1.9 %. Dentro de esta familia se encontró en mayor abundancia el género *Kaistobacter* (Anexo 1) que se encuentra distribuido en ambientes terrestres y es considerado un microorganismo benéfico ya que es fotosintético y juega un rol importante en los ecosistemas del suelo ya que tiene la capacidad de degradar hidrocarburos como el fenantreno que es utilizado como intermediario en la fabricación de fenantrenoquinona en pesticidas (Waigi et al. 2015; Bastida et al. 2016; Wu et al. 2017).

En el filtro MGA3 se encontró la familia *Corynebacteriaceae* (*Actinobacteria*) en un 6.8%. La familia *Corynebacteriaceae* está compuesta por el género *Corynebacterium* (Anexo 1), muchas de las especies reconocidas de este género se han encontrado en una amplia variedad de hábitats tales como suelo, plantas y productos alimenticios. Este género abarca una gran diversidad de especies (más de 50) (Yassin et al. 2003; Chen et al. 2004; Lee et al. 2009;). Debido a que solamente se pudo identificar hasta género, no se puede saber

exactamente el papel que tiene *Corynebacterium* en la comunidad microbiana presente en los filtros lentos de arena.

En el filtro MGA4 se observó una prevalencia de microorganismos muy diferente que en los otros filtros lentos de arena. Miembros del orden *Streptophyta* fueron los más abundantes (31.12%). Este filtro contenía latón, que está compuesto por Zn (28.38-31.38%); Cu (68.5-71.5%); Pb (0.07%); y Fe (0.05%). Se ha visto que las algas *Streptophyta* (algas verdes) son mucho más resistentes a altas concentraciones de iones de metales tóxicos que las algas verde azules (Wood y Wang 1983). Además, las algas Carofitas (división de *Streptophyta*) tienen tolerancia en contra de metales pesados debido a que tienen la capacidad de acumularlos por medio de la coprecipitación por las incrustaciones de carbonato de calcio presentes en las algas (Gupta y Diwan 2017). También se ha encontrado en varios géneros de carofitas que son resistentes a una gran variedad de metales pesados, entre ellos el zinc y bioacumulan grandes cantidades de plomo (Sooksawat et al 2013; Varela 2016).

Dentro de la familia *Acetobacteraceae* se encontró que el género predominante fue *Gluconobacter* (24.6%) (Anexo 1). Este género pertenece a las llamadas bacterias del ácido acético junto con *Acetobacter*, son aerobias estrictas que llevan a cabo la oxidación incompleta de alcoholes y azúcares, lo que provoca la acumulación de ácidos orgánicos como productos finales (Madigan et al. 2015).

*Gluconobacter* tiene la capacidad de oxidar varios azúcares y polioles para producir CO<sub>2</sub> por medio de la vía de la pentosa fosfato. El CO<sub>2</sub> producido puede ser utilizado por las algas *Streptophytas* ya que es su fuente de carbono principal y de esta manera generar moléculas de O<sub>2</sub> que son utilizadas a su vez por *Gluconobacter* para estimular sus actividades de crecimiento y oxidación (Macauley et al. 2001). También se ha encontrado que *Gluconobacter* tiene la capacidad de solubilizar el zinc (ZnO), por lo que es resistente a este metal (Burnley 2000; Intorne et al. 2009).

Igualmente se encontró una alta abundancia de *Lactobacillus*. Esto pudo deberse a que se ha encontrado que algunas microalgas (*Chlorella vulgaris*) promueven el crecimiento de *Lactobacillus* en el intestino humano, así como en medios sintéticos. Debido a que proveen un medio altamente nutritivo y estimulador de su crecimiento y actividad. Dentro de estas

sustancias se encuentran exopolisacáridos, adenina, hipoxantina, aminoácidos libres, y vitaminas y minerales esenciales (Beheshtipour et al. 2012; Beheshtipour et al. 2013). *Streptophyta* y *C. vulgaris* (*Chlorophyta*) pertenecen al grupo de las algas verdes (Madigan et al. 2015), por lo que puede ser que tengan comportamientos similares, de manera que las algas *Streptophyta* podrían causar la misma función de *C. vulgaris* en *Lactobacillus*. La presencia de este género en mayor cantidad en el filtro MGA4 pudo ser la causa de que se ha reportado que las bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de remover metales pesados de soluciones acuosas (Halttunen et al. 2008); además de que se ha encontrado que algunas especies de *Lactobacillus* pueden remover el plomo y son resistentes al zinc (Halttunen et al. 2007; Leonardi et al. 2013; Yin et al. 2016).

Asimismo, se observó que bacterias dominantes que se encontraban presentes en los filtros MGA1, MGA2 y MGA3 (*Planctomyces* *Cytophagaceae*, *Comamonadaceae*) disminuyeron en gran medida su presencia en el filtro MGA4 (Anexo 1), probablemente a causa, de su sensibilidad al zinc y al cobre (De Bento Flores 2013; Drewniak et al 2016).

Esto concuerda con estudios que han reportado que el Zinc disminuye la diversidad y riqueza a nivel de familias y especies. Además de que algunos metales causan una disminución de la diversidad, incremento de la población del filo *Proteobacterias*, y disminución de los filos de *Acidobacteria* y *Actinobacteria* (Gołębiewski et al. 2014). También, que altas concentraciones de metales ocasionan un crecimiento más lento de microorganismos y varias clases (especialmente las bacterias desnitrificantes) como las *Comamonadaceae* afectan su ciclo biogeoquímico en mayor medida que la comunidad microbiana (Joshi y Jaiswal 2013).

Esto aunado a la probable producción de bacteriocinas por *Lactobacillus* que pudieron inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Todorov 2009). Y la producción de ácidos orgánicos, como ácido acético y láctico por parte de *Gluconobacter* y *Lactobacillus*, respectivamente, que pudieron generar un ambiente ácido impidiendo el crecimiento de varias bacterias que se encontraban presentes en los otros filtros (Figura 16).

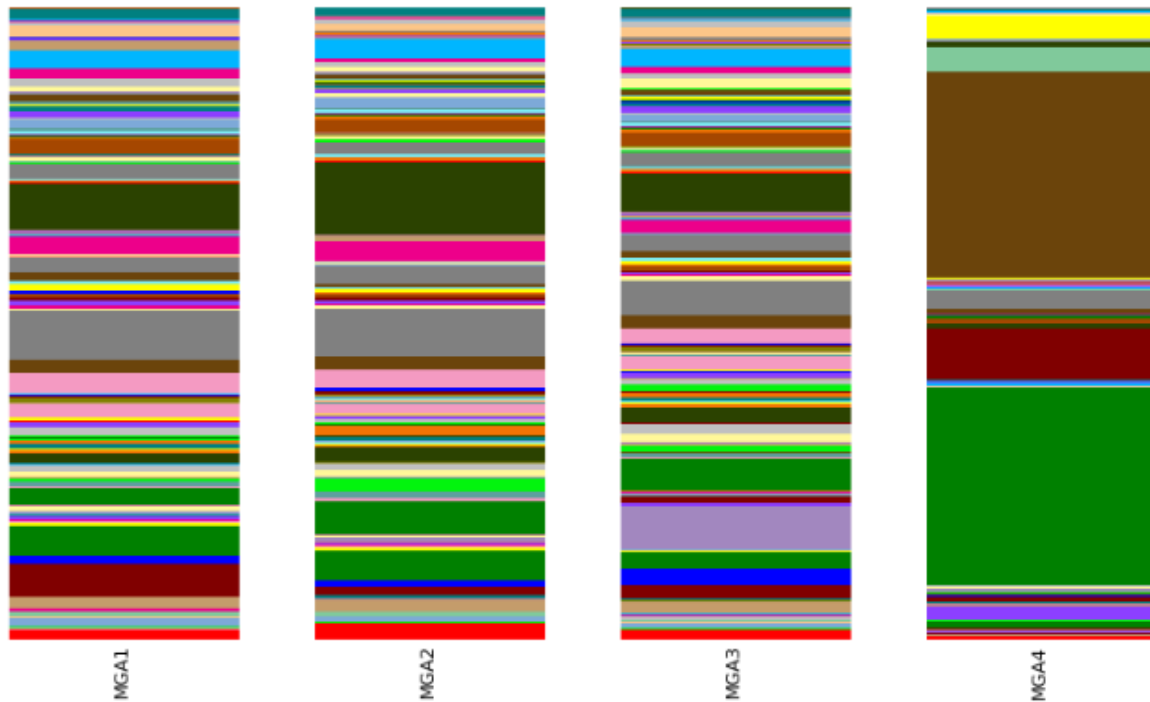


Figura 16. Familias dominantes presentes en los filtros lentos de arena. ■ *Comamonadaceae*, ■ *Planctomycetaceae*, ■ *Chloracidobacterium*, ■ *Cytophagaceae*, ■ *Corynebacteriaceae*, ■ *Acetobacteraceae*, ■ *Lactobacillaceae*, ■ *Cyanobacteria (p)*, ■ *Enterobacteriaceae*, ■ *Gemmataceae*, ■ *Sphingomonadaceae*.

Como se pudo observar, a pesar de que el filtro con latón tuvo una comunidad bacteriana muy diferente a los otros filtros, su rendimiento fue superior al 90%. Esto puede indicar que la composición de la comunidad microbiana presente en los FLA no es el factor principal en la eliminación de microorganismos patógenos, por lo que presumiblemente, hay otros mecanismos involucrados que tienen una mayor influencia en la eliminación de patógenos del agua, tales como la predación por protozoos, producción de EPS, competencia por nutrientes y condiciones ambientales dentro de los filtros. Sin embargo, todos estos mecanismos convergen para que el desempeño de los filtros lentos de arena sea óptimo.



## 8. CONCLUSIONES

Los filtros lentos de arena evaluados eliminaron más del 90% de enteropatógenos, mostrando ser una buena alternativa para el tratamiento de aguas contaminadas.

La adición de cobre, acero y latón al filtro de arena no mejora de manera significativa el rendimiento de los mismos.

El acero ( $H'=11.03$ ) y el cobre ( $H'=10.5$ ) no modifican la composición de la comunidad bacteriana presente en el *Schmutzdecke* del filtro lento de arena.

El latón cambia la diversidad de la comunidad bacteriana presente en el *schmutzdecke* del filtro lento de arena debido probablemente a su contenido de zinc y plomo, favoreciendo la predominancia de ciertas especies bacterianas.

La composición de la comunidad bacteriana es importante ya que entre más riqueza y abundancia de bacterias se encuentre, habrá más eliminación de microorganismos patógenos que se encuentran en el agua.

## 9. PERSPECTIVAS

Estudiar la comunidad eucariota del sobrenadante y el *schmutzdecke* para observar el efecto que tiene la adición de metales en su composición.

Analizar la actividad metabólica microbiana presente en los Filtros lentos de arena, principalmente en el *Schmutzdecke*.

Utilizar otros metales con capacidad antimicrobiana tales como la plata y probar su efectividad de purificación del agua en filtros lentos de arena.

Escalar la construcción de filtros lentos de arena en comunidades rurales.

## 10. REFERENCIAS

- Aguilera A, Rothstein R. 2007. *Molecular genetics of recombination*.
- Anderson WB, DeLoyde JL, Van Dyke MI, Huck PM. 2009. Influence of design and operating conditions on the removal of MS2 bacteriophage by pilot-scale multistage slow sand filtration. *Journal of Water Supply: Research and Technology—AQUA* 58 (7): 450. doi:10.2166/aqua.2009.140.
- Bagundol TB, Awa AL, Enguito MRC. 2013. Efficiency of slow sand filter in purifying well water. *Journal of Multidisciplinary Studies* 2 (1): 86–102. doi:http://dx.doi.org/10.7828/jmnds.v2i1.402
- Bain R, Cronk R, Hossain R, Bonjour S, Onda K, Wright J, Yang H, et al. 2014. Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. *Tropical Medicine & International Health* 19 (8): 917–27. doi:10.1111/tmi.12334.
- Bain R, Cronk R, Wright J, Yang H, Slaymaker T, Bartram J. 2014. Fecal contamination of drinking-water in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine* 11 (5). doi:10.1371/journal.pmed.1001644.
- Bastida F, Jehmlich N, Lima K, Morris BEL, Richnow HH, Hernández T, Von Bergen M, García C. 2016. The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. *Journal of Proteomic* 135: 162–69. doi:10.1016/j.jprot.2015.07.023.
- Bauer R, Dizer H, Graeber I, Rosenwinkel KH, López-Pila JM. 2011. Removal of bacterial fecal indicators, coliphages and enteric adenoviruses from waters with high fecal pollution by slow sand filtration. *Water Research* 45 (2): 439–52. doi:10.1016/j.watres.2010.08.047.
- Beheshtipour H, Mortazavian AM, Haratian P, Khosravi-Darani K. 2012. Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. *European Food Research and Technology* 235 (4): 719–28. doi:10.1007/s00217-012-1798-4.

Beheshtipour H, Mortazavian AM, Mohammadi R, Sohrabvandi S, Khosravi-Darani K. 2013. Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12 (2): 144–54. doi:10.1111/1541-4337.12004.

Bradley I, Straub A, Maraccini P, Markazi S, Nguyen TH. 2011. Iron oxide amended biosand filters for virus removal. *Water Research* 45 (15): 4501–10. doi:10.1016/j.watres.2011.05.045.

Burnley LE. 2000. Heavy metal resistance in the genus *Gluconobacter*: Tesis de maestría. Faculty of Virginia Tech. Virginia, EUA . Blacksburg.

Calvo-Bado LA, Pettitt TR, Parsons N, Petch GM, Morgan JAW, Whipps JM. 2003. Spatial and temporal analysis of the microbial community in slow sand filters used for treating horticultural irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 2116–25. doi:10.1128/AEM.69.4.2116.

Cánepa de Vargas L. 1998. Filtración lenta como proceso desinfección. *Simposio sobre Calidad del Agua: Desinfección Efectiva*: 1-17.

Casanova E. 2005. Introducción a la ciencia del suelo. UCV-CDCH. Caracas, Venezuela

Cavallini ER. 2005. Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica: Costa Rica, pp. 405.

Centers for Disease Control and Prevention. 2015. Global WASH Fast Facts Information on Water, Sanitation, and Hygiene. Atlanta, GA. [Online]. Disponible en: [http://www.cdc.gov/healthywater/global/wash\\_statistics.html](http://www.cdc.gov/healthywater/global/wash_statistics.html). Accesado el 15 de septiembre de 2017.

Consecuencias de la contaminación de nuestros ríos (s.f.). [Online]. Disponible en: <http://www.greenpeace.org/mexico/es/Campanas/Toxicos/Contaminacion-de-nuestros-rios/>. Accesado el 15 de septiembre de 2017

Chen HH, Li WJ, Tang SK, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E, Xu LH, Jiang CL. 2004. *Corynebacterium halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil in the west of China.

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (3): 779–82. doi:10.1099/ijs.0.02919-0.

Clark PA, Arango-Pinedo C, Fadus M, Capuzzi S. 2012. Slow-sand water filter: design, implementation, accessibility and sustainability in developing countries. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 18 (7): RA105-17.

Czárán TL, Hoekstra RF, Pagie L. 2002. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2): 786–90. doi:10.1073/pnas.012399899.

D'Alessio M, Yoneyama B, Kirs M, Kisand V, Ray C. 2015. Pharmaceutically active compounds: their removal during slow sand filtration and their impact on slow sand filtration bacterial removal. *Science of the Total Environment* 524–525: 124–35. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.014.

De Bento Flores CE. 2013. Planctomycetes cell viability studies: perspectives of toxicity assessment using zeta potential. Tesis de maestría. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Brazil.

Drewniak L, Krawczyk PS, Mielnicki S, Adamska D, Sobczak A, Lipinski L, Burec-Drewniak W, Sklodowska A. 2016. Physiological and metagenomic analyses of microbial mats involved in self-purification of mine waters contaminated with heavy metals. *Frontiers in Microbiology* 7: 1–18. doi:10.3389/fmicb.2016.01252

Duke WF, Nordin RN, Baker D, Mazumder A. 2006. The use and performance of biosand filters in the artibonite Valley of Haiti: a field study of 107 households. *Rural and Remote Health [Electronic Resource]*. 6 (3): 570.

Elliott MA, Stauber CE, Koksal F, DiGiano FA, Sobsey MD. 2008. Reductions of *E. coli*, *Echovirus* type 12 and Bacteriophages in an intermittently operated household-scale slow sand filter. *Water Research* 42 (10–11): 2662–70. doi:10.1016/j.watres.2008.01.016.

Farooq S, Al-Yousef AK. 1993. Slow sand filtration of secondary effluent. *Journal of Environmental Engineering*, 119(4): 615-630.

Flores L, Alcalá J. 2005. Manual de procedimientos analíticos. Universidad Nacional Autónoma De México. Instituto de Geología. Departamento de Edafología. Laboratorio de Física de Suelos.

Fuerst JA. 2017. Planctomycetes — new models for microbial cells and activities. *Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Applications*, 1–27. doi:10.1016/B978-0-12-804765-1/00001-1.

Gisbert J, Ibáñez S, Moreno H. 2009. La textura de un suelo. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Valencia, España.

Gomes Da, Souza aML, Lopes RV, Nunes aC, Nicoli JR. 2006. Comparison of antagonistic ability against enteropathogens by G+ and G- anaerobic dominant components of human fecal microbiota. *Folia Microbiologica* 51 (2): 141–45. doi:10.1007/BF02932170.

Gołębiewski M, Deja-Sikora E, Cichosz M, Tretyn A, Wróbel B. 2014. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microbial Ecology*. 67: 635–647. doi:10.1007/s00248-013-0344-7

Grass G, Rensing C, Solioz M. 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (5): 1541–47. doi:10.1128/AEM.02766-10.

Gruber JS, Ercumen A, Colford JM. 2014. Coliform bacteria as indicators of diarrheal risk in household drinking water: systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 9 (9): e107429. doi:10.1371/journal.pone.0107429.

Guchi E. 2015. Review on Slow Sand Filtration in Removing Microbial Contamination and Particles from Drinking Water 3 (2): 47–55. doi:10.12691/ajfn-3-2-3.

Gupta P, Diwan B. 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports* 13: 58–71. doi:10.1016/j.btre.2016.12.006

Haig SJ, Quince C, Davies RL, Dorea CC, Collins G. 2014a. Replicating the microbial community and water quality performance of full-scale slow sand filters in laboratory-scale filters. *Water Research* 61: 141–51. doi:10.1016/j.watres.2014.05.008.

Haig SJ, Schirmer M, D'amore R, Gibbs J, Davies RL, Collins G, Quince C. 2014b. Stable-isotope probing and metagenomics reveal predation by protozoa drives *E. coli* removal in slow sand filters. *The ISME Journal* 9 (4): 797–808. doi:10.1038/ismej.2014.175.

Haig SJ, Quince C, Robert LD, Caetano CD, Gavin C. 2015. The relationship between microbial community evenness and function in slow sand filters. *mBio* 6 (5): 1–12. doi:10.1128/mBio.00729-15.

Halttunen T, Collado MC, El-Nezami H, Meriluoto J, Salminen S. 2008. Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 160–165. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02276.x

Halttunen T, Salminen S, Tahvonen R. 2007. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 30–35. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040

Hamady, Micah, Jeffrey JW, Harris JK, Gold NJ, Rob K. 2008. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods* 5 (3): 235–37. doi:10.1038/nmeth.1184.

Hijnen WA, Dullemont YJ, Schijven JF, Hanzens-Brouwer AJ, Rosielle M, Medema G. 2007. Removal and fate of *Cryptosporidium parvum*, *Clostridium perfringens* and small-sized centric diatoms (*Stephanodiscus hantzschii*) in slow sand filters. *Water Research* 41 (10): 2151–62. doi:10.1016/j.watres.2007.01.056.

Huang C, Shi Y, El-Din MG, Liu Y. 2017a. Performance of flocs and biofilms in integrated fixed-film activated sludge (IFAS) systems for the treatment of oil sands process-affected water (OSPW). *Chemical Engineering Journal* 314: 368-377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.151>

Huang C, Shi Y, Sheng Z, El-Din MG, Liu Y. 2017b. Characterization of microbial communities during start-up of integrated fixed-film activated sludge (IFAS) systems for the treatment of oil sands process-affected water (OSPW). *Biochemistry Engineering Journal*, 122: 123-132.

Huisman L, Wood WE. 1974. *Slow sand filtration* (16). Geneva: World Health Organization.

Ibrahim F, Halttunen T, Tahvonen R, Salminen S. 2006. Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 877–85. doi:10.1139/w06-043

Intorne AC, De Oliveira MVV, Lima ML, Da Silva JF, Olivares FL, De Souza Filho GA. 2009. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology* 191: 477–483. doi:10.1007/s00203-009-0472-0

Jenkins MW, Tiwari SK, Darby J. 2011. Bacterial, viral and turbidity removal by intermittent slow sand filtration for household use in developing countries: experimental investigation and modeling. *Water Research* 45 (18): 6227–6239. doi:10.1016/j.watres.2011.09.022.

Jiang JQ, Graham NJ. 1998. Pre-polymerised inorganic coagulants and phosphorus removal by coagulation- a review. *Water SA* 24(3): 237-244.

Jiménez BE. 2001. *La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada*. Editorial Limusa: México.

Joshi A, Jaiswal P. 2013. Microorganisms living in zinc contaminated soil -a review. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 6: 67–72.

Joubert ED, Balakrishna P. 2008. Visualisation of the microbial colonisation of a slow sand filter using an environmental scanning electron microscope. *Electronic Journal of Biotechnology* 11 (2). doi:10.2225/vol11-issue2-fulltext-12.

Kerr B. 2007. The ecological and evolutionary dynamics of model bacteriocin communities. *Bacteriocins*, 111–134.

Khan ST, Horiba Y, Yamamoto M, Hiraishi A. 2002. Members of the family Comamonadaceae as primary poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-Degrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (7): 3206–3214. doi:10.1128/AEM.68.7.3206.



Kielak AM, Barreto CC, Kowalchuk GA, van Veen JA, Kuramae EE. 2016. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in Microbiology* 7 (MAY): 1–16. doi:10.3389/fmicb.2016.00744.

Koenig L. 1967. The cost of water treatment by coagulation, sedimentation, and rapid sand filtration. *Journal (American Water Works Association)*, 290-336. <http://www.jstor.org/stable/41265075>

Lage OM, Bondoso J. 2014. Planctomycetes and macroalgae, a striking association. *Frontiers in Microbiology* 5: 1–9. doi:10.3389/fmicb.2014.00267.

Langenbach K, Kusch P, Horn H. Kästner M. 2009. Slow sand filtration of secondary clarifier effluent for wastewater reuse. *Environmental Science and Technology*, 43 (15): 5896–5901. doi:10.1021/es900527j.

Lea M. 2008. Biological sand filters: low-cost bioremediation technique for production of clean drinking water. *Current Protocols in Microbiology*, no. May: 1–28. doi:10.1002/9780471729259.mc01g01s9.

Lea M. 2014. Biological sand filters: low-cost bioremediation technique for production of clean drinking water. *Current Protocols in Microbiology*, no. SUPPL.33: 1–27. doi:10.1002/9780471729259.mc01g01s33.

Lee HJ, Cho SL, Jung MY, Van Nguyen TH, Jung YC, Park HK, Kim W. 2009. *Corynebacterium doosanense* sp. nov., isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (11): 2734–37. doi:10.1099/ijs.0.010108-0.

Leonardi A, Zanoni S, De Lucia M, Amaretti A, Raimondi S, Rossi M. 2013. Zinc uptake by lactic acid bacteria. *ISRN Biotechnology*, 1–5. doi:10.5402/2013/312917

Liu G, Zhang X, y Talley JW. 2007. Effect of copper (II) on natural organic matter removal during drinking water coagulation using aluminum-based coagulants. *Water environment research* 79(6): 593-599.

Lopes FAC, Catão ECP, Santana RH, de Souza Cabral A, Paranhos R, Rangel TP, Kruger, RH. 2016. Microbial community profile and water quality in a protected area of the Caatinga biome. *PLoS ONE* 11 (2): 1–25. doi:10.1371/journal.pone.0148296.

Macauley S, McNeil B, Harvey LM. 2001. The Genus *Gluconobacter* and its application in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* 21 (1): 1–25.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2015. Brock Biología de los microorganismos. Pearson: Madrid.

Mathews S, Hans M, Mücklich F, Solioz M. 2013. Contact killing of bacteria on copper is suppressed if bacterial-metal contact is prevented and is induced on iron by copper ions. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (8): 2605–11. doi:10.1128/AEM.03608-12.

Mcbride MJ. 2006. The Prokaryotes. *Science*, no. July: 1099–1110. doi:10.1007/0-387-30744-3.

Nitzsche KS, Weigold P, Lösekann-Behrens T, Kappler A, Behrens S. 2015. Microbial community composition of a household sand filter used for arsenic, iron, and manganese removal from groundwater in Vietnam. *Chemosphere* 138: 47–59. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.032.

Norma Mexicana NMX-AA-042-SCFI-2015. Análisis de agua-enumeración de organismos coliformes totales, organismos coliformes fecales (Termotolerantes) y *Escherichia coli*-Método del número más probable en tubos múltiples. Diario Oficial de la Federación, 11 de febrero de 2016.

Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. *Diario Oficial de la Federación*. 24 junio de 1996.

Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación, 31 de diciembre de 2002.

Norma Oficial Mexicana NOM 014-SSA1- 1993. Procedimientos para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados. Diario Oficial de la Federación, 8 de diciembre de 1994.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación, 22 de noviembre de 2000.

Norma Oficial Mexicana NOM 244-SSA1- 2008. Equipos y sustancias germicidas para tratamiento doméstico de agua. Requisitos sanitarios. Diario Oficial de la Federación, 2 de Julio de 2008.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm Formation As Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol*: 49–79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.

Pasquet J, Chevalier Y, Couval E, Bouvier D, Noizet G, Morlière C, Bolzinger MA. 2014. Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Particles on Five Micro-Organisms of the Challenge Tests Related to Their Physicochemical Properties. *International Journal of Pharmaceutics* 460 (1–2): 92–100. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.10.031.

Pasquet J, Chevalier Y, Pelletier J, Couval E, Bouvier D, Bolzinger MA. 2014. The Contribution of Zinc Ions to the Antimicrobial Activity of Zinc Oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 457 (1): 263–74. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.05.057.

Pernthaler J. 2005. Predation on Prokaryotes in the Water Column and Its Ecological Implications. *Nature Reviews Microbiology* 3 (7): 537–46. doi:10.1038/nrmicro1180.

Pfannes KR, Langenbach KMW, Piloni G, Stührmann T, Euringer K, Lueders T, Neu TR, Müller Ja, Kästner M, Meckenstock RU. 2015. Selective Elimination of Bacterial Faecal Indicators in the Schmutzdecke of Slow Sand Filtration Columns. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-015-6882-9.

Rocha-Castro E. 2010. Ingeniería de tratamiento y acondicionamiento de aguas. Departamento editorial de la UACH: Chihuahua.

Rønn R, McCaig AE, Griffiths B, Prosser JI. 2002. Impact of Protozoan Grazing on Bacterial Community Structure in Soil Microcosms. *Society* 68 (12): 6094–6105. doi:10.1128/AEM.68.12.6094.

Rucks L, García F, Kaplán A, Ponce de León J, Hill M. 2004. Propiedades físicas del suelo. Universidad de la República: Facultad de agronomía. Montevideo, Uruguay.

Saidi-Mehrabad A, He Z, Tamas I, Sharp CE, Brady AL, Rochman FF, Bodrossy L, et al. 2013. Methanotrophic Bacteria in Oilsands Tailings Ponds of Northern Alberta. *The ISME Journal* 7 (5): 908–21. doi:10.1038/ismej.2012.163.

Sampietro DA. 2002. Alelopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales “Dr. Antonio R. Sampietro” Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán Ayacucho, [Online]. Disponible en: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/alelopatia.htm>.

Santo CE, Wen Lam E, Elowsky CG, Quaranta D, Domaille DW, Chang CJ, Grass G. 2011. Bacterial Killing by Dry Metallic Copper Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (3): 794–802. doi:10.1128/AEM.01599-10.

Shaekh MPE, Mondol A, Islam MM, Kabir AS, Saleh MA, Uddin SM, KMF Hoque, Ekram AE. 2013. Isolation, Characterization and Identification of an Antagonistic Bacterium from *Penaeus Monodon*. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 4 (10): 254–61.

Sooksawat N, Meetam M, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Nathalang K. 2013. Phytoremediation potential of charophytes: Bioaccumulation and toxicity studies of cadmium, lead and zinc. *Journal of Environmental Sciences* 25(3): 596-604.

Stevik TK, Aa K, Ausland G, Hanssen JF. 2004. Retention and Removal of Pathogenic Bacteria in Wastewater Percolating through Porous Media: A Review. *Water Research* 38 (6): 1355–67. doi:10.1016/j.watres.2003.12.024.

Stevenson A, Hallsworth JE. 2014. Water and temperature relations of soil Actinobacteria. *Environmental Microbiology Reports* 6: 744–755. doi:10.1111/1758-2229.12199

Tank M, Bryant DA. 2015. *Chloracidobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov.: an anoxygenic microaerophilic chlorophotoheterotrophic acidobacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 65 (5): 1426-1430. doi:10.1099/ijs.0.000113

Thompson LM, Troeh FR. 1988. Los suelos y su fertilidad. Reverté: Barcelona.

Todorov SD. 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus Plantarum* Production, Genetic Organization and Mode of Action: Produção, Organização Genética E Modo de Ação. *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (2): 209–21. doi:10.1590/S1517-83822009000200001.

Torres C, Villanueva S. 2014. El filtro de arena lento: Manual para el armado, instalación y monitoreo. Universidad Piloto de Colombia. Bogotá. [Online]. Disponible en: <http://www.unipiloto.edu.co/wp-content/uploads/2013/11/El-filtro-de-arena-Lento-a-color-para-la-web.pdf>

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2007. Introducción a la Microbiología. Ed. Médica Panamericana: Argentina

Tytgat B, Verleyen E, Sweetlove M, D'hondt S, Clercx P, Van Ranst E, Peeters K, et al. 2016. Bacterial Community Composition in Relation to Bedrock Type and Macrobiota in Soils from the Sør Rondane Mountains, East Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (9): 1–13. doi:10.1093/femsec/fiw126.

Varela HHP. 2016. Effects of heavy metals ions on primary photosynthetic processes in Antarctic filamentous alga *Zygnema* sp. *Short Communication* 6: 180–185. doi:10.5817/CPR2016-2-16

Vargas LC. Filtración lenta como proceso de desinfección. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, Simposio regional sobre calidad del agua; desinfección efectiva. Lima, CEPIS/OPS, 2004, p.1-17.

Waigi MG, Kang F, Goikavi C, Ling W, Gao Y. 2015. Phenanthrene Biodegradation by Sphingomonads and Its Application in the Contaminated Soils and Sediments: A Review.

*International Biodeterioration and Biodegradation* 104: 333–49.  
doi:10.1016/j.ibiod.2015.06.008.

Wakelin S, Page D, Dillon P, Pavelic P, Abell GCJ, Gregg AL, Brodie E, DeSantis TZ, Goldfarb KC, Anderson G. 2011. Microbial Community Structure of a Slow Sand Filter Schmutzdecke: A Phylogenetic Snapshot Based on rRNA Sequence Analysis. *Water Science and Technology: Water Supply* 11 (4): 426–36. doi:10.2166/ws.2011.063.

Wang LK, Ivanov V, Tay JH, Hung YT. (Eds.). (2010). *Environmental biotechnology* (10). Springer Science & Business Media.

Wang H, Narihiro T, Straub AP, Pugh CR, Tamaki H, Moor JF, Bradley IM, Kamagata Y, Liu WT, Nguyen TH. 2014. MS2 Bacteriophage Reduction and Microbial Communities in Biosand Filters. *Environmental Science and Technology* 48 (12): 6702–9. doi:10.1021/es500494s.

Williams KP, Sobral BW, Dickerman AW. 2007. A Robust Species Tree for the Alphaproteobacteria. *Journal of Bacteriology* 189 (13): 4578–86. doi:10.1128/JB.00269-07.

Wood JM, Wang HK. 1983. Microbial resistance to heavy metals. *Environmental Science & Technology* 17: 582A–90A. doi:10.1021/es00118a717

World Health Organization (WHO), United Nations Children’s Fund (UNICEF). 2017. Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 update and SDG baselines. Geneva.

Wu W, Wu J, Liu X, Chen X, Wu Y, Yu S. 2017. Ecotoxicology and Environmental Safety Inorganic Phosphorus Fertilizer Ameliorates Maize Growth by Reducing Metal Uptake, Improving Soil Enzyme Activity and Microbial Community Structure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143 (May): 322–29. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.05.039.

Xu D, Liu S, Chen Q, Ni J. 2017. Microbial Community Compositions in Different Functional Zones of Carrousel Oxidation Ditch System for Domestic Wastewater Treatment. *AMB Express* 7 (1): 40. doi:10.1186/s13568-017-0336-y.

Yamashita T, Ookawa N, Ishida M, Kanamori H, Sasaki H, Katayose Y, Yokoyama H, et al. 2016. A Novel Open-Type Biosensor for the in-Situ Monitoring of Biochemical Oxygen Demand in an Aerobic Environment. *Scientific Reports* 6 (December): 38552. doi:10.1038/srep38552.

Yassin AF, Kroppenstedt RM, Ludwig W. 2003. *Corynebacterium glaucum* Sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (3): 705–9. doi:10.1099/ijs.0.02394-0.

Yildiz BS. 2016. Performance Assessment of Modified Biosand Filter with an Extra Disinfection Layer. *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA* 65 (3): 266–76. doi:10.2166/aqua.2016.103.

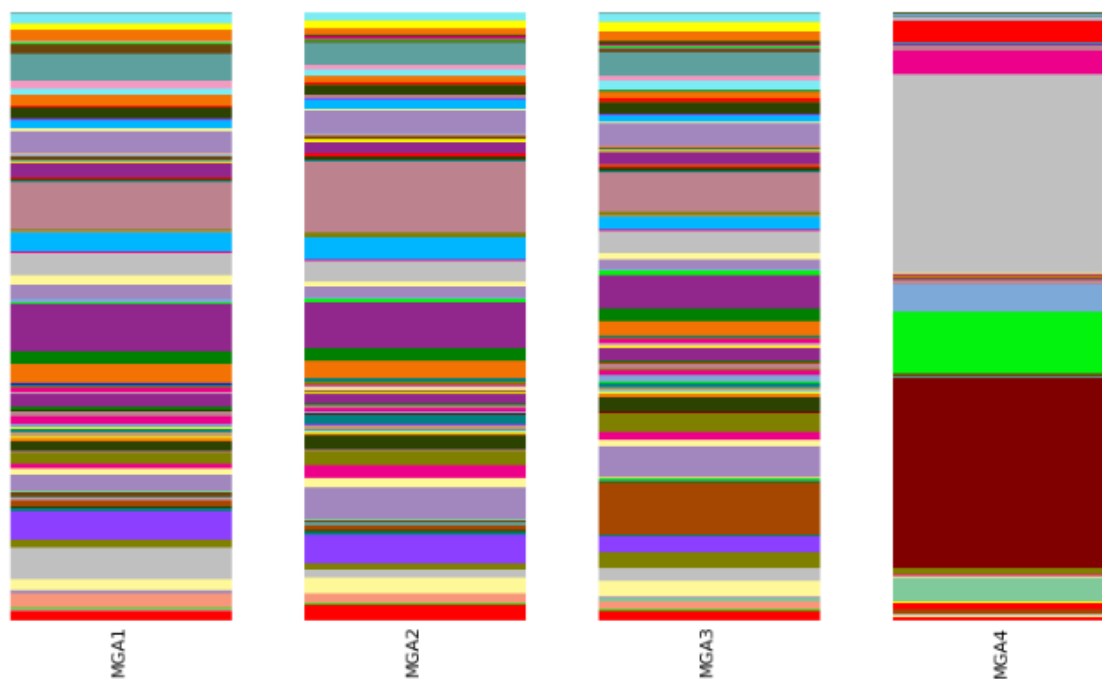
Yin R, Zhai Q, Yu L, Xiao Y, Wang G, Yu R, Tian F, Chen W. 2016. The binding characters study of lead removal by *Lactobacillus plantarum* CCFM8661. *European Food Research and Technology* 242: 1621–1629. doi:10.1007/s00217-016-2661-9.

You YW, Han J, Chiu PC, Jin Y. 2005. Removal and Inactivation of Waterborne Viruses Using Zerovalent Iron. *Environmental Science and Technology* 39 (23): 9263–69. doi:10.1021/es050829j.

Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (2): 316–22.

## ANEXO 1

Porcentajes de bacterias obtenidas a nivel de orden

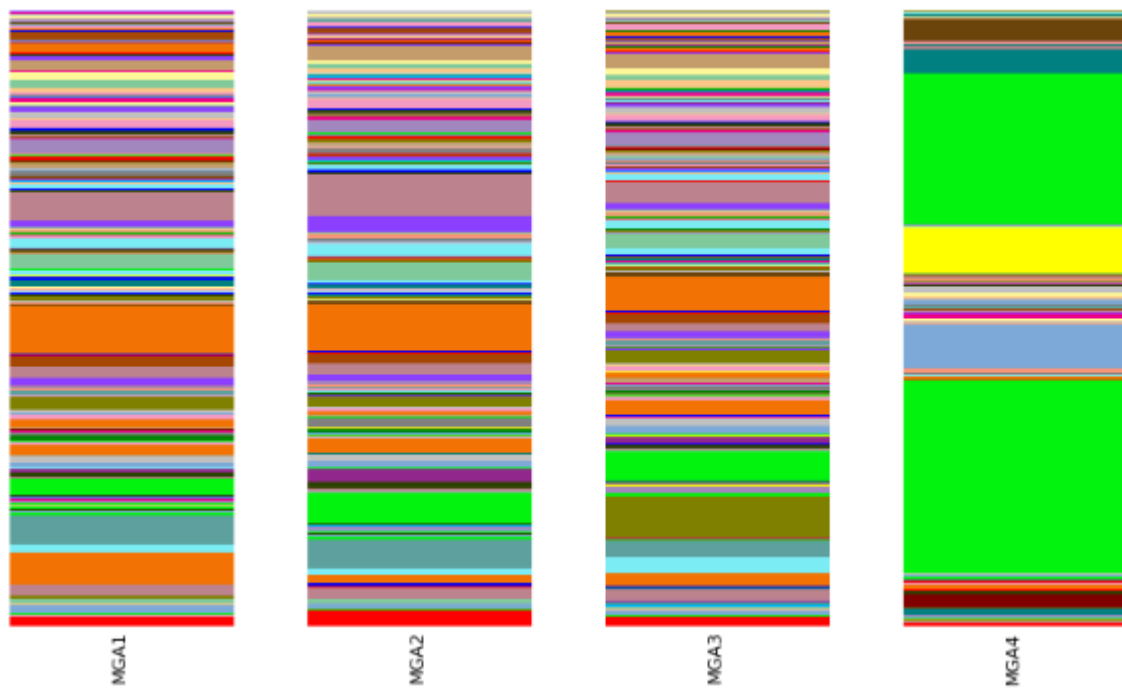















Color	Nombre	%			
		MGA1	MGA2	MGA3	MGA4
■	<i>Xanthomonadales</i>	4.3	3.7	3.8	0.3
■	<i>Myxococcales</i>	3.7	3.5	3.5	0.2
■	<i>Burkholderiales</i>	7.8	11.8	6.5	0.9
■	<i>Sphingomonadales</i>	3.3	3.5	2.1	0.0
■	<i>Rhodospirillales</i>	3.7	3.3	3.6	32.8
■	<i>Planctomycetales</i>	7.8	7.5	5.5	0.1
■	<i>Cytophagales</i>	2.7	5.3	5	0.0
■	<i>RB41</i>	4.7	4.6	2.4	0.0
■	<i>Sva0725</i>	5	1.3	2.1	0.2
■	<i>Actinomycetales</i>	1	0.8	8.5	0.9



■	<i>Enterobacteriales</i>	0.2	0.1	0.3	3.6
■	<i>Rickettsiales</i>	0.2	0.3	0.2	3.7
■	<i>Clostridiales</i>	0.5	0.1	1	4.2
■	<i>Lactobacillales</i>	0.1	0.0	0.0	10.3
■	<i>Streptophyta</i>	0.1	0.0	0.0	31.1
■	<i>Bacteroidales</i>	0.1	0.1	0.1	3.9

Porcentaje de bacterias obtenidas a nivel de género.



Color	Nombre	%			
		MGA1	MGA2	MGA3	MGA4
	Familia : <i>Comamonadaceae</i> , Género: desconocido	4.6	6.9	3.4	0.6
	<i>Kaistobacter</i>	1.7	2.1	1.2	--
	<i>Planctomyces</i>	7.8	7.5	5.5	0.1
	<i>Gemmata</i>	1.7	1.7	1.2	0.1
	<i>Nitrospira</i>	2.1	1.7	2.1	0.3
	Familia: <i>Cytophagaceae</i> Género: desconocido	2.5	5.1	4.8	0.0
	<i>Chloracidobacterium</i>	4.7	4.6	2.4	0.0
	<i>Corynebacterium</i>	--	--	6.8	0.0
	Familia: <i>Enterobacteriaceae</i> Género: desconocido	0.1	0.0	0.1	3.6
	<i>Gluconobacter</i>	0.1	--	0.0	24.6
	Familia: <i>Acetobacteraceae</i> Género: desconocido	0.2	0.0	0.0	7.7
	<i>Lactobacillus</i>	0.0	0.0	0.0	6.9
	Orden: <i>Streptophyta</i> Género: desconocido	0.1	0.0	0.0	31.1

# RESUMEN BIOGRÁFICO

**Mariela Garfio Aguirre**

Candidato para el grado de

**Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología**

**Tesis: ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA PRESENTE EN SISTEMAS DE FILTRACIÓN LENTA EN ARENA ADICIONADOS CON DIFERENTES METALES**

**Campo de estudio:** Microbiología

## **Biografía**

**Datos personales:** Nacida en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua, el 21 de noviembre de 1991, hija de Ismael Garfio Olivas y Guadalupe Aguirre González.

**Educación:** Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, grado obtenido: Químico Bacteriólogo Parasitólogo 2013.