

**Evaluación de la presencia de microorganismos  
indicadores de contaminación en agua  
subterránea del Parque Nacional Cabo Polonio**

**Lic. Martina Soumastre**

**TESIS DE MAESTRÍA, PEDECIBA**

**Área BIOLOGÍA,**

**Sub-Área MICROBIOLOGÍA**

**Octubre 2016**

**Tutor: Dra. Claudia Piccini**

**Departamento de Microbiología**

**Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo**

**Co-tutor: Dra. Lorena Rodríguez-Gallego**

**PDU Sistemas Acuáticos**

**Centro Universitario Regional Este, Rocha**

*El presente trabajo de tesis representa la primera investigación de carácter científico sobre el estado de contaminación del agua subterránea del Parque Nacional Cabo Polonio. Esperamos que la información generada sirva de insumo para la elaboración de su Plan de Manejo y aporte conocimiento para la generación de estrategias preventivas y/o correctivas que apunten a la conservación de la calidad y al uso sustentable del recurso.*

## **RESUMEN**

En el Parque Nacional Cabo Polonio (PNCP, Rocha, Uruguay) el agua dulce utilizada para consumo humano proviene de perforaciones realizadas en la napa freática, de pozos conocidos comúnmente como “cachimbas” o “pozos de primera napa”. Debido a la falta de ordenamiento territorial, las cachimbas se localizan a pocos metros de distancia de los pozos sépticos de las viviendas donde se disponen las aguas residuales domésticas. La geomorfología arenosa del sitio ha favorecido el intercambio de agua entre pozos, contaminando el agua de las cachimbas. El consumo de la misma, contaminada con microorganismos entéricos puede provocar infecciones gastrointestinales graves en el hombre.

El objetivo de esta tesis consistió en estudiar la dinámica y el potencial patogénico de bacterias y virus entéricos presentes en el agua subterránea destinada a consumo del PNCP, en épocas de alta (AAP) y baja afluencia de personas (BAP). Para ello se recolectaron muestras de agua de 24 cachimbas ubicadas en distintas zonas del Parque, zona de rocas (ZR), de dunas (ZD), con vegetación (ZV) y el centro poblado (ZC), durante dos años consecutivos (2013 y 2014). Se emplearon métodos de detección de patógenos dependientes e independientes de cultivo como la filtración en membrana (FM), la hibridación *in situ* fluorescente (CARD-FISH) y la PCR en tiempo real. La abundancia de enterobacterias mostró valores similares a la descrita para sistemas límnicos. Se detectó la presencia de los genes *stx* y *eae* correspondientes a los principales patotipos de *E. coli* (productores de toxina Shiga, enterohemorrágico y enteropatogénico) responsables de provocar

enfermedades de tipo diarreicas en el hombre debido al consumo de agua contaminada. La presencia de dichos genes se asoció a su vez a la presencia de coliformes fecales en las muestras. Se demostró que la mayor contaminación por enterobacterias en el agua subterránea del Parque tuvo lugar durante las épocas de alta temporada, asociada a los aportes alóctonos de materia orgánica, principalmente por el ingreso de fósforo proveniente de los pozos sépticos cercanos a las cachimbas. Asimismo, se detectó la presencia de rotavirus en dos de las muestras de agua analizadas, resaltando la importancia de evaluar otros microorganismos indicadores además de las bacterias fecales al momento de estudiar el nivel de contaminación de un cuerpo de agua. Se constató la existencia no solo de diferencias temporales en cuanto a la abundancia de microorganismos indicadores de contaminación (alta temporada vs. baja temporada y entre los distintos años), sino también una distribución espacial muy marcada de la presencia de coliformes fecales. Esto podría estar directamente vinculado a factores tales como las precipitaciones, el flujo subterráneo de agua y el número de personas que visitaron el área protegida durante el período analizado. Finalmente se demostró que la menor contaminación del agua subterránea del Parque tuvo lugar en la zona de vegetación nativa (humedales), indicándose que la misma podría emplearse como filtro natural para prevenirla. Sin embargo, se requieren estudios más detallados para evaluar con precisión la función de los humedales y su posible uso para recuperar la calidad del agua en la zona. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan información actualmente no disponible sobre la calidad del agua dulce del PNCP que puede ser empleada en el diseño de estrategias de uso y conservación de la misma.

# **INTRODUCCIÓN**

## **Importancia del agua como recurso natural**

El agua es uno de los recursos naturales más valiosos del planeta, sustenta la vida en la Tierra, la diversidad biológica y el desarrollo económico (Bathia y Goyal., 2013). Constituye cerca del 70% de la corteza terrestre, donde el 97.5% corresponde a agua salada y el 2.5% a agua dulce (Carpenter *et al.*, 2011; Bu *et al.*, 2009; EPA, 2002). De este pequeño porcentaje de agua dulce, la mayor parte se encuentra en forma de hielo en los glaciares (68.7%), otra fracción se encuentra por debajo de la superficie de la tierra constituyendo las aguas subterráneas (30%), otra en forma de hielo permanente (1%) y un 0.3% en los cuerpos de agua superficiales (ríos, lagos, arroyos) (Carpenter *et al.*, 2011; UNESCO, 2006). Estos valores indican que si bien existe una gran disponibilidad de agua dulce en el planeta solo una fracción muy pequeña (0.4%) puede ser aprovechada directamente por el hombre.

Desde la antigüedad, el desarrollo de las grandes ciudades ha estado estrechamente vinculado a este recurso, representando un factor importante en la selección de sitios claves donde ubicar a las industrias, así como a los centros urbanos y agropecuarios (Carpenter *et al.*, 2011; Moreno Franco *et al.*, 2010). Además de la agricultura, el ser humano utiliza el agua para llevar adelante otras actividades igualmente importantes como la producción de alimentos, de energía, de medicamentos, la navegación, la pesca, el turismo y la recreación, el vertido de efluentes y fundamentalmente el consumo de agua potable (Carpenter *et al.*, 2011; Carpenter *et al.*, 1998). El acceso a ésta y al saneamiento ha sido declarado un derecho humano esencial por la

Organización de las Naciones Unidas, por constituir una necesidad primordial para la salud del hombre (WHO., 2004; FAO., 1997; WHO., 1993).

Los servicios ecosistémicos son los beneficios directos o indirectos que el hombre puede obtener de los ecosistemas (Nin., 2015; Brauman *et al.*, 2007). En el caso de los ecosistemas acuáticos, los beneficios directos más importantes son su utilización como fuente de agua para consumo y para la producción de alimentos. Entre los servicios indirectos se destacan los procesos implicados en el funcionamiento de los ecosistemas en sí, como ser la fotosíntesis, el ciclado de los nutrientes, la neutralización de los contaminantes, los procesos de autodepuración, entre otros. Los ecosistemas acuáticos son también importantes por sus valores estéticos y culturales (Unión Europea., 2010), por su capacidad para sostener procesos comerciales varios (incluida la pesca y la navegación) así como para proveer servicios de recreación, investigación científica y educación (Chalarca *et al.*, 2007).

Sin embargo, el hombre puede disminuir la capacidad de los ecosistemas de proveer estos servicios, ya sea alterando la estructura y composición de los mismos o extrayendo elementos a un ritmo superior al de su capacidad de recuperación (WHO., 2004). La contaminación de los sistemas acuáticos debido a la actividad del hombre es un problema cada vez más frecuente (Perdomo *et al.*, 2001). Al problema de la contaminación, que comenzó a hacerse notorio a principios del siglo XIX, se suma el problema de la escasez, aspecto que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta. Los factores asociados a la misma son principalmente el crecimiento demográfico no controlado y el incremento abrupto de las demandas por parte del hombre

(WHO., 2004). Las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente para evitar la contaminación del agua y los riesgos que de ella surgen han contribuido a atenuar parcialmente esta situación. Sin embargo, el descubrimiento de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos, como ser los llamados contaminantes emergentes, dejan en claro la necesidad de continuar investigando sobre el uso sostenible de este recurso (WHO., 2004; FAO., 1997).

El agua subterránea es una fuente crucial de agua dulce en todo el mundo. Desafortunadamente la calidad de la misma en gran parte de éste se ha deteriorado (EPA., 2002), debido a los mismos factores que afectan a los cuerpos de agua superficiales (aumento de la población, actividades antropogénicas como las agrícolas y las industriales). Muchos de los impactos son irreversibles (Kazakis y Voudouris., 2015). A pesar de ello, existe un consenso general sobre su utilización como fuente de agua segura para consumo humano, ya que se considera que en su estado natural es de mejor calidad que la de los cuerpos de agua superficiales (Nounou *et al.*, 2013; Ferguson *et al.*, 2012; John y Rose., 2005).

A nivel mundial el agua subterránea suele utilizarse en actividades agrícolas (70%), para el abastecimiento humano (25%) y para el funcionamiento de las industrias (5%) (Collazo y Xavier., 2012). En Uruguay, estos porcentajes se mantienen (70% actividades agrícolas, 25% actividades humanas, 5% actividades industriales) y se destaca que aproximadamente un 28% del total del agua suministrada por OSE (Obras Sanitarias del Estado) proviene de las fuentes subterráneas (Collazo y Xavier., 2012). Es importante señalar además que desde mediados de la década del '90 ha tenido lugar una

tendencia ascendente en cuanto a los usos de esta fuente de agua dulce para abastecimiento humano. Por ejemplo en la actualidad, la gran mayoría de las localidades del interior de nuestro país se abastecen exclusivamente de perforaciones en las napas freáticas (Collazo y Xavier., 2012; Perdomo *et al.*, 2001; OPP., 1992). A nivel internacional, países desarrollados como Estados Unidos y Canadá también cuentan con pozos domésticos privados (perforaciones en el suelo) de donde se extrae agua subterránea como fuente para consumo humano (Hynds *et al.*, 2014). En Estados Unidos por ejemplo estos pozos suministran agua a más de 45 millones de personas (US Bureau of the Census, 2008; John y Rose., 2005), mientras que entre 3 y 4 millones de habitantes en Canadá son atendidos por suministros de este tipo (Charrois., 2010). La mayoría de estos pozos se localizan en zonas rurales, por lo que suelen estar expuestos a diversas fuentes de contaminación (Rhymes *et al.*, 2015).

### **Fuentes de contaminación de los sistemas acuáticos**

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define a la contaminación del agua como “la introducción en el ambiente acuático de sustancias productoras de efectos deletéreos que pueden causar daños a los recursos vivientes, riesgos para la salud humana, obstáculos para las actividades acuáticas (incluida la pesca), el deterioro de la calidad de la misma para consumo y la reducción de los medios de recreo” (FAO., 1997). Otra definición más general implica la alteración de las propiedades físicas, químicas y/o biológicas debido a procesos naturales o artificiales que producen resultados indeseables (Collazo y Xavier., 2012). En lo

que respecta a las fuentes de contaminación del agua subterránea, éstas son más difíciles de detectar que las que afectan a los cuerpos de agua superficiales, ya que no son visibles. Sin embargo, una vez que han sido detectadas es probable que se encuentren afectando a una gran parte del acuífero (Collazo y Xavier., 2012).

En principio, los agentes contaminantes involucrados en la contaminación del agua subterránea no son distintos de los que ocasionan la contaminación del agua superficial. Entre ellos se destacan nitratos, materia orgánica (biodegradable o no), compuestos tóxicos orgánicos e inorgánicos, metales pesados, microorganismos patógenos, elementos radioactivos, entre otros. Aunque el tipo de contaminante determina en cierta medida el nivel de contaminación, las condiciones del flujo subterráneo confieren a la contaminación de las aguas subterráneas ciertos rasgos que la diferencian de la de las aguas superficiales (Collazo y Xavier., 2012; FAO., 1997). Es importante mencionar que una vez que el contaminante se ha incorporado al flujo subterráneo resulta muy difícil y costoso detectar su presencia, conocer su desplazamiento y detenerlo antes de su llegada a pozos o sitios de explotación. A su vez, en muchos casos resulta prácticamente imposible eliminarlos del agua subterránea, resultando en un proceso generalmente irreversible. Por tanto, la mejor manera de disminuir o controlar la contaminación de los acuíferos es evitar la entrada de los contaminantes a los mismos. El método preventivo más eficaz consiste en una adecuada ordenación del territorio, el cual podría implicar la realización de una serie de estudios geológicos e hidrogeológicos para conocer las posibles fuentes de contaminación (Collazo y Xavier., 2012; WHO., 2004).

En esta tesis hemos considerado como agua subterránea a la obtenida de perforaciones directas en la napa freática del sitio de estudio. Por este motivo, a continuación se describen las principales formas de contaminación de la misma.

- **Contaminación orgánica**

La materia orgánica (MO) está compuesta por un grupo heterogéneo de compuestos químicos, donde el carbono (C) es el más prevalente (Pinckney *et al.*, 2001). Por esta razón suele cuantificarse en términos de unidades de C. Está constituida por una fracción particulada (MOP) y otra disuelta (MOD), la distinción entre una u otra es arbitraria y depende de los métodos empleados en su fraccionamiento. La MOP suspendida en la columna de agua está compuesta principalmente por bacterias, fitoplancton, zooplancton, materia fecal (heces) y material vegetal en descomposición (detritus). Por otra parte, las sustancias húmicas, los mucopolisacáridos, los péptidos y los lípidos forman la MOD (Pinckney *et al.*, 2001). La MOD incluye a los nutrientes inorgánicos requeridos para el crecimiento y el metabolismo de las bacterias heterótrofas (Azam *et al.*, 1983), así como para el fitoplancton y los flagelados heterótrofos (Sherr., 2002). Las bacterias heterótrofas son capaces de utilizar la MO a través de la respiración, la producción de biomasa nueva y la hidrólisis enzimática (Azam *et al.*, 1983). La MOD también puede ser degradada a compuestos más lábiles de bajo peso molecular por la acción fotoquímica del sol (Piccini *et al.*, 2009; Biddanda y Cotner., 2003; Miller y Moran., 1997).

Las fuentes de MO en un curso de agua pueden ser autóctonas o alóctonas, dependiendo de si su origen tiene lugar dentro o fuera del sistema;

respectivamente (Pinckney *et al.*, 2001). La fotosíntesis realizada por los productores primarios y la actividad de la comunidad bentónica contribuyen al aporte autóctono de MO al sistema. Las actividades agrícolas, las ganaderas y el vertido de efluentes domésticos e industriales a los cuerpos de agua se consideran fuentes alóctonas de MO (FAO., 1997).

En el caso de las aguas subterráneas, los principales aportes de MO tienen lugar a través de las infiltraciones a la napa freática, mediante la escorrentía y lixiviación; debido principalmente a prácticas agrícolas (Hurst., 2002). Otros mecanismos incluyen la percolación desde aguas superficiales, tanques y pozos sépticos o líneas de drenaje con fugas (Stewart *et al.*, 2008; Hurst., 2002). Cuando el agua subterránea conteniendo MO alcanza los cuerpos de agua superficiales favorece el proceso de eutrofización (USEPA., 2002; Pinckney *et al.*, 2001; National Academy of Sciences, 1969). En rasgos generales, las consecuencias inmediatas de este proceso son la aparición de floraciones o “*blooms*” de algas y cianobacterias, la disminución de la diversidad biológica y la pérdida de la calidad del sistema de agua afectado (Pinckney *et al.*, 2001; Carpenter *et al.*, 1998; National Academy of Sciences, 1969). La eutrofización puede ocurrir de forma natural o artificial debido a la actividad del hombre (eutrofización antrópica); en ambos casos asociada a los aportes de MO, nitrógeno (N) y fósforo (P) al sistema (Pinckney *et al.*, 2001; Carpenter *et al.*, 1998).

- **Contaminación química**

La contaminación del agua dulce por compuestos químicos es el resultado de las prácticas agrícolas, de la deposición atmosférica, de las

actividades mineras, del vertido de aguas servidas provenientes de plantas industriales y centros urbanos, entre otras (Carpenter *et al.*, 2011). Dentro de estas, la agricultura constituye la principal fuente de contaminación del agua subterránea por nitratos y fosfatos en gran parte del mundo, fundamentalmente por la utilización de fertilizantes y plaguicidas (FAO., 2002). El problema de la contaminación del agua con fertilizantes se debe a que éstos se aplican en concentraciones superiores a la capacidad que tienen los cultivos de absorberlos, de manera que los excesos de nitrógeno (N) y fósforo (P) se infiltran en las aguas subterráneas o son arrastrados hacia los cuerpos de agua superficiales (Kim *et al.*, 2015; FAO., 2002). La contaminación química por N y P es la más frecuente en un ecosistema acuático; si bien el P en agua no tiene efectos tóxicos directos en el hombre y/o los animales, promueve el crecimiento de *blooms* de algas y cianobacterias (Carpenter *et al.*, 1998). Por otra parte, el consumo de agua contaminada con nitratos sí supone un riesgo directo para la salud del hombre; especialmente si se presenta en concentraciones superiores a los 10 mg/L (EPA., 1996).

Además de los compuestos inorgánicos como los nitratos, fosfatos, sulfatos y otros, los contaminantes químicos pueden ser metales pesados como el plomo y el mercurio. Dependiendo de la concentración en la que se encuentren en el agua, pueden ser tóxicos para la biota acuática o el hombre (Carpenter *et al.*, 2011; FAO., 2002; Carpenter *et al.*, 1998). De manera similar, los usos intensivos de insecticidas, herbicidas y fungicidas afectan la calidad del agua dulce con su aporte de compuestos químicos de variada naturaleza, muchos de los cuales permanecen durante períodos prolongados en el ambiente (FAO., 2002). A este tipo de contaminantes se les conoce como

COPs (Contaminantes Orgánicos Persistentes), ya que por sus características fisicoquímicas resisten a la degradación fotoquímica y biológica (Albert., 1997). Uno de los problemas más importantes de los COPs es que suelen bioacumularse en numerosas especies y biomagnificarse a través de las redes tróficas, hasta llegar al ser humano. Sus efectos adversos en éste pueden ocurrir a corto y a largo plazo, pudiendo estar relacionados con una exposición directa o indirecta al contaminante (FAO., 2002; Albert., 1997).

- **Contaminación microbiana**

La contaminación microbiana del agua ha dado lugar a numerosos brotes de enfermedades en la población humana (Yoder *et al.*, 2004; Jamieson *et al.*, 2004; WHO., 1993), la mayoría de ellas gastrointestinales transmitidas a través de la ruta fecal-oral (WHO., 1993). Los principales mecanismos de propagación son la ingestión y el contacto con agua contaminada (Solarte *et al.*, 2006), siendo los agentes etiológicos principalmente implicados los virus y bacterias entéricas, así como los protozoarios (Girones *et al.*, 2010; John y Rose., 2005; Hurst *et al.*, 2002). La presencia de estos microorganismos con potencial patogénico en el agua subterránea supone un riesgo a la salud pública, ya que numerosas perforaciones se realizan en los acuíferos con el objetivo de explotar este recurso (Collazo y Xavier., 2012).

Los virus entéricos incluyen especies que pertenecen a varios géneros, entre ellos *Rotavirus*, *Norovirus*, *Adenovirus*, Virus de la Hepatitis A y *Poliovirus* (Bentancour., 2013). Se destacan por su capacidad de sobrevivir en el ambiente bajo un rango amplio de pH e incluso por permanecer infectivos

durante varios días, aún en ambientes con bajas temperaturas (Bentancour., 2013; Gutiérrez., 2013; Fong y Lipp., 2005). En particular, los rotavirus son buenos indicadores de contaminación fecal ya que tienen la capacidad de permanecer estables durante meses una vez que han ingresado al ambiente (Bentancour., 2013). En el caso de norovirus, su importancia radica por ocasionar brotes de gastroenteritis por el consumo de alimentos y agua contaminada (Schultz *et al.*, 2011). En general, los virus entéricos se introducen en los cursos de agua como resultado de actividades antropogénicas varias, tales como el vertido de efluentes o desagües domésticos (Bosch *et al.*, 2008). Suelen transmitirse a través de la ruta fecal-oral y ser excretados en cantidades extremadamente altas en las heces de los individuos infectados, típicamente entre  $10^5$  y  $10^{11}$  partículas virales por gramo de materia fecal (Bosch *et al.*, 2008; Fong y Lipp., 2005). La importancia de su detección temprana radica en su capacidad de causar enfermedades agudas aún con dosis infectivas bajas (Fong y Lipp., 2005).

Los protozoarios comúnmente asociados a las enfermedades transmitidas por el agua son *Cryptosporidium sp* y *Giardia sp* (Solarte *et al.*, 2006). Dentro del género *Cryptosporidium*, hasta el momento se han identificado cerca de doce especies incluida *Cryptosporidium parvum*; conocida por ser el principal agente etiológico responsable de un gran número de epidemias en diversas partes del mundo (Solarte *et al.*, 2006). Por otra parte, los protozoarios flagelados del género *Giardia* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Su modo de transmisión principal es la ruta fecal-oral (Solarte *et al.*, 2006).

Las bacterias entéricas son microorganismos ubicuos que poseen una alta relación superficie-volumen en comparación con otros microorganismos (Brock *et al.*, 2004). Debido a su potencial patogénico, su presencia en el agua destinada a consumo humano, incluidas las fuentes subterráneas, fue reconocida como un problema importante para la salud pública desde hace ya varios años (Proctor y Hammes., 2015; Paruch y Maehlum., 2012; Girones *et al.*, 2010). Las enterobacterias patógenas transmitidas por el agua de mayor relevancia para la salud pública incluyen a especies pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, así como a los diferentes patotipos diarreogénicos de *Escherichia coli* (Girones *et al.*, 2010; John y Rose., 2005; EPA., 2001). La principal ruta de ingreso de estos microorganismos al hombre es mediante el consumo de agua o alimentos contaminados, generalmente en sitios donde las condiciones sanitarias son escasas (Paruch y Maehlum., 2012; Girones *et al.*, 2010).

Generalmente la detección de virus y bacterias patógenas en los sistemas acuáticos naturales se realiza mediante el enriquecimiento y posterior siembra en medios de cultivo selectivos y diferenciales (Girones *et al.*, 2010). La principal limitación que supone este procedimiento está relacionada con el tiempo que requiere el análisis de una muestra, debido a que la mayoría de los microorganismos patógenos se encuentran en muy bajas concentraciones en el ambiente. Esto implica la necesidad de realizar una etapa previa de concentración de la muestra, la cual generalmente insume varios días de análisis en el laboratorio (Gutiérrez., 2013; Katayama *et al.*, 2010). Estas limitaciones han conducido a la utilización de microorganismos indicadores de

la posible presencia de patógenos en agua, los cuales suelen detectarse con mayor facilidad y rapidez (Girones *et al.*, 2010; EPA., 2002).

Algunas de las características que debe reunir un microorganismo para poder ser empleado como indicador de contaminación son: ausencia de atributos de virulencia, fácilmente cuantificable, persistencia y crecimiento similar a la del microorganismo patógeno y preferentemente debe ser resistente a los agentes desinfectantes en la misma tasa que el microorganismo patógeno (Stetler., 1984). Debido a sus atributos, las bacterias suelen considerarse buenas indicadoras de contaminación fecal en los diferentes niveles de organización (Baudart y Lebaron., 2010). A escala de comunidad, constituyen herramientas de diagnóstico eficaces para el monitoreo de ambientes acuáticos complejos (Borruso *et al.*, 2015). A nivel individual, su detección temprana e identificación resultan claves para evitar el desarrollo de enfermedades hídricas (Proctor y Hammes., 2015; Girones *et al.*, 2010).

Las bacterias entéricas pueden emplearse como indicadoras de contaminación fecal del agua ya que naturalmente constituyen la microbiota intestinal de los individuos homeotérmicos, incluido el hombre (Percival y Williams., 2014; Paruch y Maehlum., 2012; Neish; 2009; Leclerc *et al.*, 2001). Esto implica que su presencia en una muestra estará asociada a las descargas de materia fecal en los cursos de agua (CYTED., 2003). Los microorganismos comúnmente empleados como indicadores de contaminación fecal en agua, incluida la subterránea, son las bacterias coliformes totales (CT), los enterococos y los coliformes fecales (CF) (Ferguson *et al.*, 2012; Savichteva y Okabe., 2006; WHO., 2004). Los coliformes son bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (bacterias entéricas). No forman

esporas, son aeróbicas o anaeróbicas facultativas y tienen la capacidad de fermentar lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban a 35 °C durante 48h (Madigan *et al.*, 2004; APHA., 1995; WHO., 1993). Poseen la enzima beta-galactosidasa y carecen de la citocromo oxidasa (EPA., 2002). Los géneros bacterianos que componen este grupo son *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y algunas especies de *Klebsiella* (Chu *et al.*, 2012; Schraft y Watterworth., 2005). A pesar que los coliformes se introducen en gran número en el ambiente mediante las heces de animales y humanos, muchos son de vida libre y pueden transmitirse al hombre por el contacto con agua y/o alimentos contaminados (Madigan *et al.*, 2004). Los CF corresponden a un subgrupo dentro de los CT capaces de fermentar lactosa a 44.5 °C, por esta característica se les conoce como termo-tolerantes (Madigan *et al.*, 2004; CYTED, 2003). Actualmente se reconoce el empleo de la especie *Escherichia coli* como el indicador más adecuado de contaminación fecal en agua por ser constituyente de la microbiota intestinal de los individuos sanos (Percival y Williams., 2014; Paruch y Maehlum., 2012; Neish; 2009; Leclerc *et al.*, 2001). Por el mismo motivo, la mayoría de las cepas circulantes de *E. coli* no son peligrosas para el hombre (Percival y Williams., 2014; Neish., 2009). Sin embargo, algunas han desarrollado la capacidad de provocar enfermedades en el hombre y en los animales (Tozzoli y Scheutz en Morabito., 2014) al haber adquirido genes de virulencia, principalmente mediante mecanismos de transferencia horizontal (Paruch y Maehlum., 2012). La presencia de estos genes en agua es por tanto un indicador de contaminación por microorganismos patógenos (Leclerc *et al.*, 2001).

Dentro de las enfermedades provocadas por las cepas de *E. coli* patogénicas en el hombre se destacan diarrea, peritonitis, mastitis, gastroenteritis, septicemia, meningitis neonatal, infecciones del tracto urinario, síndrome urémico-hemolítico, enfermedades respiratorias, entre otras (Huang *et al.*, 2016; Percival y Williams., 2014). Las mismas pueden transmitirse a través del agua o alimentos contaminados o a través del contacto directo con animales o personas infectadas. Dependiendo del sitio del hospedero que colonizan y del mecanismo de patogenicidad implicado estas cepas pueden clasificarse en dos grupos: diarreogénicas (DEC) o extraintestinales (ExPEC) (Tozzoli y Scheutz en Morabito., 2014). En las primeras, la enfermedad se produce dentro del tracto gastrointestinal, mientras que en las ExPEC la enfermedad tiene lugar fuera de éste (Tozzoli y Scheutz en Morabito., 2014). En esta tesis se evaluará la presencia del grupo de las DEC ya que son las que producen enfermedades de tipo diarreicas relacionadas con la ingesta de agua contaminada con bacterias entéricas.

Dentro de las cepas DEC se distinguen los siguientes patotipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (*E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EA<sub>g</sub>EC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Morabito., 2014; Paruch y Maehlum., 2012). Cada uno causa diarrea a través de un mecanismo diferente, manifestándose con síntomas variados que incluyen fiebre, cólicos, dolor abdominal, diarrea acuosa o con sangre, entre otros. El período de incubación de la enfermedad depende de la cepa, del mecanismo de patogenicidad implicado y del estado general de salud del hospedero (Varela *et al.*, 2007). Generalmente tiene lugar luego de

uno o dos días posteriores a la infección e incluso en determinados casos puede manifestarse luego de cinco días, como ocurre frente a una infección con EHEC (Percival y Williams., 2014). A continuación se describen las características principales de cada grupo de cepas patogénicas y se presenta un resumen de las mismas en la Tabla 1.

- *EHEC*

Las cepas enterohemorrágicas son las de mayor relevancia a nivel clínico debido a su capacidad de provocar el síndrome urémico hemolítico (SUH), el cual provoca fallas renales agudas. La dosis necesaria para el desarrollo de la enfermedad es de menos de 100 células. La cepa más estudiada de este patotipo es *E. coli* O157:H7, considerado uno de los serotipos más problemáticos y patogénicos (Kaper *et al.*, 2004). Entre los años 1982 y 2002 se reportaron brotes de *E. coli* O157:H7 en 49 estados de Estados Unidos asociados a 73000 casos de enfermedades por el consumo de agua contaminada con esta bacteria. En Holanda, *E. coli* O157:H7 se aisló a partir de muestras de agua tomadas de pozos privados y en Canadá a partir de muestras de agua superficial (Croxen y Finlay., 2010; Kaper *et al.*, 2004) .

Las cepas EHEC se caracterizan por producir la citotoxina Shiga (Stx1 ó Stx2), considerada su principal factor de virulencia (Croxen y Finlay., 2010; Kaper *et al.*, 2004). Los genes *stx* que codifican para estas toxinas se localizan en bacteriófagos lambda temperados, integrados en el cromosoma bacteriano. La liberación de estos genes desde los fagos puede dar lugar a la infección de cepas de *E. coli* no patogénicas (Morabito., 2014). Las EHEC contienen a su vez otros genes de virulencia localizados en la isla de patogenicidad LEE (del inglés *locus of enterocyte effacement*), que les confieren la capacidad de

producir lesiones del tipo “adherencia y borrado (A/E)” en las células del epitelio intestinal del hospedero (Croxen y Finlay., 2010). Por tanto, el término EHEC se utiliza para nombrar a las cepas de *E. coli* que son Stx y LEE positivas.

#### - *STEC*

Al igual que las cepas EHEC, las STEC son capaces de provocar SUH por su capacidad de sintetizar la toxina Stx. Además causan colitis hemorrágica y diarreas (Banatvala *et al.*, 2001). Estas cepas se consideran patógenos zoonóticos porque los rumiantes, especialmente el ganado vacuno, son su principal reservorio. El contacto con el animal o con el ambiente donde éste se encuentra son posibles rutas de transmisión. Otra posible vía de contagio es el agua contaminada, tanto la destinada al consumo como la de uso recreativo (Caprioli *et al.*, 2005).

Otro de los factores de virulencia de las STEC es el gen *eae* localizado en la isla de patogenicidad LEE. Este gen codifica para la proteína de membrana externa intimina, quien participa en la adherencia íntima de la bacteria a la superficie de las células eucariotas (Varela *et al.*, 2007). Sin embargo, la síntesis de esta proteína no es esencial para la patogénesis de las STEC, de hecho se han reportado casos esporádicos de SUH ocasionados por cepas STEC *eae*-negativas. Por tanto, el patotipo STEC se ha definido como aquellas cepas capaces de producir la toxina Shiga que no necesariamente contienen la isla de patogenicidad LEE (Kaper *et al.*, 2004; Paton y Paton., 1999).

#### - EPEC

El patotipo EPEC está asociado a casos de diarrea infantil en varios países en vías de desarrollo (Morabito., 2014; Varela *et al.*, 2007). Al igual que las demás cepas DEC, las infecciones producidas por este patotipo causan daños histológicos en el tracto intestinal del tipo “A/E” (Percival y Williams., 2014). Los genes que codifican para los factores de virulencia de EPEC se localizan en la isla de patogenicidad LEE, pero a diferencia de las cepas STEC no sintetizan toxina Shiga. Otros genes localizados en esta isla son *tir* (que codifica para el receptor de intimina Tir) y los implicados en la síntesis del sistema de secreción de tipo III.

#### - ETEC

Al igual que las EPEC, las infecciones por ETEC constituyen la principal causa de diarrea en niños en países en vías de desarrollo, y la comúnmente llamada “diarrea del viajero”, afectando principalmente a las personas que viajan desde países industrializados hacia otros donde las condiciones sanitarias son escasas. Las vías de transmisión al hombre incluyen la ingesta de alimentos contaminados y la falta de agua potable (Percival y Williams., 2014; Morabito., 2014). Los principales factores de virulencia de las ETEC son las endotoxinas termoestable (ST) y termolábil (LT) (Kopic *et al.*, 2014).

#### - EIEC

La patogenicidad de las cepas EIEC está relacionada con la presencia de un plásmido de alto peso molecular (pINV) que contiene los genes que codifican para los factores de virulencia IpaA-IpaH (Lan *et al.*, 2004). La

enfermedad más común provocada por este patotipo de *E. coli* es la disentería, caracterizada por una inflamación del intestino, principalmente del colon que provoca diarrea con sangre (Percival y Williams., 2014).

- *EAggEC*

Las cepas de *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) han sido identificadas como responsables de ocasionar gastroenteritis en países en vías de desarrollo así como de algunos casos esporádicos en países industrializados (Morabito., 2014).

Producen varios factores de virulencia, dentro de ellos una fimbria de adhesión agregativa, toxinas termoestables y enterotoxinas (Nataro y Kaper., 1998).

- *DAEC*

Las cepas de *E. coli* pertenecientes a este grupo son genéticamente heterogéneas y se caracterizan por producir al igual que las demás cepas DEC, el patrón de “adherencia/borrado” en las células del epitelio intestinal del hospedero (Morabito., 2014). Sus factores de virulencia más importantes son las adhesinas Daa pertenecientes a la familia Afa/Dr, adhesinas fimbriales y adhesinas no fimbriales AIDA-1, Sfa y P-pili. Estas últimas también han sido detectadas en cepas ExPEC y en cepas *E. coli* nativas (Le Bouguenec y Servin., 2006).

**Tabla 1.** Características generales de los principales patotipos de DEC.

PATOTIPO	Factor de virulencia/ Gen codificante	Lesiones o enfermedades asociadas
EPEC	Intimina/eae Receptor de intimina Tir Sistema de secreción tipo III Proteína secretada de E. coli/esp	Lesiones tipo "A/E" Diarrea infantil Diarrea "del viajero"
STEC	Toxina Shiga/stx Intimina/eae	Síndrome urémico hemolítico Diarrea sanguinolenta Colitis hemorrágica
EHEC	Toxina Shiga/stx Isla de patogenicidad LEE	Lesiones tipo "A/E" Disentería Síndrome urémico hemolítico
EIEC	Plásmido pINV IpaA-IpaH	Diarrea Disentería
EAggEC	Fimbria de adhesión agregativa Toxina termoestable (ST) Enterotoxinas	Gastroenteritis
DAEC	Adhesinas fimbriales y no fimbriales (Ej. Daa, AIDA-1, Sfa, ina P-pili)	Diarrea infantil persistente
ETEC	Factores de colonización (CFAs) Toxina termoestable (ST) Toxina termolábil (LT)/est	Diarrea acuosa Diarrea "del viajero" Fiebre

**Métodos para la cuantificación de microorganismos en sistemas acuáticos: dependientes e independientes del cultivo**

El descubrimiento de nuevos microorganismos patógenos y la re-emergencia de varios que hasta hace algunos años se creían controlados ha demostrado que si bien la utilización de indicadores clásicos de contaminación microbiana, como lo son las bacterias coliformes fecales, permite conocer el

nivel de contaminación del agua destinada a consumo humano; es necesario además disponer de metodologías rápidas, robustas y reproducibles para la detección de patógenos (Quilliam *et al.*, 2011; Girones *et al.*, 2010). Debido a las bajas dosis infectivas de muchos de los microorganismos patógenos y a la presencia de otros no necesariamente patógenos (microbiota autóctona o nativa) que pueden interferir en su detección, los métodos a utilizar deben ser extremadamente sensibles y específicos (Quilliam *et al.*, 2011). En este sentido, los actualmente disponibles pueden clasificarse en dos grandes grupos dependiendo de si requieren o no del cultivo de los microorganismos en el laboratorio.

- **Métodos dependientes del cultivo: Filtración en membrana**

La técnica cuantitativa descrita en los protocolos de evaluación de la calidad del agua de la *American Public Health Association* (APHA) tradicionalmente empleada es la filtración en membrana (FM) (APHA., 1995). Otras técnicas incluyen la fermentación en tubos múltiples (método del número más probable), el recuento en placa y el conteo directo al microscopio (Madigan *et al.*, 2004). En el presente trabajo se utilizó la técnica FM para la cuantificación de una fracción de las enterobacterias cultivables (coliformes fecales) en el agua subterránea del sitio de estudio. La FM es una metodología altamente reproducible, sencilla y rápida que permite determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) del grupo de bacterias de interés en un medio de cultivo específico (Korzeniewska y Harnisz., 2012; APHA., 1995). La muestra a analizar se filtra a través de una membrana de 0.20 ó 0.45  $\mu\text{m}$  tamaño de poro, de manera de retener las bacterias presentes sobre la superficie del filtro. Posteriormente la membrana o filtro se incuba en placas de Petri conteniendo

el medio de cultivo adecuado para el crecimiento del microorganismo de interés. Generalmente se utilizan los medios mEndo o el fecal coliform agar (mFC) (APHA., 2014., APHA., 2013; APHA., 1995).

- **Métodos independientes del cultivo: Hibridación *in situ* fluorescente y PCR en tiempo real**

Una de las principales limitantes al momento de la detección y/o cuantificación de microorganismos en muestras ambientales es que suelen encontrarse estresados o en condiciones de inanición (“*starvation*”). Este estado celular en el que las células permanecen viables pero muchas veces no es posible cultivarlas en el laboratorio se conoce como VBNC, por sus siglas en inglés “*Viable But Non Culturable Cells*” (Oliver., 2005; Roszak y Colwell., 1987). Las bacterias generalmente ingresan en este estado como consecuencia de las condiciones fluctuantes del ambiente (Quilliam *et al.*, 2011; Oliver., 2005); como ser bajas concentraciones de nutrientes, elevada presión osmótica, temperatura del agua inadecuada para el crecimiento, entre otras (Barcina *et al.*, 1997). Durante este estado las bacterias disminuyen de tamaño y experimentan altas tasas de mutación lo que dificulta lograr las condiciones óptimas para lograr su crecimiento en el laboratorio.

Es importante mencionar que muchas de las células en “*starvation*” conservan la capacidad de expresar sus genes de virulencia (Oliver., 2005), por lo que deben considerarse potenciales patógenos. La presencia de las formas VBNC de *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae* y otras bacterias patógenas supone un riesgo a la salud pública (Barcina *et al.*, 1997). Por tanto,

disponer de metodologías avanzadas para su detección y/o cuantificación que no impliquen su cultivo en medio de cultivos resulta fundamental al momento de analizar el nivel de contaminación de un cuerpo de agua con este tipo de microorganismos. En este sentido, el desarrollo de técnicas moleculares surge como una alternativa promisoría para superar las limitaciones asociadas al empleo de las técnicas tradicionales como la FM (Korzeniewwska y Harnisz., 2012). Los métodos moleculares permiten una evaluación sensible, rápida y robusta del nivel de contaminación del agua (Girones *et al.*, 2010). Los métodos más conocidos son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y hibridación *in situ* (Quilliam *et al.*, 2011; Savichteva y Okave., 2006). En este trabajo las mismas se utilizaron con el objetivo de cuantificar la abundancia de enterobacterias presentes en el agua subterránea del sitio de estudio (CARD-FISH) y evaluar la presencia de genes implicados en su virulencia (PCR en tiempo real).

#### **i) Hibridación *in situ* Fluorescente**

La técnica Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH) es una tinción específica que permite la detección de bacterias a partir de comunidades complejas de acuerdo a su afiliación filogenética, sin la necesidad de cultivarlas previamente. Se basa en el empleo de sondas de oligonucleótidos marcadas con moléculas fluorescentes (Amann *et al.*, 1995; Amann *et al.*, 1990). La molécula blanco de las mismas es el ARN ribosomal que se encuentra en la subunidad menor del ribosoma bacteriano (ARNr 16S) (Amann *et al.*, 1990). Esta molécula, de 1500 nucleótidos de longitud, cuenta con regiones conservadas y variables que permite la identificación de bacterias con distinto grado de especificidad, según

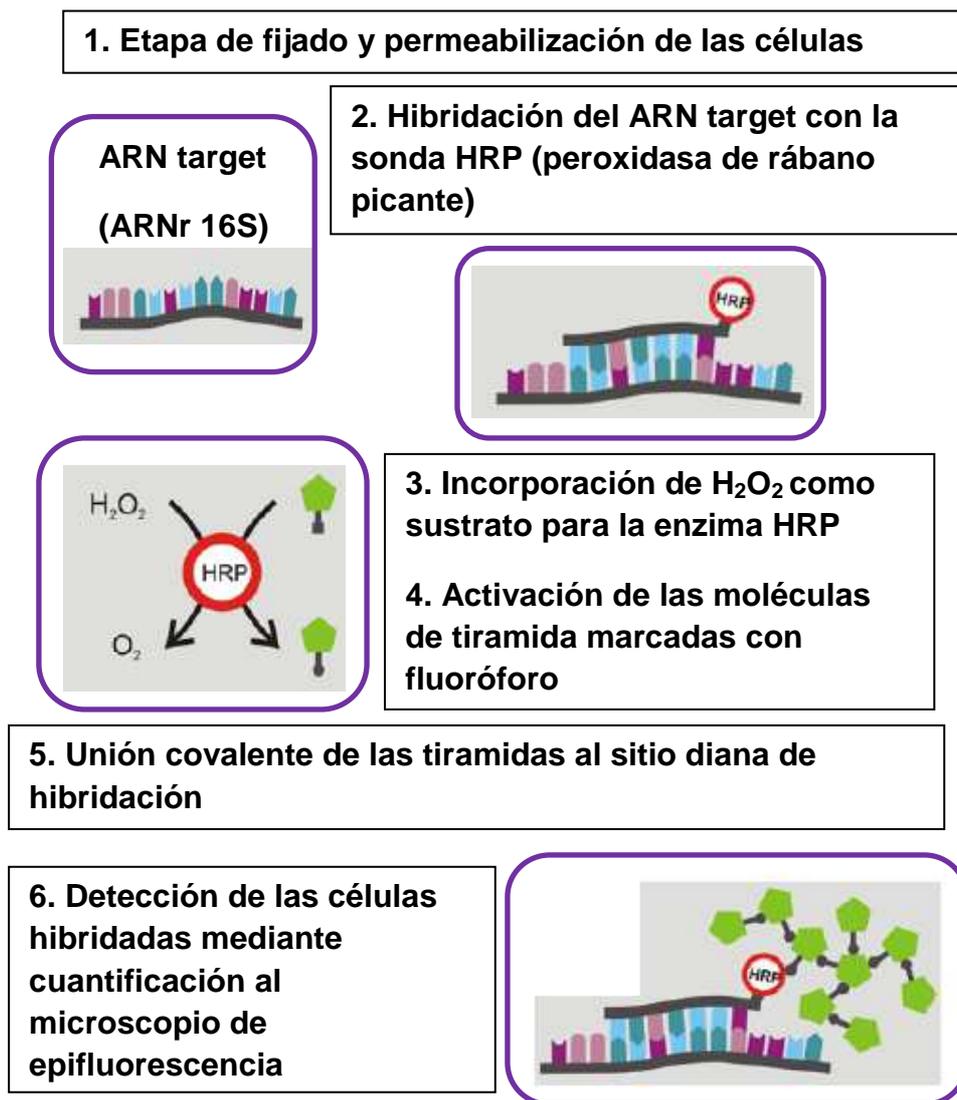
la zona de la molécula que se emplee como blanco (Woese *et al.*, 1990). En teoría, una molécula de sonda se une a una molécula de ARNr 16S presente en cada ribosoma de la célula bacteriana. Dado que la sonda se marca con un fluoróforo, cuanto mayor sea el número de ribosomas por célula, mayor será la intensidad de la señal fluorescente generada (Neuenschwander *et al.*, 2015).

La técnica FISH se describió en la década del '90 (Amann *et al.*, 1990) representando un gran avance para los estudios de ecología microbiana. En comparación con las técnicas microbiológicas convencionales, la hibridación *in situ* fluorescente permite el procesamiento de un gran número de muestras en tiempos relativamente cortos (24-72 horas), lo que representa una ventaja adicional al momento de analizar muestras de agua presuntamente contaminadas por microorganismos (Kubota., 2013). En el caso de muestras ambientales, la técnica puede presentar ciertas limitaciones debido a que la mayoría de las bacterias presentan pequeño tamaño, tienen tasas de crecimiento relativamente lentas y por tanto un bajo contenido de ribosomas (Pernthaler *et al.*, 2002., Barcina *et al.*, 1997). Esto tiene como consecuencia que la intensidad fluorescente de las células hibridadas se encuentre por debajo del límite de detección de la técnica o se pierda en el *background* que se genera (Pernthaler *et al.*, 2002). Por estos motivos, numerosos esfuerzos se han realizado con el objetivo de incrementar la sensibilidad de las hibridaciones; dentro de ellos el diseño de sondas marcadas con múltiples fluoróforos (Lebaron *et al.*, 1998) o de sondas acopladas a moléculas reporteras que permiten amplificar la señal (Pernthaler *et al.*, 2002) ha logrado superar exitosamente estas limitaciones. Sumado a esto, la existencia de numerosas bases de datos conteniendo secuencias de ADNr 16S o 23S de

microorganismos ambientales, tales como SILVA o RDP (Cole *et al.*, 2014; Priesse *et al.*, 2007), así como la disponibilidad de múltiples herramientas informáticas ha facilitado el diseño de dichas sondas (Neuenschwander *et al.*, 2015).

La Hibridación *In Situ* Fluorescente y la Desposición Catalizada por Reporteros (CARD-FISH) surgió como una herramienta alternativa a la técnica de hibridación tradicional (FISH) para la identificación y cuantificación de bacterias ambientales, mediante el empleo de sondas acopladas a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (Pernthaler *et al.*, 2002). Su actividad enzimática reductora favorece la deposición de moléculas de tiramida marcadas en el sitio donde se produce la hibridación, amplificando significativamente la señal fluorescente (Figura 1). Este aumento en la señal generada es de aproximadamente 20 a 40 veces más que la producida por la técnica FISH (Stoecker *et al.*, 2010; Pernthaler *et al.*, 2002).

En nuestro laboratorio esta técnica se ha utilizado para la caracterización de comunidades bacterianas complejas presentes en sistemas acuáticos someros de nuestro país (Alonso *et al.*, 2013; Piccini *et al.*, 2009; Alonso *et al.*, 2009; Piccini *et al.*, 2006). En esta tesis, la técnica CARD-FISH se utilizó para cuantificar la abundancia de enterobacterias (incluyendo a los coliformes fecales) en las muestras de agua recolectadas del sitio de estudio.



**Figura 1.** Esquema general de la técnica CARD-FISH. Modificado de Eickhorst y Tippkotter., 2008.

## ii) PCR en tiempo real

Las técnicas moleculares basadas en la amplificación de los ácidos nucleicos tales como la PCR constituyen herramientas útiles, rápidas, sensibles y específicas para la detección de microorganismos patógenos en muestras de agua (Girones *et al.*, 2010; Sharma y Dean-Nystrom., 2003). La PCR consiste en la amplificación exponencial de un segmento de ADN de interés (gen)

presente en una muestra mediante ciclos consecutivos de calentamiento-enfriamiento, donde una enzima termoestable (Taq polimerasa) participa replicando el ADN (Luque y Herraéz., 2006). Las reacciones de PCR pueden diseñarse con el objetivo de amplificar un único o varios productos en simultáneo, en lo que se conoce como reacciones de PCR multiplex. La ventaja de este tipo de reacciones es que permiten la detección simultánea de varias secuencias del microorganismo de interés o la de varias especies presentes en una misma muestra (Osek., 2003). En comparación con las técnicas dependientes de cultivo, la PCR reduce considerablemente el tiempo invertido en la detección de los microorganismos patógenos en muestras de agua, a pesar de sólo proporcionar datos cualitativos. Cuando el objetivo del ensayo es obtener datos cuantitativos con alta especificidad y sensibilidad, se puede utilizar la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) (Luque y Herraéz., 2006). La misma cuantifica el número de copias de uno o varios genes presentes en una muestra de agua, el cual puede aproximarse al número de células allí presentes (Quilliam *et al.*, 2011). Por tratarse de un método rápido y altamente específico, ha comenzado a utilizarse ampliamente para el estudio de la contaminación microbiana de los cuerpos de agua (Mulugeta *et al.*, 2012), representando una metodología más atractiva en comparación con los métodos dependientes de cultivo.

Actualmente se conocen dos tipos de qPCR, en uno se emplea una sonda Taqman acoplada a un fluoróforo y en otro un colorante fluorescente (generalmente SYBR Green<sup>TM</sup>), que se intercala entre las hebras del producto que se forma durante la amplificación (Kowalchuk *et al.*, 2002).

En este trabajo la técnica de qPCR se utilizó para detectar la presencia de los genes *stx* y *eae* implicados en la virulencia de los patotipos de EHEC, STEC y EPEC, el gen NSP3 y la región de unión del ORF1/ORF2 como marcadores moleculares de la presencia de rotavirus y norovirus en las muestras de agua subterránea del sitio de estudio, respectivamente.

## **Estándares de calidad admitidos en el agua destinada a consumo.**

### **Normativa nacional vigente**

En Uruguay, los cursos o cuerpos de agua superficiales del país se clasifican en cuatro clases o categorías según sus usos (Decreto N° 253 del año 1979, Dirección Nacional de Medio Ambiente, DINAMA). De esta manera, los cursos de Clase 1 corresponden a “las aguas destinadas o que pueden ser destinadas al abastecimiento de agua potable a poblaciones con tratamiento convencional”. Los de Clase 2 hacen referencia a las aguas destinadas a los sistemas de riego de cultivos para consumo humano y a las aguas de recreación por estar en contacto directo con el hombre. Los cursos de agua de Clase 3 incluyen a las aguas destinadas a la preservación de la flora y fauna acuática. Finalmente, “los cursos de agua que atraviesan las zonas urbanas o suburbanas” y las aguas destinadas al riego de cultivos cuyos productos no son consumidos por el hombre en ninguna forma, se clasifican dentro de la Clase 4. Si bien esta categorización no se aplica directamente al agua subterránea, en la presente Tesis hemos considerado al agua obtenida de los pozos del sitio de estudio dentro de la Clase 1; por representar una fuente de agua para consumo humano. En este sentido, el Decreto N° 253 de la DINAMA establece una serie

de especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas para la misma (Tabla 2), la cual hemos empleado como referencia para analizar los datos del presente trabajo. Por ejemplo, las especificaciones para nitratos en forma de N total admiten un máximo de 10 mg/L en agua para que la misma pueda ser empleada para consumo. Para el caso del P este límite es menor (0.025 mg/L). En cuanto a los parámetros microbiológicos, la norma establece un máximo permitido de 2000 UFC de CF en 100 mL de agua, para cinco muestras analizadas en el plazo de una semana (DINAMA, Decreto N° 253).

Es importante mencionar que el organismo estatal responsable del suministro de agua potable a los hogares y del funcionamiento adecuado de los sistemas de saneamiento en nuestro país es OSE (Obras Sanitarias del Estado) (OSE., 2013; Bentancour., 2013). Estos sistemas tienen la función de recolectar, transportar, tratar y disponer de forma adecuada a los líquidos residuales (Bentancour., 2013), comprendiendo por ejemplo a las aguas negras producidas por las industrias y/o los hogares domésticos (Intendencia de Montevideo., 2012). Los sistemas de saneamiento de nuestro país comprenden mayoritariamente a las redes de alcantarillado cuya disposición final tiene lugar en una planta de tratamiento (OSE., 2013). Sin embargo, no todos los sitios del territorio uruguayo cuentan con este tipo de sistemas. Las zonas rurales por ejemplo, así como muchas de las localidades del litoral este y oeste de nuestro país, contienen pozos o tanques sépticos donde se disponen sus efluentes domésticos. En estos sitios, la ausencia de saneamiento y de sistemas adecuados de disposición de los residuos líquidos genera problemas de contaminación orgánica, química y microbiana del agua, principalmente de la subterránea.

Es importante señalar que para el caso del departamento de Rocha, donde se sitúa nuestro sitio de estudio, casi la totalidad de la población tiene acceso al agua potable a través del servicio público (brindado por OSE). Sin embargo, aún se identifican zonas no conectadas al sistema de abastecimiento de agua potable y en su lugar se utiliza el agua subterránea extraída individualmente de pozos o aljibes (Intendencia de Rocha., 2012). De manera similar, la mayor parte de la población del departamento realiza la disposición final de los residuos líquidos mediante sistemas de infiltración al terreno o pozos impermeables con descargues periódicos realizadas por barométricas (Intendencia de Rocha., 2012).

**Tabla 2.** Estándares establecidos en el Decreto 253/79 de la DINAMA para cursos de agua de Clase I. Se señalan en negrita los valores admitidos para las variables analizadas en este estudio

<b>Parámetro</b>	<b>Estándar</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Estándar</b>
<i>Olor</i>	No perceptible	<i>Detergentes</i>	Máx. 0.5 mg/L
<i>Materiales flotantes y espumas no naturales</i>	Ausentes	<i>Sustancias fenólicas</i>	Máx. 0.001 mg/L
<i>Color no natural</i>	Ausente	<i>Amoníaco libre</i>	Máx. 0.02 mg/L en N
<i>Turbidez</i>	Máximo 50 NTU	<b>Nitratos</b>	<b>Máx. 10 mg/L en N</b>
<b>pH</b>	<b>6.5-8.5</b>	<b>Fósforo Total</b>	<b>Máx. 0.025 mg/L en P</b>
<b>Oxígeno Disuelto (OD)</b>	<b>Mín. 5 mg/L</b>	<b>Coliformes fecales</b>	<b>Menor a 2000 UFC/100 mL en 5 muestras</b>
<i>Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>)</i>	Máx. 5 mg/L	<i>Cianuro</i>	Máx. 0.005 mg/L
<i>Aceites y grasas</i>	Ausentes	<i>Arsénico</i>	Máx. 0.005 mg/L
<i>Cromo total</i>	Máx. 0.05 mg/L	<i>Cadmio</i>	Máx. 0.001 mg/L
<i>Mercurio</i>	Máx. 0.0002 mg/L	<i>Cobre</i>	Máx. 0.2 mg/L

<i>Níquel</i>	Máx. 0.02 mg/L	<i>Plomo</i>	Máx. 0.03 mg/L
<i>Zinc</i>	Máx. 0.03 mg/L		

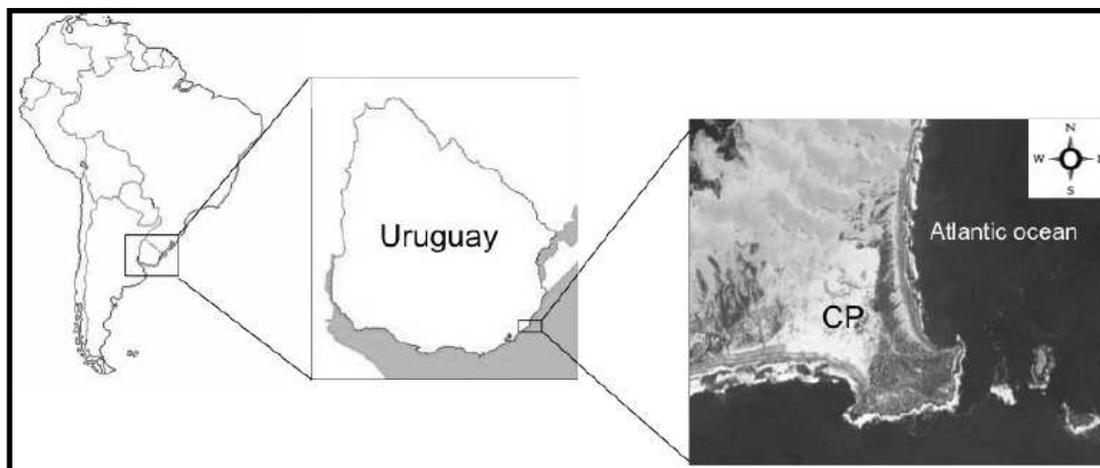
### **Fitoremediación de ecosistemas acuáticos contaminados**

En la actualidad, existe una tendencia hacia las tecnologías “verdes” o “eco-amigables” con las cuales se busca la restauración de los ambientes contaminados (incluidos los acuáticos) mediante procesos que no dañan ni perjudican al medio ambiente. Un ejemplo de estas tecnologías es la fitoremediación la cual consiste en el empleo de plantas y la energía solar para limpiar y restaurar los ecosistemas impactados (Bathia y Goyal., 2013). La vegetación típica de humedales con frecuencia se utiliza con fines de fitoremediación. Los humedales son sistemas transicionales entre los ambientes terrestre y acuático que presentan un sustrato cubierto por una capa de agua somera durante algún período del año (Mazzeo., 1999). La vegetación de los humedales está compuesta por macrófitas e hidrófitas (Mazzeo., 1999; Weaver y Clements., 1938), como por ejemplo las que crecen en la zona de vegetación del sitio de estudio (*Juncus* spp, entre otras) (*Kochia* spp, *Carex* spp, *Cyperus* spp, *Salix* spp, *Populus* spp) (Bathia y Goyal., 2013). Mediante la fitoremediación las plantas actúan como filtro biológico descomponiendo los contaminantes del ambiente, al fijarlos en sus raíces y tallos o metabolizándolos hasta convertirlos en compuestos más estables (Bathia y Goyal., 2013; EPA., 1996). Además, en la rizósfera de las plantas se generan condiciones desfavorables para el desarrollo de microorganismos patógenos, debido a la variabilidad de la concentración de oxígeno, a exudados liberados por las plantas y a la propia función de filtro físico de las mismas (EPA., 1996).

## **INTRODUCCIÓN AL SITIO DE ESTUDIO**

El área protegida Parque Nacional Cabo Polonio (PNCP) se localiza sobre la costa atlántica uruguaya, entre las coordenadas 34°24`S y 53°46`W, en el departamento de Rocha (Figura 2). La misma ingresó al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) en mayo del año 2009, por conservar elementos representativos del paisaje natural en el país (SNAP., 2009). Se trata de un área costero-marina que posee una gran variedad de ambientes naturales (playas arenosas, dunas, puntas rocosas, bosques nativos, humedales), muchos de ellos distribuidos de forma restringida en el territorio uruguayo (Spreachmann y Capandengui., 2011). La categoría de Parque Nacional busca proteger los ecosistemas que no han sido significativamente alterados por las actividades antropogénicas, con especies de flora y fauna, sitios geomorfológicos y hábitats particulares, todos con algún grado de interés científico, educativo y recreativo para el patrimonio nacional (Ley N° 17234). En el caso de los ecosistemas acuáticos se busca evitar el deterioro de las cuencas hidrográficas comprendidas dentro del área protegida, de manera de asegurar tanto la calidad como la cantidad de sus aguas (Ley N° 17234). En el caso del PNCP, en su propuesta de Plan de Manejo se establece la importancia de generar oportunidades e instancias donde sea posible promover el desarrollo de la educación ambiental, así como la realización de “investigaciones científicas aplicadas al manejo y conservación del área protegida” (Spreachman y Capandengui., 2011). El presente trabajo de tesis

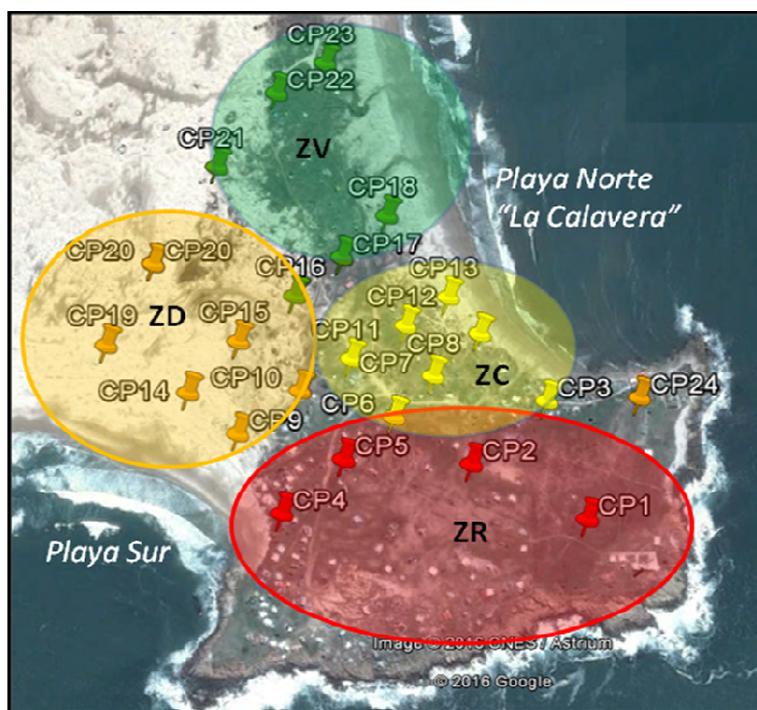
representa el primer estudio de carácter científico que describe el estado de la calidad del agua subterránea de esta área protegida.



**Figura 2.** Mapa del sitio de estudio mostrando la localización geográfica de Cabo Polonio. Figura tomada de Soumastre *et al.*, 2015.

### **Zonación característica de Cabo Polonio**

En base a recorridos de campo realizados en el PNCP, es posible distinguir en el sitio de estudio cuatro zonas bien diferenciadas. Estas son: zona de rocas (ZR), zona de dunas (ZD), centro poblado (ZC) y zona con vegetación (ZV) (Ver Figura 3). Algunas de ellas han sido descritas en los trabajos realizados por Masciardi y colaboradores (Ver Masciardi *et al.*, 2006). A continuación se describen las principales características de cada zona.



**Figura 3.** Mapa del Parque Nacional Cabo Polonio (Rocha, Uruguay) indicando la zona de rocas (ZR), zona de dunas (ZD), centro poblado (ZC) y zona con vegetación (ZV).

### Zona de rocas

Abarca la zona que rodea la península donde el oleaje marino impacta continuamente a las rocas (Masciadri *et al.*, 2006; Delfino y Masciadri., 2005). Incluye a las instalaciones del faro y comprende el predio perteneciente a la sociedad privada GABASOL S.A. El faro de Cabo Polonio es un Monumento Histórico Nacional, considerado Patrimonio Cultural de la Nación (Intendencia de Rocha., 2012).

En esta zona se han relevado una gran variedad de especies vegetales (Delfino y Masciadri., 2005); principalmente en la zona cercana a la rompiente de las olas.

### Zona de dunas

El sistema dunar de Cabo Polonio constituye el relicto más importante de dunas de la costa uruguaya, tanto por su extensión como por su altura (registro máximo de 30 m) (Spreachmann y Capandengui., 2011). Las mismas están constituidas por arenas de diferente granulometría con escasa materia orgánica y vegetación (Delfino y Masciadri., 2005).

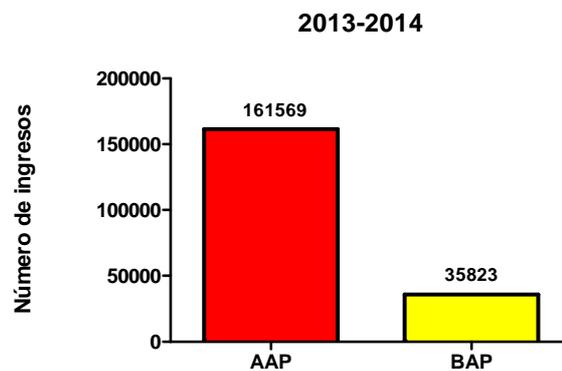
### Centro poblado

El poblado de Cabo Polonio tuvo su origen en el siglo XX en torno a la explotación de lobos marinos y a las actividades de un grupo de pescadores de la zona (Delfino y Masciadri., 2005). El área habitada comprende aproximadamente unas 400 viviendas, con un número fluctuante de pobladores permanentes (Sprechmann y Capandeguy., 2011; Masciadri *et al.*, 2006). Según datos aportados por el servicio de Guardaparques del Parque los mayores ingresos de personas al sitio se registran en los meses de verano a razón de miles de personas por día. En los gráficos de la Figura 4 se muestran los datos de ingresos agrupados en los grupos alta y baja afluencia de personas (AAP y BAP, respectivamente). La temporada de AAP comprende a los datos de verano-otoño de los años 2013 y 2014 mientras que la de BAP a los de invierno-primavera del mismo período.

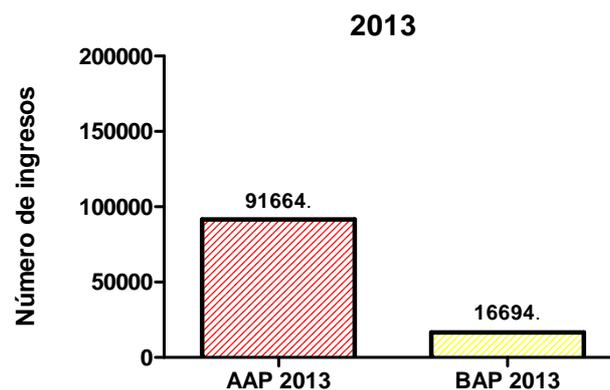
El centro poblado es la zona más antropizada del Parque debido al alto número de viviendas informales construidas y al ganado que la pastorea (Delfino y Masciadri., 2005). En Cabo Polonio, así como en otras zonas de la costa de Rocha, la urbanización ha ocurrido de forma no planificada; constituyendo actualmente un motivo de conflicto socio-territorial importante.

Errores urbanísticos y de gestión cometidos en el pasado tienen como corolario que gran parte del territorio se utilice actualmente en el marco de la informalidad con los consecuentes problemas ambientales, sociales y económicos que esto implica. Por ejemplo, dado que no existe red de saneamiento la disposición de excretas de las viviendas se realiza por medio de pozos negros y fosas sépticas localizados a escasos metros de distancia ( $10 \pm 4$  m) de las perforaciones realizadas para acceder al agua subterránea del sitio para consumo humano (Soumastre *et al.*, 2015). Estas últimas reciben comúnmente el nombre de “cachimbas” o “pozos de primera napa” (Figura 5).

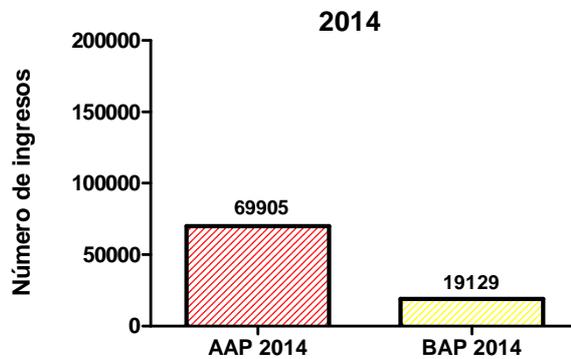
A)



B)



C)



**Figura 4.** Ingresos de personas al PNCP durante el período 2013-2014.

A) Ingresos totales por temporada. B) Ingresos en el año 2013. C) Ingresos en el año 2014. AAP (verano-otoño). BAP (invierno-primavera). Los egresos diarios no se muestran en esta Figura.



**Figura 5.** *Izquierda.* Imagen de las viviendas de Cabo Polonio en las zonas del centro poblado y con vegetación (vista al fondo) *Derecha.* Imagen de una vivienda ubicada en la zona del centro poblado donde se señala la cercanía entre un pozo séptico (recuadro rojo) y una cachimba (flecha roja) (en primera plana).

### Zona con vegetación

Abarca la zona que se extiende en forma paralela a la playa Norte, conocida también como “La Calavera”. Se trata de una zona ocasionalmente inundable

por el aporte pluvial, con predominio de vegetación típica de humedales como *Juncus acutus var. conglomeratus* (Masciadri *et al.*, 2006). Contiene al igual que el centro poblado un gran número de viviendas informales generalmente habitadas durante el verano.

Estudios experimentales previos a este trabajo sugieren que la problemática de la calidad del agua subterránea del PNCP se debe a la cercanía entre pozos sépticos y cachimbas que conduce a la infiltración e intercambio de agua contaminada con microorganismos entre los mismos; lo que eventualmente podría representar un riesgo para la salud de los usuarios de las cachimbas. Por citar un ejemplo, un experimento conducido en microcosmos empleando agua recolectada de una cachimba localizada en la zona con vegetación demostró que la misma contenía materia orgánica suficiente capaz de estimular el crecimiento de enterobacterias. El origen de dicha MO serían los pozos sépticos cercanos a la cachimba (Soumastre *et al.*, 2015). De manera similar, otros estudios han demostrado que el agua de cachimbas de Cabo Polonio ubicadas en las zonas de rocas y centro poblado contenía coliformes fecales por encima de los límites aceptados para que la misma fuera empleada para consumo (Piccini; 2012, datos no publicados; Piccini y Pérez; 2007, datos no publicados). En base a estos antecedentes y considerando las características anteriormente mencionadas del sitio de estudio, en el presente trabajo de tesis nos planteamos las siguientes hipótesis y objetivos.

## **HIPÓTESIS 1**

Los efluentes domésticos contienen altas concentraciones de materia orgánica, nutrientes y microorganismos de origen fecal (bacterias y virus entéricos) que pueden actuar como patógenos para el hombre y los animales (Hynds *et al.*, 2014). En el caso del PNCP la inadecuada construcción y ubicación de pozos sépticos en el suelo arenoso y altamente permeable causa la contaminación del agua subterránea debido a la filtración de aguas servidas hacia la napa freática.

**Predicción 1.1)** La presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal en el agua subterránea del PNCP será mayor en los meses de mayor afluencia de personas, coincidiendo con una mayor carga de nutrientes en el agua.

**Predicción 1.2)** La abundancia de enterobacterias con potencial patogénico en el agua subterránea del PNCP será mayor en la zona que presenta alta densidad de viviendas (centro poblado).

## **HIPÓTESIS 2**

Las técnicas moleculares independientes del cultivo de los microorganismos como la hibridación *in situ* fluorescente y el qPCR permiten una evaluación sensible, rápida y robusta del grado de contaminación del agua (Quilliam *et al.*, 2011; Girones *et al.*, 2010; Savichteva y Okave., 2006). Constituyen además

una alternativa promisorio para superar las limitaciones asociadas al empleo de las técnicas convencionales como la filtración en membrana (FM) (Korzeniewwska y Harnisz., 2012), principalmente para el caso de muestras ambientales donde las células suelen encontrarse estresadas por las condiciones fluctuantes del medio

**Predicción 2.1)** La abundancia de enterobacterias totales (determinada mediante CARD-FISH) será superior a la de la fracción de CF (determinada por FM).

**Predicción 2.2)** Mediante qPCR será posible detectar aquellas enterobacterias que sean potencialmente patógenos. Éstos serán más abundantes en las muestras que presenten mayor incidencia de CF. Esta metodología permitirá detectar la presencia de virus entéricos, aún cuando estos se encuentren en bajas concentraciones.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la dinámica y el potencial patogénico de bacterias y virus entéricos en el agua subterránea destinada a consumo en el Parque Nacional Cabo Polonio, en épocas de alta y baja afluencia de visitantes, evaluando diferentes metodologías de detección.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

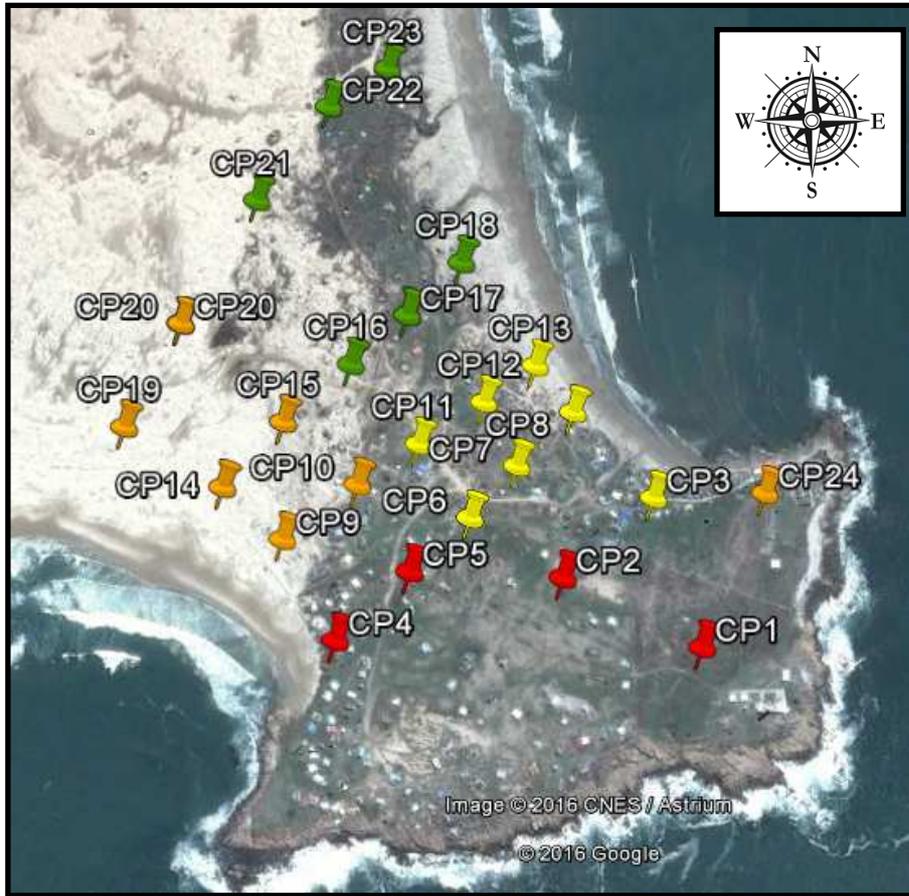
1. Determinar la abundancia de bacterias entéricas en el agua de 24 cachimbas del PNCP, utilizando dos estrategias diferentes como la hibridación *in situ* fluorescente y la filtración en membrana.
2. Evaluar la presencia de virus entéricos en el agua de 24 cachimbas del PNCP.
3. Determinar la concentración de nutrientes (N y P), materia orgánica y variables fisicoquímicas del agua medidas *in situ* en dichas cachimbas.
4. Evaluar la presencia de genes de virulencia de *E. coli* diarreogénica en el agua de las cachimbas que hayan dado  $\geq 1$  UFC de CF por FM.
5. Analizar las relaciones entre las variables biológicas (bacterias y virus entéricos), la presencia de genes de virulencia de *E. coli* diarreogénica, la concentración de nutrientes y materia orgánica, las variables fisicoquímicas medidas *in situ* y la densidad de viviendas.
6. Identificar los puntos críticos por contaminación antropogénica de manera que puedan ser utilizados para tomar medidas de manejo del sitio.

## **METODOLOGÍA**

### **Estrategia de trabajo y muestreos**

Se tomaron muestras de agua subterránea de 24 cachimbas del PNCP entre los años 2013 y 2014. La dinámica de los muestreos incluyó épocas de alta (AAP) y baja (BAP) afluencia de personas al área protegida de manera de evaluar los impactos antropogénicos en el agua subterránea del sitio. Para seleccionar las fechas de las colectas se consultaron los registros de los datos de ingresos de personas al PNCP durante el año previo (2012) proporcionados por el servicio de Guardaparques del Área. De esta manera se decidió realizar cuatro muestreos en total, dos en 2013 (febrero y agosto) y dos en 2014 (febrero y octubre). Para la toma de las muestras se realizaron transectos a lo largo de toda el área habitada del Parque (Figura 6). La distancia promedio entre las cachimbas muestreadas y el pozo séptico más próximo (D) fue de  $10 \pm 4$  m. El procedimiento de muestreo consistió en ingresar un recipiente de 5 L dentro de cada cachimba por medio de una cuerda y coleccionar agua, que posteriormente se repartió en botellas de plástico estériles limpias de 1 L. En el laboratorio de la Dirección Nacional de Medio Ambiente del PNCP las muestras se fraccionaron y refrigeraron de manera que 200 mL se emplearon para los análisis por FM, 50 mL para los ensayos de CARD-FISH y el volumen restante (650 mL) para las determinaciones de nutrientes totales, MOP y presencia de genes de virulencia de EHEC, STEC, EPEC y virus entéricos por qPCR. Para la determinación de virus entéricos, las muestras se recolectaron únicamente durante el muestreo de octubre de 2014 y se enviaron para su procesamiento

al Laboratorio de Virología Molecular del Centro Universitario de la Región Norte en Salto.



**Figura 6.** Mapa de Cabo Polonio indicando los puntos donde se colectaron las muestras de agua subterránea. Marcas rojas: zona de rocas, marcas amarillas: centro poblado, marcas naranjas: zona de dunas, marcas verdes: zona con vegetación. Imagen modificada de Google Earth.

### Variables fisicoquímicas medidas *in situ*

En cada cachimba se midieron *in situ* las variables temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica del agua empleando una sonda de campo Horiba D-25.

### **Materia orgánica particulada**

La determinación de la concentración de MOP en las muestras de agua de cada cachimba se realizó mediante Ignición/Gravimetría, en el laboratorio de calidad del agua del Centro Universitario de la Regional Este (CURE) en Rocha. Para ello se quemaron previamente filtros de fibra de vidrio (GF/F, Whatman) de 0.7 µm de tamaño de poro en una mufla (Thermo Scientific Thermolyne™) a 500 °C y se utilizaron para filtrar volúmenes conocidos de cada muestra (VOLUMEN DE MUESTRA, [L]). Luego se secaron durante 24 horas a 90-110 °C, se pesaron (PESO FILTRO SECO, [mg]) y se volvieron a quemar en mufla a 498 °C durante 15 minutos (PESO FILTRO A 500 °C, [mg]). La concentración de MOP se determinó empleando la fórmula I.

$$[I] \quad \text{MOP [mg/L]} = \frac{(\text{PESO FILTRO SECO} - \text{PESO FILTRO A } 500 \text{ }^\circ\text{C}) \text{ [mg]}}{(\text{VOLUMEN DE MUESTRA}) \text{ [L]}}$$

### **Nutrientes totales**

La determinación de los contenidos de NT y PT en las muestras de agua recolectadas del PNCP se llevó a cabo mediante espectrofotometría, empleando curvas de concentración conocida previamente preparadas. Los análisis se realizaron en el mismo laboratorio donde se analizó la MOP. Para el caso del NT, las formas orgánicas se hidrolizaron a altas temperaturas en presencia de soluciones ácidas transformándolas en nitrato. Luego se procedió a su reducción a nitrito a través del empleo de cadmio amalgamado, siguiendo el protocolo descrito en Mackereth *et al.*, 1978. Las mediciones se realizaron a 543 nm en un espectrofotómetro SP-21100. Para el caso del PT, se utilizó el método descrito en Murphy y Rilley., 1962 de manera de determinar el fósforo

reactivo soluble (PRS) en cada muestra. La formación de un complejo de fosfomolibdato en medio ácido se analizó midiendo absorbancia a 885 nm.

### **Coliformes fecales**

Duplicados de 100 mL de cada muestra se utilizaron para cuantificar enterobacterias pertenecientes al grupo de los CF, según la técnica de FM (American Public Health Association, 1995). Para ello, las muestras se filtraron a través de membranas de nitrato de celulosa (Whatman) de 0.45 µm tamaño de poro y luego se incubaron en placas conteniendo medio Fecal Coliform (mFC, HiMedia) a  $(44.5 \pm 0.5)$  °C durante 24 h. Cumplido el tiempo de incubación se realizó el recuento del número de UFC de CF de aquellas colonias que presentaron la morfología típica de este grupo bacteriano (colonias azules) en el medio de cultivo empleado.

### **Enterobacterias totales**

- ***Especificidad de la sonda *EnterobactB* y puesta a punto de las condiciones de hibridación***

Para los ensayos de CARD-FISH se utilizó la sonda *EnterobactB* diseñada por Ootsubo y colaboradores en el año 2002 (Ootsubo *et al.*, 2002), específica de enterobacterias. La misma se encuentra acoplada a la enzima peroxidasa de rábano picante en el extremo 5'. La especificidad de la misma se evaluó *in silico* empleando la base de datos Silva (<http://www.arb-silva.de>) y la herramienta TestProbe 3.0 (Soumastre *et al.*, 2015; Gurevich *et al.*, 2013).

Las condiciones de hibridación se evaluaron siguiendo el protocolo descrito por Pernthaler *et al.*, 2002 empleando diferentes concentraciones de formamida

(25-45%) en el buffer de hibridación (BH) y un cultivo de *E. coli* de laboratorio. Brevemente, se preparó una suspensión bacteriana en buffer fosfato salino 1X (PBS) a partir de un cultivo *overnight* de *E. coli* XL1-Blue en medio Luria-Bertani. Alícuotas de 1 mL de dicha suspensión se fijaron con una solución fresca de paraformaldehído 1% (w/v), se mantuvieron una hora a temperatura ambiente protegidos de la luz y se filtraron a través de filtros blancos de policarbonato (GTTP, 25 mm de diámetro, Millipore) de 0.22  $\mu\text{m}$  tamaño de poro. Secciones de los mismos se hibridaron con la sonda *EnterobactB*, concentración de trabajo 50 ng/ $\mu\text{L}$ , en una relación 1:100 en el BH. Las hibridaciones se realizaron en cámara húmeda a 46 °C durante toda la noche. La cuantificación se realizó de forma manual empleando el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81.

- ***Abundancia de enterobacterias totales***

Alícuotas de 10 mL de muestra fijada se filtraron a través de filtros blancos de policarbonato (GTTP, 25 mm de diámetro, Millipore) de 0.22  $\mu\text{m}$  tamaño de poro y secciones de los mismos se utilizaron en las hibridaciones (por duplicado). Los filtros se incubaron a 46 °C durante toda la noche en cámara húmeda. La concentración de trabajo de la sonda fue de 50 ng/ $\mu\text{L}$  en una relación 1:100 en el BH conteniendo formamida al 35%. La cuantificación de las células hibridadas con la sonda, identificadas por la emisión de una señal fluorescente verde (EntB+), se realizó de forma manual mediante microscopía de epifluorescencia empleando el microscopio Olympus IX81. Se contabilizaron tantos campos necesarios hasta alcanzar un total de 500 células por muestra. La abundancia de enterobacterias se determinó empleando la fórmula II.

$$\text{[II] } N^{\circ} \text{ bacterias/mL} = (N^{\circ} \text{ BACTERIAS}) \cdot (WA [\mu\text{m}^2]) / (N^{\circ} \text{ CAMPOS}) \cdot (\text{VOLUMEN [mL]}) \cdot (N^{\circ} \text{ CUADRADOS}) \cdot (\text{ÁREA GRILLA})$$

WA: área del filtro ocupada por la muestra, N° campos: cantidad de campos contabilizados hasta alcanzar un total de 500 bacterias, Volumen: volumen de muestra filtrado, N° Cuadrados: porciones de grilla contadas.

### **Virus entéricos**

La determinación de la presencia de virus entéricos en el agua subterránea del PNCP se realizó en colaboración con el Laboratorio de Virología Molecular del Centro Universitario de la Región Norte en Salto. Para ello, las muestras se concentraron durante los días de las colectas y se mantuvieron refrigeradas hasta su posterior análisis mediante qPCR. El protocolo empleado para concentrar la muestras fue el descrito por Katayama y colaboradores (2002) con modificaciones. Una vez concentradas las muestras, las mismas se enviaron a Salto donde se realizó la extracción del ARN genómico empleando el kit comercial QIAmp Viral ARN MiniKit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el ARN obtenido se realizó la síntesis de ADNc utilizando una enzima transcriptasa reversa (Thermo Scientific) y se evaluó la presencia de norovirus y rotavirus mediante qPCR siguiendo los protocolos descritos en Shultz *et al.*, 2011 y Colina *et al.*, 2014; respectivamente.

### ***E. coli* enterohemorrágica, productora de toxina Shiga y enteropatogénica**

#### ***- Puesta a punto de la técnica qPCR***

Las condiciones experimentales para la amplificación de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* implicados en la virulencia de EHEC, STEC y EPEC en las muestras de

agua recolectadas de las cachimbas se evaluó en primera instancia empleando ADN obtenido de cepas de laboratorio (controles positivos de reacción). Para el caso de los genes *stx1* y *eae* se trabajó con ADN de un cultivo puro de EHEC aislado de muestras de heces de terneros de nuestro país (cepa 74.1), perteneciente a la colección de cepas del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Para la amplificación del gen *stx2* se empleó ADN de una cepa de EHEC aislada de muestras de alimentos de nuestro país (cepa LC036), perteneciente a la colección del Departamento de Microbiología del LATU. Las extracciones del ADN de estas cepas se realizó mediante lisis celular (1 minuto en baño de agua a 100 °C) y la concentración obtenida se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm, empleando el equipo Nanodrop (Thermo Scientific™).

La amplificación de los tres genes (*stx1*, *stx2* y *eae*) se evaluó mediante ensayos de qPCR empleando primers descritos anteriormente en la literatura (Chassagne *et al.*, 2009) y el kit comercial Power Master Mix (Invitrogen). Éste contiene los reactivos necesarios para la reacción de qPCR, incluida la enzima Taq polimerasa y el colorante SYBRGreen™. Cada reacción para la amplificación de los genes *stx1* y *eae* contenía: 6.5 µL de agua; 0.5 µL de BSA (30 mg/mL); 7.76 µL de Power Master Mix (Invitrogen); 0.12 µL de cada primer (0.3 µM c/u) y 5 µL de ADN molde (cepa 74.1) en un volumen final de 20 µL. Para el caso del gen *stx2*, la concentración de cada primer fue de 1 µM, mientras que la concentración de los demás reactivos en la mezcla de reacción se mantuvo. El ADN molde empleado en este caso fue el de la cepa LC036. Como control negativo se utilizó agua. Las condiciones de ciclado se muestran

en la Tabla 3. Las temperaturas de *annealing* de cada primer se muestran en la Tabla 4. La especificidad de los amplicones obtenidos para cada gen se confirmó mediante la secuenciación de los genes amplificados empleando el servicio de secuenciación de Macrogen (Corea). Para ello, los productos obtenidos por qPCR se corrieron en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed (Biotium), se purificaron las bandas utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se enviaron deshidratadas a Macrogen.

**Tabla 3.** Protocolo para la amplificación de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* implicados en la virulencia de *EHEC* mediante PCR a tiempo real.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Hold 1	50	2 min	
Hold 2	95	15 min	
<i>Desnaturalización</i>	94	15 seg	40 ciclos
Annealing	63	30 seg	
Extensión	72	30 seg	
<i>Melting</i>	65 a 95	Aumentando 0.5° C cada 4 seg	

**Tabla 4.** Temperaturas de *annealing* de cada primer.

Primer	Gen target	T annealing (°C)
Stx1F/Stx1R	<i>stx1</i>	56
Stx2F/Stx2R	<i>stx2</i>	63
EaeF/EaeR	<i>Eae</i>	63

#### - **Extracciones de ADN**

La selección de las muestras a analizar mediante qPCR se realizó en base a los resultados obtenidos mediante filtración en membrana, de manera que aquellas muestras en las que el recuento de CF en al menos una de las épocas analizadas fue mayor o igual a uno (CP1, CP6, CP8, CP13, CP14, CP16,

CP17, CP23 y CP24) se seleccionaron para extracción de ADN. A su vez, para determinar la dinámica de las bacterias potencialmente patógenas durante el período de tiempo evaluado, las extracciones se realizaron para cada fecha en la que se llevó a cabo una colecta. El protocolo utilizado fue el descrito por Zhou *et al.*, 1996 con modificaciones. Brevemente, volúmenes conocidos de agua se filtraron a través de filtros de nitrato de celulosa (Whatman) de 0,45  $\mu\text{m}$  tamaño de poro y los mismos se colocaron en tubos de lisis (Lysing Matrix Tubes, MP Biomedicals) conteniendo esferas de cerámica y buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH=8, 100 mM EDTA pH=8, 100 mM Na-fosfato pH=8, 1.5 M NaCl, 1% CTAB). Se realizó una lisis mecánica celular sometiendo los tubos a agitación (20 segundos a  $6.0 \text{ ms}^{-1}$ ) en el equipo FastPrep<sup>®</sup>-24 (MP Biomedicals). El producto obtenido se centrifugó a 12.100 g durante un minuto y el pellet se utilizó en extracciones consecutivas empleando una mezcla 24:1 de cloroformo:alcohol isoamílico. El ADN extraído se precipitó con isopropanol, se secó en presencia de etanol 70% (v/v) y se hidrató con 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura. Su concentración se determinó por espectrofotometría, midiendo absorbancia a 260 nm en el equipo Nanodrop (Thermo Scientific<sup>™</sup>).

Para confirmar la presencia de células procariotas en el ADN genómico extraído de cada muestra se realizaron ensayos de PCR a tiempo final empleando los primers P27F y P1492R, específicos para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S. Las reacciones se analizaron en nueve *pools* de cuatro muestras cada uno correspondientes al mismo punto de muestreo (una por cada época del año analizada). Cada tubo de reacción contenía: 17.2  $\mu\text{L}$  de agua; 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer; 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ ; 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPs; 0.3  $\mu\text{L}$  de cada primer; 0.2  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa (Invitrogen); 0.5  $\mu\text{L}$  de BSA

(30 mg/mL) y 2  $\mu$ L de ADN molde en un volumen final de 25  $\mu$ L. El tamaño del producto esperado era de 1465 pb. Las condiciones de ciclado se muestran en la Tabla 5. Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 0.8% teñido con GelRed (Biotium).

**Tabla 5.** Protocolo para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S mediante PCR en tiempo final.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	
Desnaturalización	94	1 min	30 ciclos
<i>Annealing</i>	50	1 min	
Extensión	72	1.30 min	
Extensión final	72	10 min	

- **Ensayos de qPCR**

Una vez puestas a punto las condiciones de qPCR en los controles positivos se procedió al análisis de las muestras. Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos y para cada una se analizaron tres réplicas técnicas por gen. El termociclador utilizado fue el equipo CFX96 Touch™ Real Time PCR (BIORAD). Se consideró una muestra positiva para un determinado gen a aquella cuyo pico de *melting* coincidió con la temperatura de *melting* de su control positivo y cuya fluorescencia umbral permitió obtener curvas de calibración con eficiencias cercanas al 99%.

**Análisis estadísticos de los datos**

Dependiendo del objetivo de los análisis, los datos de los muestreos correspondientes a AAP y BAP se agruparon y analizaron en conjunto. Para evaluar si existieron diferencias en la abundancia bacteriana y el contenido de

nutrientes de los pozos entre las distintas épocas del año se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, previo al análisis de normalidad y homogeneidad de las varianzas (test Shapiro-Wilkinson y de Levene; respectivamente).

Para detectar la posible existencia de correlaciones entre determinadas variables biológicas (enterobacterias, CF) y variables abióticas (nutrientes, materia orgánica y características fisicoquímicas del agua) se aplicó el Test de Spearman. Para evaluar la existencia de dependencias entre la variable CF y PT, NT, MOP y distancia de la cachimba al pozo séptico más cercano (D) se realizó un test de Chi-cuadrado. Para estos análisis estadísticos se empleó el programa PAST versión 2.17c (Hammer *et al.*, 2001). Por otro lado, para conocer la existencia de diferencias en la distribución de probabilidad de las variables CF, PT, NT y MOP a través del tiempo (evaluación a escala temporal), se compararon las distribuciones de dichas variables en 2013 y 2014, tanto en temporada de AAP como de BAP. Para ello, se aplicaron los tests de hipótesis de Kolmogorov-Smirnov (K-S, para detectar diferencias entre las distribuciones), Wilcoxon (W, para detectar diferencias entre las medias de cada distribución) y el test de F (para detectar diferencias entre las varianzas de cada distribución). Dado que los datos de CF (UFC/100 mL) encontrados en 2013 fueron un orden de magnitud superiores a los de 2014 y con el fin de confirmar si las diferencias encontradas se debían a las distintas dimensiones de la variable, los datos fueron estandarizados empleando la fórmula:  $z = (x - \bar{a})/s$ , donde x es el valor de la variable,  $\bar{a}$  es la media y s el desvío estándar.

Para evaluar la existencia de una correlación espacial de las variables CF, NT, PT y MOP entre los distintos puntos de muestreo (evaluación a escala

espacial) se empleó el índice I de Moran y el C de Geary. Para ello se definió previamente una red de vecindad entre los puntos de muestreo empleando estructuras basadas en triangulación y en vecinos más cercanos (usando 2, 3 y 4 vecinos). Para los análisis realizados en las evaluaciones a escala temporal y espacial se empleó el paquete estadístico R (versión 3.2.0). Para los análisis espaciales se empleó el paquete gstat de R.

## **RESULTADOS**

### **Variables fisicoquímicas *in situ*, concentración de nutrientes y MOP**

El pH del agua presentó valores cercanos a la neutralidad, variando entre 7.1-7.6 (Tabla 6) y no se encontraron diferencias significativas entre las distintas épocas (Kruskal-Wallis;  $p > 0.05$ ). La temperatura media del agua se encontró entre los 14 y 21 °C (Tabla 6), siendo estadísticamente superior durante los muestreos de verano (21 °C), en la temporada de AAP (Kruskal-Wallis;  $p \leq 0.05$ ). El OD del agua osciló entre 7.7 y 16.3 mg/L (Tabla 6), siendo estadísticamente superior durante la época de BAP (16.3 mg/L) (Kruskal-Wallis;  $p \leq 0.05$ ). En este momento, el sistema se encontró sobresaturado de OD. La conductividad eléctrica del agua fue similar durante todo el período analizado (Kruskal-Wallis;  $p > 0.05$ ), su media se registró en el entorno de los  $0.5 \mu\text{Scm}^{-1}$  (Tabla 6).

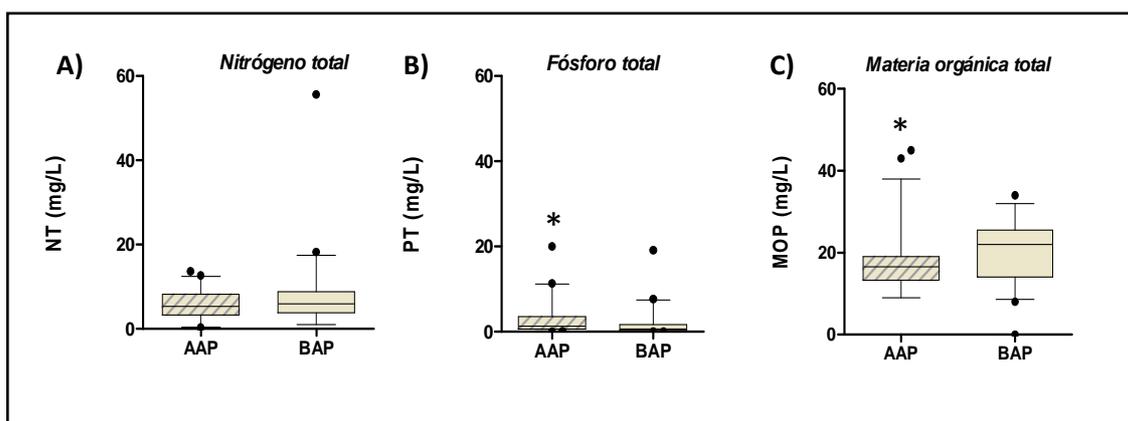
En los dos años evaluados el PT fue mayor durante la temporada de AAP (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ , Figura 7B) y se mantuvo por encima del límite referido en el Decreto 253/79 de la DINAMA (0.025 mg/L en P). Sin embargo, los valores de PT fueron significativamente menores en BAP del 2014 respecto al 2013 (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ , Figura 8B).

La MOP presentó la misma tendencia que el PT, siendo estadísticamente superior durante las temporadas de AAP (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ , Figura 7C). Su concentración en el agua subterránea del Parque fue significativamente menor durante el año 2013 (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ , Figura 8C); contrario a la tendencia observada con la población de coliformes fecales (Figura 9 superior).

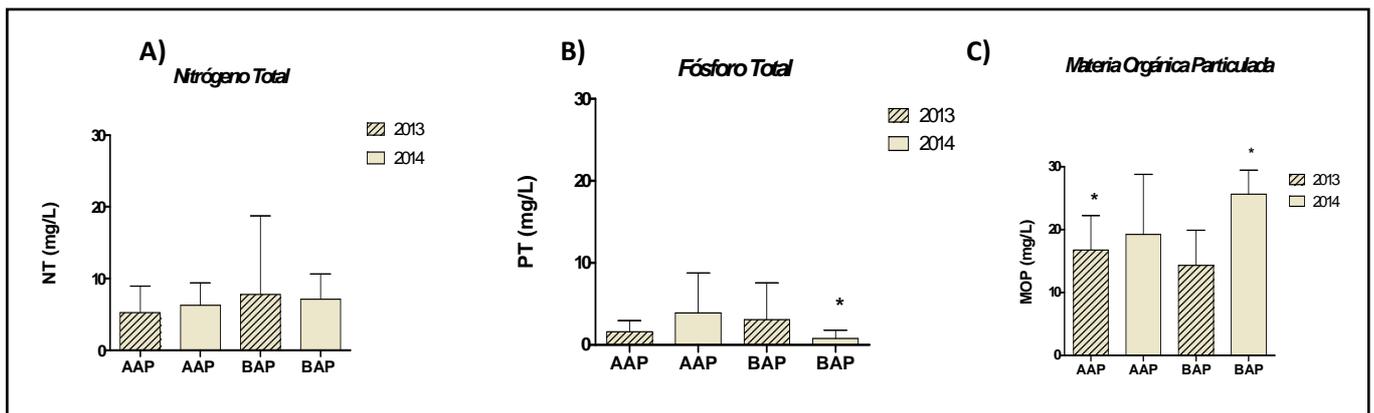
No se encontraron diferencias en la concentración de NT (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ , Figura 7A) durante ambas épocas evaluadas ni entre los años (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ , Figura 8A).

**Tabla 6.** Características fisicoquímicas del agua subterránea del PNCP expresadas como la media  $\pm$  el desvío estándar de los datos. Se muestran también los valores medios de las concentraciones de PT, NT, MOP y CF.

Parámetro	AAP	BAP
pH	7.4 $\pm$ 0.1	7.6 $\pm$ 0.1
T (°C)	21.1 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 0.7
OD (mg/L)	7.7 $\pm$ 0.3	16.3 $\pm$ 1.2
EC ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ )	0.5 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.03
PT (mg/L)	2.7 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.5
NT (mg/L)	5.8 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 1.2
MOP (mg/L)	18.2 $\pm$ 1.3	20.4 $\pm$ 1.1
CF (UFC/100 mL)	30.5	9.8



**Figura 7.** A) Contenido de NT (mg/L), B) PT (mg/L) y C) MOP (mg/L) en el agua subterránea del PNCP durante el período analizado. (\*) diferencias significativas. AAP: alta afluencia de personas. BAP: baja afluencia de personas. Los círculos negros representan datos *outliers*.

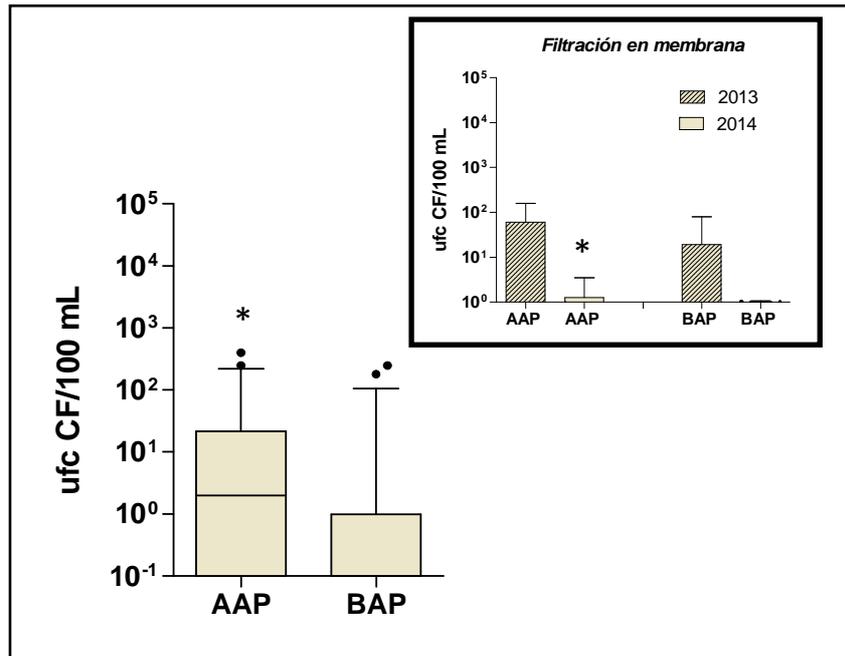


**Figura 8.** A) Contenido de NT (mg/L), B) PT (mg/L) y C) MOP (mg/L) en el agua subterránea del PNCP durante los dos años de muestreo. (\*) diferencias significativas. AAP: alta afluencia de personas. BAP: baja afluencia de personas.

### Coliformes fecales

Se detectó la presencia de coliformes fecales en 21 de las 24 cachimbas analizadas, en al menos una de las épocas evaluadas. Las cachimbas CP2 (ZR), CP4 (ZR) y CP19 (ZD) presentaron  $\leq 1$  UFC/100 mL de CF durante el período 2013-2014.

El mayor recuento de CF se detectó en las épocas de AAP en ambos años evaluados (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ , Figura 9 inferior). Los valores fueron significativamente menores en 2014 que en 2013 para ambas épocas del año (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ , Figura 9 superior).



**Figura 9.** Número de UFC de CF en 100 mL de muestra. La imagen superior derecha muestra los datos agrupados por años. Los círculos negros representan datos *outliers*. (\*) diferencias significativas.

### **Enterobacterias totales**

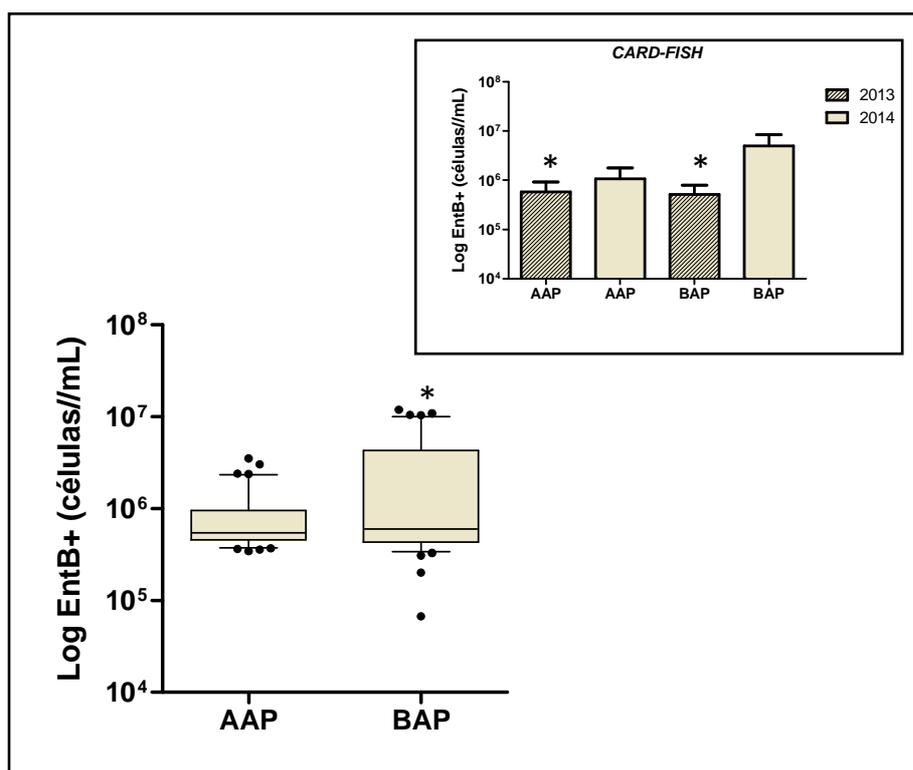
El análisis de especificidad de la sonda demostró que aproximadamente 40.000 secuencias presentes en la base de datos Silva tuvieron homología con la secuencia de la sonda *EnterobactB*. De éstas, el 99% pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro de este porcentaje, un 31.6% pertenecían a los géneros *Escherichia* y *Shigella*, 14% a *Serratia*, 12% a *Enterobacter*, 8% a *Klebsiella*, 5% a *Citrobacter* y 3% a *Salmonella*. El 13% restante correspondía a enterobacterias sin clasificar. De esta manera, se demostró que el grupo de los coliformes (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*) representan el 60% de las enterobacterias presentes en la base de datos.

El análisis previo a los ensayos de CARD-FISH en las muestras de agua demostró que la utilización de BH conteniendo 35% de formamida y la

utilización de la sonda en una concentración de trabajo igual a 50 ng/μL permitió obtener una hibridación superior al 99%.

### **Abundancia de enterobacterias**

Se detectó la presencia de enterobacterias en el agua de todos los pozos, con valores de abundancias comprendidos entre  $10^5$  y  $10^7$  células/mL de muestra (Figura 10). En los dos años estudiados, las abundancias fueron mayores en la época de BAP (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ , Figura 10 inferior). Sin embargo, las abundancias fueron significativamente menores en 2013 que en 2014 (Kruskal-Wallis,  $p \leq 0.05$ , Figura 10 superior).



**Figura 10.** Abundancia de bacterias hibridadas con la sonda *EnterobactB* (EntB+) por mL de muestra. La imagen superior muestra los datos agrupados por años. AAP: alta afluencia de personas. BAP: baja afluencia de personas. Los círculos negros representan datos *outliers*. (\*) diferencias significativas.

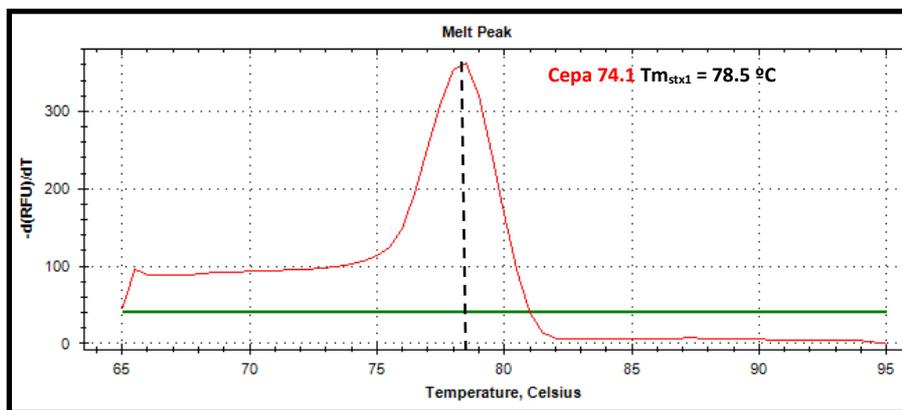
## Virus entéricos

Los análisis de qPCR realizados en Salto para evaluar la presencia de virus entéricos durante la temporada de BAP del año 2014 confirmaron la presencia de rotavirus únicamente en las muestras CP6 (ZC) y CP23 (ZV).

## *E. coli* enterohemorrágica, productora de toxina Shiga y enteropatógena

### *Puesta a punto de la técnica qPCR*

La secuenciación de los amplicones obtenidos mediante qPCR, empleando como controles positivos cultivos de *E. coli* de laboratorio (cepas 74.1 y LC036), confirmaron la identidad de los productos obtenidos y demostraron que la temperatura de *melting* de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* fue 78.5, 76.0 y 81.0 °C, respectivamente (Ver curvas rojas en Figuras 11a, 11b y 11c, respectivamente).



**Figura 11a.** Curva de melting del gen *stx1* para el control positivo de la cepa 74.1.

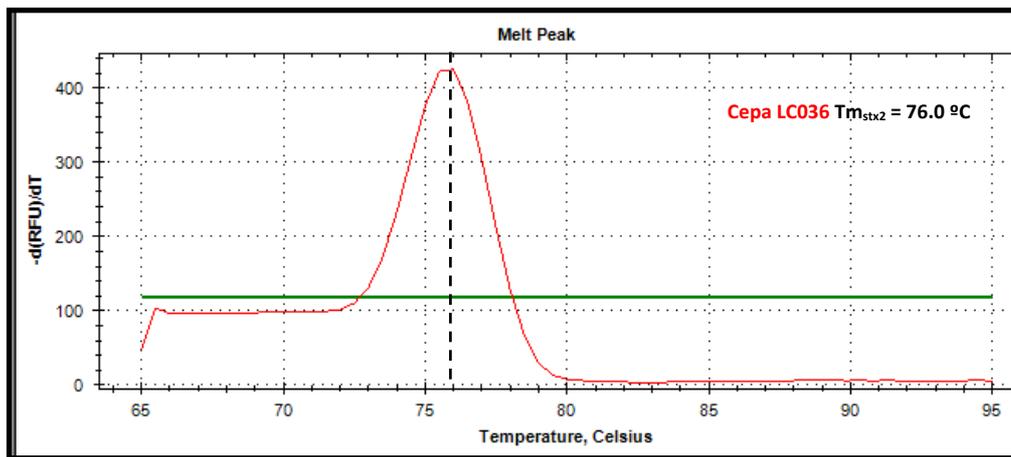


Figura 11b. Curva de melting del gen *stx2* para el control positivo de la cepa LC036.

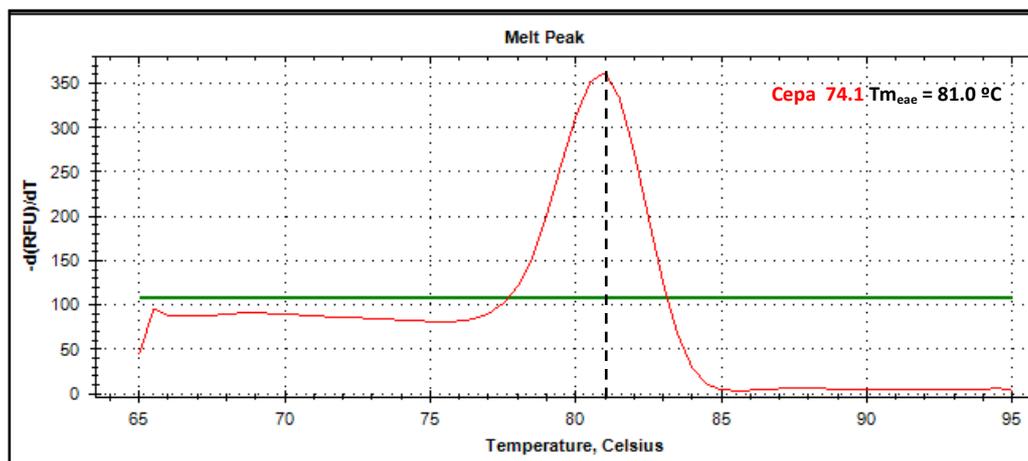


Figura 11c. Curva de melting del gen *eae* para el control positivo de la cepa LC036.

### ***PCR a tiempo final***

Luego de la electroforesis en gel de agarosa se detectó una banda del tamaño esperado para todos los amplicones obtenidos (datos no presentados), confirmándose la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S en todas las muestras evaluadas (CP1, CP6, CP8, CP13, CP14, CP16, CP17, CP23 y CP24).

### Ensayos de qPCR

Se detectó la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* en todas las muestras analizadas, indistintamente de las temporadas de AAP y BAP (Tabla 7). Aquellas en las que se detectó uno o ambos tipos del gen *stx* (*stx1* y/o *stx2*) y el gen *eae* se definieron como muestras EHEC positivas. Las que presentaron uno o ambos tipos *stx* y no necesariamente al gen *eae*, se clasificaron como STEC positivas. Aquellas que solo presentaron el gen *eae* se definieron como EPEC.

**Tabla 7.** Genes de virulencia detectados en las muestras de agua subterránea del PNCP durante el período evaluado y patotipo de *E. coli* al que pertenecerían en caso que ocurrieran en conjunto en la misma bacteria. Las celdas pintadas indican las muestras EHEC positivas (*stx+*/*eae+*).

MUESTRA (ZONA)	AAP						BAP						POSIBLE PATOTIPO <i>E. coli</i>
	2013			2014			2013			2014			
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>										
CP1 (ZR)	+	+										+	EPEC, STEC, EHEC
CP6 (ZC)		+			+		+	+		+	+		STEC
CP8 (ZC)		+	+					+					EPEC, STEC, EHEC
CP13 (ZC)		+				+	+	+				+	EPEC, STEC, EHEC
CP14 (ZD)						+			+	+	+	+	EPEC, STEC, EHEC
CP16 (ZV)		+			+						+	+	EPEC, STEC, EHEC
CP17 (ZV)								+					STEC
CP23 (ZV)		+										+	EPEC, STEC, EHEC
CP24 (ZD)		+			+			+			+		STEC

### Efecto de la geomorfología en la contaminación del agua subterránea

En la Tabla 8 se muestra un resumen de los resultados en relación a las variables medidas durante 2013 y 2014 en el PNCP, de acuerdo a la ubicación de los puntos de muestreo en las distintas zonas definidas para este estudio (ZR, ZD, ZC y ZV). Como se observa en dicha tabla, las zonas del PNCP que presentaron mayor contaminación orgánica, química y microbiana fueron el centro poblado y la zona de dunas. La presencia de genes de virulencia de *E. coli* se detectó en todas las zonas del Parque (Tabla 7).

**Tabla 8.** Resumen de los resultados en relación a las variables medidas durante 2013 y 2014 en el PNCP.

VARIABLES		PUNTOS DE MAYOR CONTAMINACIÓN
VARIABLES BIOLÓGICAS	Coliformes fecales ≥ 50 UFC CF/100 mL	CP6, CP8, CP13 (ZC) CP10 (ZD) CP17, CP22, CP23 (ZV)
	Enterobacterias totales ≥ 1x10 <sup>6</sup> EntB+/mL	CP4, CP5 (ZR) CP11 (ZC)
GENES DE VIRULENCIA	STEC (stx+ y eae +)	CP8 (ZC) CP14 (ZD) CP16 (ZV)
VARIABLES ABIÓTICAS	PT ≥ 2.0 mg/L	CP1 (ZR) CP3, CP6 (ZC) CP8,CP11, CP13 (ZC) CP15, CP20, CP24 (ZD)
	NT ≥ 10.0 mg/L	CP1 (ZR) CP3, CP13 (ZC) CP9, CP15, CP24 (ZD) CP16(ZV)
	MOP ≥ 25.0 mg/L	CP1 (ZR), CP3, CP7, CP8, CP12, CP13 (ZC), CP10, CP14, CP15, CP24 (ZD), CP16, CP17, CP18, CP23 (ZV)

## Correlaciones entre variables ambientales del agua y bacterias indicadoras de contaminación

El análisis de correlaciones entre las variables biológicas (enterobacterias y CF) y las variables abióticas (nutrientes, materia orgánica y características fisicoquímicas del agua) mostró la existencia de una relación positiva entre el recuento de CF y la concentración de PT (Spearman,  $p \leq 0.05$ ;  $r_s = 0.42$ ). A su vez, se encontró una relación positiva entre la abundancia de enterobacterias totales (EntB+) y la concentración de MOP (Spearman,  $p \leq 0.05$ ;  $r_s = 0.38$ ).

Por otra parte, se demostró que la abundancia de CF durante las temporadas de AAP (2013 y 2014) se correlacionó significativamente con la variable distancia de la cachimba al pozo séptico más cercano (D) (Chi-cuadrado,  $p \leq 0.05$ , Tabla 9).

**Tabla 9.** p-valores del test Chi-cuadrado para analizar si existió dependencia entre la abundancia de CF (UFC CF/100 mL) y las restantes variables evaluadas (PT, NT, MOP y D). Los valores en negrita indican las variables que presentaron una correlación significativa con la variable CF ( $p \leq 0.05$ ).

CF	PT	NT	MOP	D
<b>AAP 2013</b>	0.373	0.174	0.861	<b>0.031</b>
<b>AAP 2014</b>	1.000	0.761	0.317	<b>0.018</b>
<b>BAP 2013</b>	0.620	1.000	0.556	0.666
<b>BAP 2014</b>	0.449	0.615	0.470	0.559

### Análisis a escala temporal

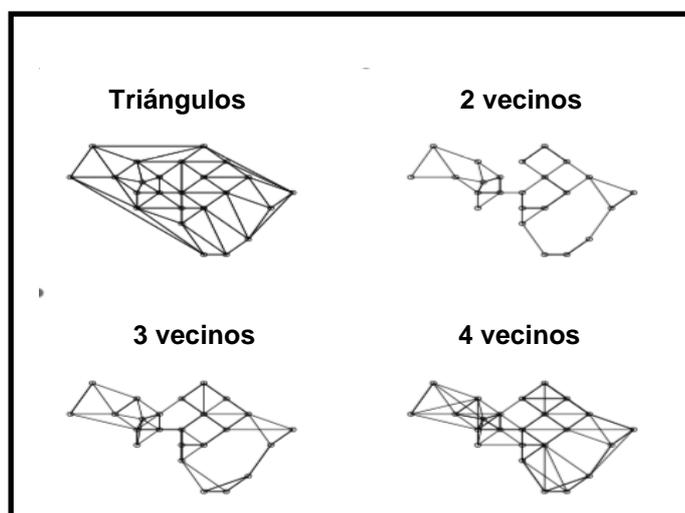
Dado que el recuento de coliformes fecales se relacionó con el contenido de fósforo total y la distancia al pozo séptico más cercano, se procedió a analizar esta variable en mayor detalle (Tabla 10). Se demostró que en general la variable CF presentó cambios, sea en la forma de la distribución, en la media, en la varianza o en las tres. En el caso de las temporadas altas (AAP) se observaron diferencias en los tres parámetros entre ambos años, mientras que para las temporadas de baja afluencia de visitantes (BAP) sólo se detectaron diferencias a nivel de las varianzas. Otras variables, tales como el PT mostraron diferencias también en los tres estadísticos entre las temporadas bajas (BAP), mientras que para el NT solo se observaron diferencias entre las varianzas de las distribuciones correspondientes a BAP. La MO también mostró diferencias entre ambas BAP, particularmente entre las medias y las varianzas de sus distribuciones (Tabla 10).

**Tabla 10.** p-valores obtenidos de los test de K-S, W y el test de F para evaluar si existieron diferencias significativas entre las temporadas AAP y BAP de 2013 y 2014. Las celdas en negrita muestran las diferencias significativas entre los distintos años de una misma temporada.

Test estadístico	CF		PT		NT		MO	
	AAP	BAP	AAP	BAP	AAP	BAP	AAP	BAP
K-S	<b>0.001</b>	0.64	0.14	<b>0.03</b>	0.26	0.25	0.89	<b>0.001</b>
W	<b>0.001</b>	0.21	0.25	<b>0.01</b>	0.26	0.22	0.49	<b>0.001</b>
F	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.41	<b>0.001</b>	<b>0.01</b>	0.39

### **Análisis a escala espacial**

Con el fin de determinar si existe autocorrelación espacial entre los datos de abundancia de CF (medidos como UFC CF/100 mL) se calculó el índice I de Moran (sensible a la correlación global) y el C de Geary (sensible a las correlaciones locales). Esto requirió definir previamente una red de vecindad entre los puntos de muestreo (Figura 12). Se emplearon dos estructuras distintas, una basada en triangulación y otra en vecinos más cercanos. Para esta última se usaron 2, 3 y 4 vecinos.



**Figura 12.** Ejemplo de las estructuras de vecindad definidas para la variable CF (UFC CF/100 mL).

En la Tabla 11 se muestran los p-valores obtenidos para la variable abundancia de CF para cada estructura de vecindad. Cuando dichos valores son significativos ( $p \leq 0.05$ ), la probabilidad de encontrar coliformes en una cachimba se relaciona con la presencia de coliformes en las 2, 3 ó 4 cachimbas más cercanas, sugiriendo así una estructuración espacial. De esta manera, se puede afirmar que no existió autocorrelación espacial entre los datos de CF durante el año 2013 (Tabla 11). Por otra parte, en el año 2014 sí se detectó

una correlación espacial entre los valores de CF (Tabla 11), donde la probabilidad de encontrar coliformes en una cachimba se relacionó con la presencia de CF en las 3 ó 4 cachimbas más cercanas ( $p \leq 0.01$ ).

**Tabla 11.** p-valores correspondientes a cada estructura de vecindad definida para la variable CF (UFC/100mL), en temporada alta (AAP) y baja (BAP) de los años 2013 y 2014. Se muestran en negrita las estructuras de vecindad que mostraron correlación espacial con p-valores  $p \leq 0.05$  y con asterisco aquellas cuyos p-valores fueron  $\leq 0.01$ .

Test estadístico	Triángulo		2 vecinos		3 vecinos		4 vecinos	
	AAP	BAP	AAP	BAP	AAP	BAP	AAP	BAP
	2013	2013	2013	2013	2013	2013	2013	2013
Moran	0.075	0.85	0.79	0.86	0.88	0.84	0.91	0.99
Geary	0.60	0.86	0.90	0.82	0.99	0.78	0.95	0.99
Test estadístico	AAP	BAP	AAP	BAP	AAP	BAP	AAP	BAP
	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014	2014
Moran	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>	0.07	0.09	<b>0.001*</b>	<b>0.001*</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
Geary	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	0.04	0.04	<b>0.001*</b>	<b>0.001*</b>	<b>0.001*</b>	<b>0.001*</b>

## **DISCUSIÓN**

En el Parque Nacional Cabo Polonio el agua dulce utilizada para consumo humano proviene de perforaciones realizadas en la napa freática, de pozos conocidos comúnmente como “cachimbas” o “pozos de primera napa”. Debido a la falta de políticas de gestión adecuadas las cachimbas se localizan a pocos metros de distancia de los pozos sépticos de las viviendas, donde se disponen las aguas residuales domésticas. La geomorfología del sitio, constituida mayoritariamente de dunas de arena y rocas, favorece el intercambio de agua entre cachimbas y pozos sépticos. Estos últimos, al haber sido construidos en su mayoría como perforaciones directas en el suelo, sin revestimiento, representan una fuente de ingreso de materia orgánica, nutrientes y microorganismos de origen fecal al agua subterránea del PNCP. Por tanto, se presume que el empleo de cachimbas para el abastecimiento de agua para consumo humano en esta área protegida representa una fuente no segura.

### **Contaminación del agua subterránea destinada a consumo en el PNCP**

La abundancia y la actividad bacteriana, así como la composición de las comunidades de bacterias planctónicas en los sistemas acuáticos naturales, varía enormemente en respuesta a las condiciones abióticas de los mismos (Boi *et al.*, 2015). Los cambios más pronunciados tienen lugar mayoritariamente en las estaciones extremas (verano y/o invierno), asociados fundamentalmente a las fluctuaciones de temperatura y oxígeno disuelto en el agua. Otros factores como la disponibilidad de nutrientes y la luz visible también afectan la sobrevivencia bacteriana (Barcina *et al.*, 1997). Ésta se define como el estado celular que resulta de su interacción con factores bióticos y

abióticos del ambiente, muchos de los cuales resultan hostiles para su crecimiento (Barcina *et al.*, 1997). En este trabajo se midieron las variables abióticas temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad eléctrica del agua, contenidos de nitrógeno y fósforo total y materia orgánica particulada en el agua subterránea del PNCP de manera de relacionarlas con las abundancias de enterobacterias detectadas durante el período interanual analizado.

Se ha demostrado que temperaturas en el entorno de los 20 °C favorecen la sobrevivencia de las enterobacterias en sistemas acuáticos naturales (Perini *et al.*, 2015; Blaustein *et al.*, 2013; Noble *et al.*, 2004). Tal como sucedió en nuestro estudio, la mayor abundancia de CF presentes en el agua subterránea del PNCP se detectó durante los muestreos de verano (estaciones cálidas), coincidiendo con las épocas de AAP. Estos resultados son similares a los descritos por Kim y colaboradores (2013) quienes demostraron que los niveles de contaminación fecal en muestras de agua dulce tomadas de pozos de zonas rurales fueron significativamente superiores en verano respecto al invierno. Los autores asociaron el incremento del número de microorganismos indicadores de contaminación fecal del verano con la mayor temperatura del agua detectada en ese momento (en el entorno de los 27 °C), ya que los microorganismos tienden a multiplicarse rápidamente en este tipo de ambientes. A pesar de que se han descrito efectos contradictorios respecto a la influencia que tiene esta variable en el crecimiento bacteriano (Barcina *et al.*, 1997), en nuestro estudio la temperatura provocó un efecto positivo sobre éste.

Por otra parte, el nivel de nutrientes de un sistema acuático también tiene un fuerte efecto en la sobrevivencia de las enterobacterias (Noble *et al.*, 2004; Hader *et al.*, 1998; Morita 1992). Para el caso de *E. coli* se ha descrito que la

misma es capaz de activar rápidamente su metabolismo frente al ingreso alóctono de MO al ambiente (Noble *et al.*, 2004). Dado que la mayor concentración de MOP se detectó durante los muestreos de verano (Figura 7c) y considerando el alto número de personas (aprox. 160000) que visitaron el Parque en estas épocas (AAP, Figura 4a), inferimos que se habría incrementado la frecuencia en el uso de las cachimbas y los pozos negros. Esto pudo promover las filtraciones a través de la napa freática de aguas residuales conteniendo materia orgánica, estimulando el crecimiento de los CF (Figura 9 principal). A su vez, el hecho de que se hayan medido concentraciones de OD en agua inferiores en verano (AAP) respecto al invierno (BAP) (Tabla 6) confirmaron que los CF estuvieron metabólicamente activos descomponiendo el carbono orgánico y consumiendo el OD disponible del sistema (Arocena y Conde., 1999, Noble y Fuhrman., 1999), principalmente en AAP. Nuestros resultados coincidieron con un estudio previo realizado en el agua subterránea del PNCP empleando microcosmos, donde se demostró mediante hibridación *in situ* fluorescente que el crecimiento de una población de *E. coli* se estimuló por los aportes de MOP (Soumastre *et al.*, 2015). A su vez, son similares a los reportados por Perdomo y colaboradores (2001) quienes demostraron que la cercanía entre pozos sépticos y cachimbas del litoral suroeste de nuestro país, promovió la contaminación fecal del agua subterránea del sitio. Finalmente, la existencia de una relación estadísticamente significativa entre el contenido de PT y CF durante el período analizado (Spearman,  $p \leq 0.05$ ;  $r_s = 0.42$ ) indicaron que pudo haber sido posible que el fósforo detectado esté representado mayoritariamente por formas orgánicas, debido al aporte de los pozos negros. Sin embargo, para

determinarlo se requeriría una caracterización del agua subsuperficial que analice el agua en zonas alejadas de los pozos negros y que a la vez determine químicamente las formas solubles y orgánicas de este elemento. Un estudio de estas características sería relevante para aportar información para el manejo de la calidad del agua en el PNCP.

En cuanto a la concentración de NT detectada en el agua de las cachimbas del Parque, el decreto N° 253 de la DINAMA establece valores permitidos de hasta 10 mg/L y según las mediciones realizadas *in situ* no debería considerarse contaminada por este elemento. Sin embargo, pensamos que la metodología de muestreos empleada (colectas esporádicas) no permitió la detección de picos momentáneos de N, lo que no significa que no ocurrieron durante el período analizado. De hecho, los valores de NT se mantuvieron relativamente elevados y constantes durante el período interanual analizado (Figura 8a). Esta limitación inherente a la dinámica de los muestreos es compartida por Perdomo y colaboradores (2001) así como por Arocena y colaboradores (1999) quienes consideran que la realización de colectas espaciadas en el tiempo proporciona una visión puntual de las variables de interés.

Por otra parte, si bien los valores de enterobacterias detectados mediante CARD-FISH se mantuvieron relativamente constante entre las distintas épocas analizadas, es importante mencionar que las abundancias detectadas fueron similares a las descritas para los sistemas límnicos naturales (Baudart *et al.*, 2002). Estos resultados eran esperables por tratarse de agua subterránea. El hecho de que se hayan encontrado diferencias en la abundancia de la comunidad de enterobacterias cultivables (CF), no así en la

de la comunidad total se relaciona con la sensibilidad de las técnicas empleadas en su detección. Como se ha comentado anteriormente, las técnicas tradicionalmente empleadas para la cuantificación de microorganismos en agua se basan en el cultivo de éstos en medios específicos (APHA., 1995; APHA., 2013). A pesar de ser metodologías sencillas de implementar, el éxito de las mismas depende en parte de la naturaleza de la muestra a analizar. Se ha descrito incluso que éstas pueden llegar a subestimar considerablemente los valores reales de abundancias bacterianas para el caso de muestras ambientales (Soumastre *et al.*, 2015; Korzeniewska y Harnisz., 2012). El principal inconveniente es que las células pueden encontrarse en dormancia (*starvation*) siendo difícil su recuperación en los medios de cultivo empleados (Quilliam *et al.*, 2011; Oliver., 2005); a pesar de mantener su viabilidad. Estas limitaciones sugieren que en el presente trabajo la técnica FM permitió la cuantificación de tan solo una fracción de la comunidad total de enterobacterias presentes en el agua subterránea del PNCP, reflejando la menor sensibilidad de este tipo de técnicas frente a las moleculares como CARD-FISH.

De manera similar, el pH y la conductividad eléctrica del agua también se mantuvieron relativamente constante durante el período evaluado, coincidiendo con los valores esperados para los ambientes de agua dulce (entre 6.5 y 8.5 para el caso del pH y entre 50 a 1000  $\mu\text{Scm}^{-1}$  de conductividad) (Collazo y Xavier., 2012; Arocena y Conde., 1999). Una excepción fueron las cachimbas ubicadas en las zonas de dunas y con vegetación, cercanas a las playas Sur y “La Calavera” del Parque respectivamente. En estos pozos se midieron valores de conductividad característicos de agua salada ( $>50000 \mu\text{Scm}^{-1}$ , Collazo y Xavier., 2012), lo cual era esperable debido a la proximidad

de estos pozos al mar. Si bien algunos autores indican que la salinidad del agua (vinculada estrechamente con la conductividad mediante la multiplicación por 0.6 como factor de conversión) afecta negativamente el crecimiento de las enterobacterias (Menon *et al.*, 2003); evidencias más recientes han demostrado que *E. coli* es capaz de persistir durante períodos prolongados en hábitats de agua salada como los sistemas marinos (Perini *et al.*, 2015). Por tanto, para el caso de las cachimbas ubicadas en las ZD y ZV, la capacidad de *E. coli* de sobrevivir fuera del tracto intestinal y adaptarse rápidamente a otros ambientes podría representar un riesgo de contaminación fecal para el agua de las playas de Cabo Polonio. En este sentido, eventos puntuales de contaminación fecal de las playas del Parque se han reportado anteriormente en la prensa nacional (La Diaria., 2012).

### **Potencial patogénico del agua subterránea destinada a consumo del PNCP**

Los resultados encontrados indicaron la presencia de genes implicados en la virulencia de *E. coli* patogénica en el agua subterránea del Parque, específicamente los que codifican para la toxina Shiga (*stx*) y para la proteína intimina (*eae*); vinculados a la presencia de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), respectivamente (Kaper *et al.*, 2004; Melton-Celsa *et al.*, 1998). La ausencia de un patrón temporal característico para la presencia de estos genes sugiere que la misma representa un riesgo para la salud de quienes hacen uso del recurso, independientemente de la época del año. Sumado a esto, las bajas dosis infectivas con las que estos patógenos son capaces de provocar enfermedades gastrointestinales en el hombre (entre 10 a 100 células) (Huang *et al.*, 2016;

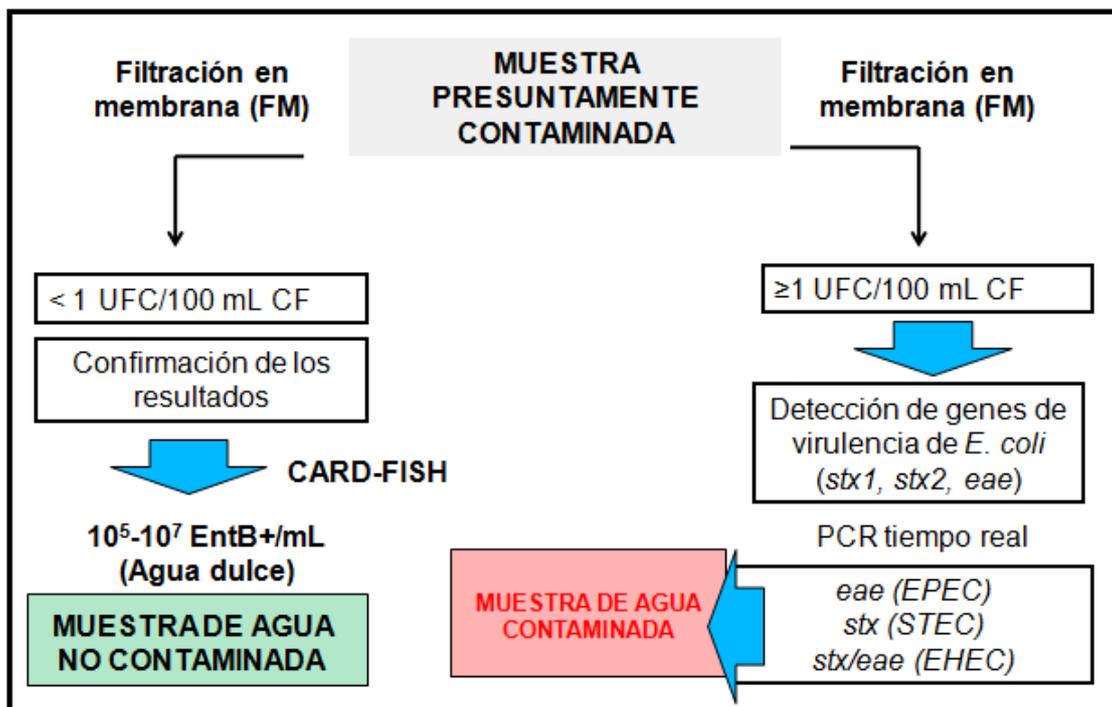
Percival y Williams., 2011), incrementa la importancia de controlar y generar alerta frente a su presencia en el agua destinada a consumo en el PNCP. En este sentido, según datos aportados por el servicio de Guarda Parques del área, durante el período en el que se llevó adelante este estudio ocurrieron entre seis y ocho consultas médicas por diarrea en la zona.

Por otra parte, la presencia de rotavirus en el agua subterránea del Parque durante la temporada de BAP confirmó el riesgo de contraer enfermedades diarreicas debido al consumo de agua contaminada con microorganismos de origen fecal aún durante las estaciones frías.

Es importante mencionar que el criterio de selección elegido para evaluar la presencia de genes asociados a la patogenicidad de las enterobacterias detectadas en el agua subterránea del Parque (muestras positivas por FM) coincidió con los resultados obtenidos por Huang y colaboradores (2016), quienes detectaron la presencia de cepas de *E. coli* diarreogénicas (DEC) en muestras de agua dulce asociada a la de CF. En este sentido, consideramos que una estrategia efectiva que permita conocer el riesgo de consumir agua contaminada con enterobacterias patógenas como la que llevamos adelante en este trabajo, es de vital importancia para evitar el desarrollo de enfermedades del tipo diarreicas. Consideramos que la realización de un *screening* primario para detectar la presencia de coliformes fecales en las muestras de agua mediante FM permite conocer rápidamente y en rasgos generales el nivel de contaminación del cuerpo de agua afectado. Posteriormente, una vez establecida la cantidad de muestras positivas y el valor de UFC de coliformes detectado, los datos pueden ser confirmados mediante la técnica CARD-FISH. Para ello, la hibridación con una sonda

específica para enterobacterias como la que empleamos en este trabajo es adecuada; o incluso la utilización de una que hibride con bacterias presentes al grupo de los coliformes fecales, específicamente con la especie *E. coli*. Finalmente, es necesario determinar si efectivamente su presencia en las muestras de agua se asocia a la de microorganismos patógenos. Para ello, la detección de genes relevantes para la patogenicidad del microorganismo en cuestión puede ser llevada a cabo mediante el empleo de una o más técnicas moleculares, como ser la PCR en tiempo real. El esquema I resume mediante una matriz decisión la estrategia anteriormente recomendada. El análisis de otros microorganismos indicadores de contaminación como ser los virus entéricos y/o protozoarios también puede ser considerado.

**Esquema I.** Matriz de decisión para definir los pasos a realizar al momento de analizar una muestra de agua presuntamente contaminada con microorganismos entéricos potencialmente patógenos.



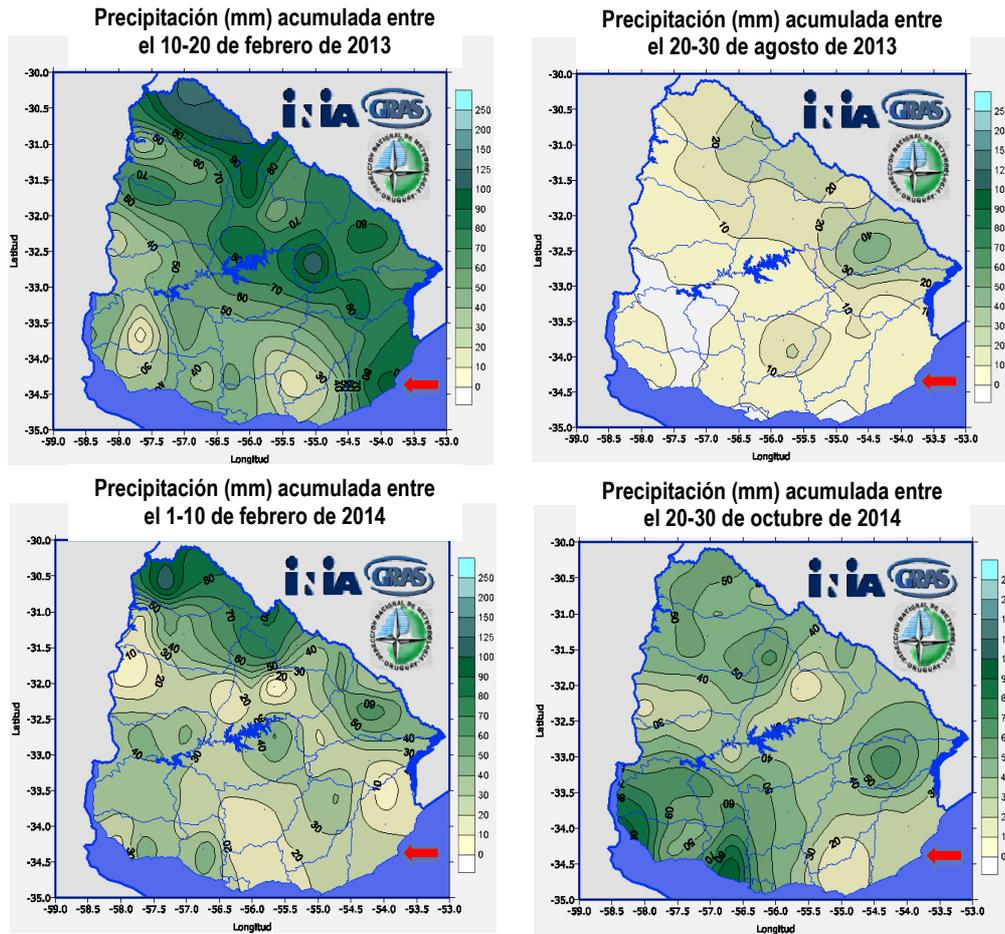
### **Distribución espacio-temporal de la contaminación del agua subterránea**

Como se mostró en este trabajo, las cachimbas del PNCP presentaron una correlación espacial entre ellas en el año 2014 (tanto en alta como en baja temporada) cuando la variable CF, indicadora de la presencia de contaminación fecal en el agua subterránea fue analizada. Estos resultados contrastaron con los del año anterior (2013), en el que no se detectó una distribución espacial marcada de la variable CF; sugiriendo que hubo variabilidad en las condiciones ambientales entre ambos años. Dentro de estas condiciones, las precipitaciones pueden haber tenido un impacto sobre el flujo de agua entre cachimbas, provocando una mayor homogeneidad espacial. Como se muestra en la Figura 13, en el año 2013 y especialmente durante los días en que se realizó el muestreo de verano la precipitación acumulada estuvo entre los 80 y los 100 mm. Por otra parte, en el año 2014 las precipitaciones fueron menores (entre 20 y 30 mm), en las semanas en las que se realizaron las colectas de las muestras (ambas temporadas). Esta baja acumulación de lluvias podría ser la causa de una mayor zonación en la concentración de CF en el año 2014.

Estos resultados ponen de manifiesto la vulnerabilidad del agua subterránea frente a fenómenos climáticos, ya que la abundancia de precipitaciones podría generar la saturación del agua en el suelo con la subsiguiente contaminación cruzada entre pozos negros y cachimbas. Esto sería en parte causado por la estructura arenosa del suelo y reviste especial relevancia en la zona de dunas. Dado que no se conoce aún la hidrología del

agua subterránea ni la dirección de sus flujos en el Parque, no ha sido posible realizar un mapa de predicción basado en interpolación (*kriging*) que permita predecir con certeza la presencia de CF en determinado sitio. Los análisis de autocorrelación espacial realizados en este trabajo constituyen el primer paso para la aplicación de este tipo de métodos.

Es importante mencionar además que durante el año 2014 el PNCP fue visitado por aproximadamente 20 mil visitantes menos que en el año 2013 (Ver Figuras 4b y 4c). Esta diferencia en el número de personas que concurrieron al Parque puede sumarse a los factores que intentan explicar el por qué de la zonación encontrada en este año. Es probable que muchas de las viviendas no se encontrasen habitadas, de manera que la carga de residuos líquidos que se generaron durante ese año pudo haber sido menor. En consecuencia, el aporte de MO y nutrientes desde los pozos negros hacia el agua subterránea también, detectándose un menor número de coliformes fecales en las muestras de agua analizadas.



**Figura 13.** Mapas de precipitaciones acumuladas (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA) para las fechas en las que se realizaron los muestreos (2013 y 2014).

**Efecto de la geomorfología del Parque en la contaminación del agua subterránea**

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que la contaminación microbiana y orgánica del agua subterránea del PNCP se relacionó con la geomorfología del terreno, donde la zona del centro poblado fue la más afectada. Estos hallazgos confirman la hipótesis de que la abundancia de enterobacterias con potencial patogénico en el agua subterránea del PNCP es mayor en las zonas que presentan una alta densidad de viviendas y pozos sépticos, como ocurre en este sitio. En este sentido, nuestros resultados

también indicaron que el número de CF detectados en el agua subterránea del Parque se relacionó con la distancia al pozo séptico más cercano (Ver Tabla 9), principalmente durante la temporada de AAP. Estos hallazgos son similares a los encontrados anteriormente por otros autores (Perdomo *et al.*, 2001., Yates., 1985) donde se ha demostrado que los pozos negros contribuyen con volúmenes importantes de aguas residuales conteniendo microorganismos entéricos, MO, iones cloruros, sulfatos, nitratos, nitritos, amonio, nitrógeno y fósforo total (Canter y Knox., 1985) y representan la causa más frecuente de contaminación de las aguas subterráneas asociada a brotes de enfermedades.

## **CONCLUSIONES**

En primer lugar se logró el objetivo principal del trabajo detectándose la presencia de bacterias y virus entéricos con potencial patogénico en el agua subterránea destinada a consumo obtenida de cachimbas del PNCP durante el período interanual analizado. La técnica de filtración en membrana permitió la cuantificación de la fracción de enterobacterias correspondiente al grupo de los coliformes fecales como *E. coli*, mientras que la técnica molecular *CARD-FISH* permitió el procesamiento de un gran número de muestras en tiempos relativamente cortos (semanas) de forma específica. La presencia de coliformes fecales se asoció a la alta densidad de personas, a la materia orgánica (principalmente al fósforo orgánico) y a la distancia al pozo séptico más cercano. Se concluye de esta manera que las principales causas de contaminación orgánica y microbiana del agua subterránea del PNCP son la inadecuada construcción y mantenimiento de los pozos sépticos de las viviendas al promover las filtraciones de aguas servidas por debajo de la napa freática, así como la alta densidad de personas que ingresan al sitio principalmente durante los meses de verano (diciembre a marzo). Se demostró que la ausencia de una adecuada ordenación del territorio en esta Área Protegida conduce al aporte de MO, nutrientes y microorganismos entéricos al agua subterránea del Parque, demostrándose la vulnerabilidad de la misma a fuentes orgánicas, químicas y microbianas de contaminación.

La presencia de rotavirus y genes implicados en la virulencia de *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* productora de toxina Shiga y *E. coli*

enteropatógena en el agua subterránea del Parque reflejaron la importancia de realizar monitoreos microbiológicos periódicos en el agua de las cachimbas del Parque de manera de garantizar un consumo de agua seguro. Encontramos sumamente importante promover la utilización de técnicas alternativas a la FM como lo son las herramientas moleculares (CARD-FISH y/o PCR en tiempo real), de manera de evitar subestimar la presencia de bacterias con potencial patogénico en muestras de agua destinadas a consumo humano. En este sentido, no sólo se logró poner a punto una metodología rápida y eficaz para la detección de los patotipos de mayor relevancia para la salud pública de *E. coli* (EHEC, STEC y EPEC) en muestras de aguas dulce recolectadas de ambientes acuáticos naturales sino que también se diseñó una matriz de decisión para conocer cómo proceder frente a la presencia de muestras de agua presuntamente contaminadas con microorganismos patógenos. Las mismas podrán ser aplicadas para el control microbiológico de otros sistemas de nuestro país con problemáticas de contaminación de su agua similares a las del PNCP.

Se constató la existencia no solo de diferencias temporales en cuanto a la abundancia de microorganismos indicadores de contaminación (alta temporada vs. baja temporada y entre los distintos años), sino también una distribución espacial muy marcada de la presencia de CF. Esto podría estar directamente vinculado a factores tales como las precipitaciones, el flujo subterráneo de agua y la densidad de personas. Asimismo, la zona con vegetación del Parque se presenta como una zona donde se concentran los niveles más bajos de contaminación del agua subterránea. La realización de estudios más detallados para identificar puntos de extracción de agua segura

para consumo humano en esta zona serían importantes para resolver la problemática de la calidad del agua del sitio.

## **PERSPECTIVAS**

En la actual propuesta del Plan de Manejo del Área se proponen como estrategias a corto plazo para disminuir la contaminación del agua subterránea del sitio controlar la potabilidad del agua de las cachimbas así como un adecuado manejo de los tanques sépticos (Sprechmann y Capandeguy., 2012). Para ello, sería necesario sustituir aquellos que se encuentran rotos o son directamente abiertos (sin tapa). Nuestros resultados demostraron que la actual disposición de los residuos líquidos representa uno de los principales problemas que afectan la calidad del agua subterránea del sitio, por lo que controlar la descarga de los mismos ayudaría a reducir su contaminación. Por tanto, entre las perspectivas más importantes de esta Tesis se encuentra la realización de un modelo de predicción (por ejemplo, basado en modelos de kriging) para encontrar aquellas zonas del PNCP que se encuentren menos expuestas a la contaminación orgánica y microbiológica proveniente de los pozos sépticos.

Se plantea además desarrollar e iniciar un programa de educación ambiental en relación al uso sostenible del agua. En este sentido sería interesante la participación de profesionales varios, pobladores permanentes, gestores y autoridades competentes en talleres y/o reuniones para tratar la problemática de la calidad del agua del Área y elaborar juntos medidas que apunten a su conservación.

A mediano plazo, la propuesta del Plan de Manejo hace referencia al interés de realizar nuevos pozos y perforaciones en el Área y menciona la participación del ente estatal OSE para llevar adelante las tareas (Sprechmann y Capandeguy., 2012). Una propuesta relativamente convencional sería la distribución de agua potable por cañería pero ésta, a pesar de suponer un abastecimiento seguro, eficiente y suficiente del recurso, impactaría negativamente en el ambiente de la zona ya que no solo aumentarían los volúmenes de consumo sino también los de los líquidos cloacales a disponer. Asimismo, la conservación del suelo del sitio podría verse afectada (Sprechmann y Capandeguy., 2012).

Por tanto, consideramos que una de las medidas más promisorias para disminuir o controlar la contaminación del agua subterránea en esta área protegida sería una adecuada redistribución de las cachimbas de manera de asegurar su alejamiento de las fuentes de contaminación. Nuestros resultados indican que los acuíferos, quienes experimentan altas tasas de carga y recambio de agua, son particularmente propensos a ser contaminados con materia orgánica y microorganismos de origen fecal si cuentan con fuentes próximas. En este sentido, la distancia entre pozos de este tipo recomendada por la Intendencia de Rocha es de 20 m. No obstante, cuanto mayor sea la distancia entre ellos mayor será el tiempo de tránsito del contaminante en el agua subterránea de manera que la probabilidad de eliminarlo también (Collazo y Xavier., 2012). La perforación y construcción de nuevas cachimbas en zonas donde sea posible acceder a agua de buena calidad podría complementarse con el empleo de especies vegetales nativas alrededor de las mismas. Estas

últimas al actuar como filtros biológicos competirían con los microorganismos del agua por los nutrientes, evitando su proliferación.

Asimismo, la puesta en marcha de un programa de monitoreo periódico del agua en colaboración con la intendencia de Rocha debería ser prioritariamente considerado en el Plan de Manejo del Área. De esta manera sería posible generar alertas tempranas y el riesgo de contraer enfermedades debido al consumo de agua contaminada también disminuiría.

Otro de los factores que consideramos que debería controlarse rigurosamente para disminuir la contaminación del agua subterránea es determinar la capacidad de carga del Parque y regular el ingreso de personas en base a dicha información. Como demostramos en nuestro estudio, la alta densidad de ingresos sobrepasa la capacidad de carga del sistema favoreciendo las filtraciones de agua contaminada por debajo de la napa freática.

## **ABREVIATURAS**

ADN: Ácido desoxirribonucleico

aEPEC: EPEC atípicas

APHA: American Public Health Association

ARNr: ARN ribosomal

AAP: alta afluencia de personas

B: bajíos del PNCP

BAP: baja afluencia de personas

BH: buffer de hibridación

BSA: seroalbúmina bovina

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

CF: coliforme fecal

CP: cachimba polonio

CT: coliformes totales

CSs: antígenos de superficie de *E. coli*

CFAs: factores de colonización de *E. coli*

CARD-FISH: hibridación in situ fluorescente y deposición catalizada por reporteros

CE: campo elevado del PNCP

CD: cordón dunar del PNCP

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

DM: dunas móviles del PNCP

DINAMA: Dirección Nacional de Medio Ambiente

DS: disco de Secchi

DEC: *Escherichia coli* diarreogénica

DAEC: *E. coli* de adherencia difusa

DBO5: Demanda Bioquímica de Oxígeno

DINARA: Dirección Nacional de Recursos Acuáticos

DINAMA: Dirección Nacional de Medio Ambiente

CENUR Noroeste: Centro Universitario de la Región Norte  
CURE: Centro Universitario de la Región Este  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EC: conductividad eléctrica  
ExPEC: *Escherichia coli* extra intestinal  
EPEC: *E. coli* enteropatógena  
ETEC: *E. coli* enterotoxigénica  
EIEC: *E. coli* enteroinvasiva  
EAggEC: *E. coli* enteroagregativa  
EHEC: *E. coli* enterohemorrágica  
EntB+: bacterias hibridadas con la sonda *EnterobactB* ó enterobacterias positivas  
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura  
FM: filtración en membrana  
FISH: Hibridación *In Situ* Fluorescente  
GF/F: filtros de fibra de vidrio  
GTTP: filtro de policarbonato  
HC: colitis hemorrágica  
HRP: peroxidasa de rábano picante  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
Isla de patogenicidad LEE: *locus of enterocyte effacement*  
LT: toxina termolábil  
MO: materia orgánica  
m.o: microorganismo  
MOP: materia orgánica particulada  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio  
NaCl: cloruro de sodio  
N: nitrógeno  
NT: nitrógeno total

NTU: unidad de turbidez nefelométricas  
OD: oxígeno disuelto  
OSE: Obras Sanitarias del Estado  
PRS: fósforo reactivo soluble  
P: fósforo  
PT: fósforo total  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PNCP: Parque Nacional Cabo Polonio  
PBS: buffer fosfato salino  
PFA: paraformaldehído  
R: zona de rocas del PNCP  
ST: toxina termoestable  
Stx: toxina Shiga  
SUH: síndrome urémico-hemolítico  
SNAP: Sistema Nacional de Áreas Protegidas  
T: temperatura  
TIS: índice de estado trófico  
tEPEC: EPEC típicas  
UPEC: *E. coli* uro-patogénica  
UFC: unidades formadoras de colonias  
VBNC: célula viable no cultivable  
WHO: World Health Organization

## **BIBLIOGRAFÍA**

**Albert L., 1997.** Compuestos orgánicos persistentes. Introducción a la Toxicología Ambiental. ECO/OPS/OMS. pp. 333-335.

**Alonso C., Zeder M., Piccini C., Pernthaler J., 2009.** Ecophysiological differences of betaproteobacterial populations in two hydrochemically distinct compartments of a subtropical lagoon. *Environmental Microbiology*. 11: (4) 867-876.

**Alonso C., Piccini C., Unrein F., Bertoglio F., Conde D., Pernthaler J., 2013.** Environmental dynamics as a structuring factor for microbial carbon utilization in a subtropical coastal lagoon. *Frontiers in Microbiology*. 4: (14) 1-19.

**Amann R. I., Krumholz L., Stahl D.A., 1990.** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*. 172: 762-770.

**Amann R., Ludwig W., Schleifer K-H., 1995.** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59:143-169.

**American Public Health Association., 1995.** Standard methods for the examination of water and wastewater.

**American Public Health Association., 2013.** Standard methods for the examination of water and wastewater. Heterotrophic plate count.

**Arocena R., Conde D., 1999.** Métodos en ecología de aguas continentales. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. DI.R.A.C

**Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Riel L.A., Thingstad F., 1983.** The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology* 10:257-263.

**Banatvala N., Griffin P.M., Greene K.D., Barrett T.J., Bibb W.F., Green J.H., Wells J.G., 2001.** Hemolytic Uremic Syndrome Study Collaborators. The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *Journal of Infection Diseases*. 183:1063-1070.

**Barcina I., Lebaron P., Vives-Rego J., 1997.** Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiology Ecology*. 23: 1-9.

**Bathia M., Goyal D., 2013.** Analyzing remediation potential of wastewater through wetland plants: A review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 2013, 00:1-19.

**Baudart J., Lebaron P., 2010.** Rapid detection of *Escherichia coli* in waters using fluorescent in situ hybridization, direct viable counting and solid phase cytometry.

**Bentancour G., 2013.** Detección y análisis molecular de Rotavirus a partir de aguas provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Tesis de grado. Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. Sección de Virología.

**Boi P., Amalfitano S., Manti A., Semprucci F., Sisti D., Rocchi M.B., Balsamo M., Papa S., 2015.** Strategies for water quality assessment: a

multiparametric analysis of microbiological changes in river waters. River Research and Applications. DOI: 10.1002/rra.

**Blaustein R.A., Pachepsky Y., Hill RL., Shelton DR., Whelan G., 2013.** *Escherichia coli* survival in waters: temperature dependence. Water Research. 47(2): 569-578.

**Borruso L., Zerbe S., Brusetti L., 2015.** Bacterial community structures as a diagnostic tool for watershed quality assessment. Research in Microbiology. 166: 38-44.

**Bosch, A., Guix, S., Sano, D. and Pintó, R.M., 2008.** New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. Current Opinion in Biotechnology. 19(3): p. 295-301.

**Brauman K.A., Daily G.C., Duarte T., Mooney H., 2007.** The nature and value of ecosystem services: an overview highlighting hydrologic services. Annual Review of Environment and Resources. 32:67-98.

**Bu H., Tan X., Li S., Zhang Q., 2009.** Temporal and spatial variations of water quality in the Jinshui River of the South Qinling Mts. China. Ecotoxicology and Environmental Safety. Article in Press. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.11.007.

**Carpenter S. R., Stanley E. H., Vander Zanden M.J., 2011.** State of the World's Freshwater Ecosystems: Physical, Chemical, and Biological Changes. Annual Review of Environment and Resources. 36: 75-99.

**Carpenter S.R., Caraco N.F., Corell D.L., Howarth R.W., Sharpley A.N., Smith V.H., 1998.** Nonpoint pollution of surface waters with phosphorous and nitrogen. Ecological Applications. 8(3): 559-568.

**Caprioli A., Morabito S., 2005.** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*. 36:289-311.

**Chalarca Rodríguez R., Mejía Ruíz R., Aguirre Ramírez J., 2007.** Aproximación a la determinación del impacto de los vertimientos de las aguas residuales domésticas del municipio de Ayapel, sobre la calidad del agua de la ciénaga. *Revista de la Facultad de Ingeniería* N° 40. pp. 41-58.

**Charrois J. W.A., 2010.** Private drinking water supplies: challenges for public health. *Canadian Medical Association Journal*.182(10).

**Chassagne L., Pradel N., Robin F., Livrelli V., Bonnet R., Delmas J., 2009.** Detection of stx1, stx2 and eae genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* using SYBR Green in a real-time polymerase chain reaction. 64: 98-101.

**Chu W., Zere T.R., Weber M.M., 2012.** Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(2): 411-419.

**Collazo C. M.P; Xavier J., 2012.** Manual de agua subterránea. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Desarrollo Rural. Montevideo, Uruguay.

**Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., Mcgarrell, D. M., Sun, Y., 2014.** Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42, D633–D642. doi: 10.1093/nar/gkt1244.

**Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010.** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 26-38.

**CYTED. Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua. 2003.** Capitulo 20. Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domesticas.

**Delfino L., Masciadri S., 2005.** Relevamiento florístico en el Cabo Polonio, Rocha, Uruguay. Iheringia. Sér. Bot. Porto Alegre. 60(2):119-128.

**Djaouda M., Gaké B., Menye D.E., Togouet S.H.Z., Nola M., Njiné T., 2013.** Survival and growth of *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. in well water used for drinking purposes in Garoua (North Cameroon). International Journal of Bacteriology.2013: 1-7.

**Environmental Protection Agency., 2002.** Drinking water from household wells. p. 1-19.

**Environment Protection Agency (EPA)., 1996.** Guía del ciudadano: medidas fitocorrectivas [en línea]. Estado Unidos, 1996. Disponible en <http://www.epa.gov/swertio1/download/remed/spanphyt.pdf> fitorremediación

**FAO., 1997.** Capítulos 1, 3, 4. Contaminación agrícola de los recursos hídricos. pp..1020-4393.

**FAO., 2002.** Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido. ISBN. 92-5-304761-5. pp. 75-78.

**Ferguson A., Layton A.C., Mailloux B.J., Culligan P.J., Williams D.E., Smartt A.E., Sayler G.S., Faighery J, McKay L.D., Knappett P.S.K, Alexandrova E., Arbit T., Emch M., Escamilla V., Ahmed K.M., Alam M.J., Streatfield P.K., Yunus M., Van Geen A., 2012.** Comparision of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in groundwater. Science of the Total Environment. 431:314-322.

**Fong, T. T., Lipp, E. K., 2005.** Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69(2): p. 357-71.

**Girones R., Ferrús M.A., Alonso J.L., Rodríguez-Manzano J., Calgua B., De Abreu Correa A., Hundesa A., Carratala A., Bofill-Mas S., 2010.** Molecular detection of pathogens in water- The pros and cons of molecular techniques. 44: 4325-4339.

**Gurevich A., Saveliev V., Vyahhu N., Tesler G., 2013.** QUASt: quality assessment tool for genome assemblies, *Bioinformatics*. 29 (8): 1072-1075.

**Gutiérrez Cacciabue. D., 2013.** Resistencia y persistencia de organismos patógenos en ambientes acuáticos de la provincia de Salta- Sistemas para la mitigación y el control de la contaminación. Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ingeniería, orientación Ambiental. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Salta, Argentina.

**Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D., 2001.** PAST: Paleontological Statistics Software package for education and data analysis. *Paleontología electronica* 4(1):9 pp.

<http://ww.arb-silva.de>. Consultado el 01/12/2015.

<http://ocw.unican.es>. Tema 11. Contaminación de las aguas. Consultado el 01/12/2015.

**Huang W-C., Hsu B-M., Kao P-M., Tao C-W., Ho Y-N., Kuo C-W., Huang Y-L., 2016.** Seasonal distribution and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in different aquatic environments in Taiwan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 124: 37-41.

**Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D., 2002.** Manual of Environmental Microbiology, second ed. ASM Press, Washington, DC.

**Hynds P., Misstear B.D., Gill L.W., Murphy H.M., 2014.** Groundwater source contamination mechanisms: Physicochemical profile clustering, risk factor analysis and multivariate modeling. *Journal of Contaminant Hydrology*.159: 47-56.

**Intendencia de Rocha., 2012.** Directrices departamentales de ordenamiento territorial y desarrollo sostenible. Intendente departamental Artigas Barrios Fernández. Secretario general Darcy de los Santos. Departamento de Rocha, Noviembre de 2012.

**Jamieson R., Gordon R., Joy D., Lee H., 2004.** Assessing microbial pollution of rural surfaces waters. A review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management*. 70:1-17.

**John D.E., Rose J.B., 2005.** Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environmental Science and Technology*. 39: 7345-7356.

**Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2:123-140.

**Katayama H., Shimasaki A., Ohgaki S., 2002.** Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(3):1033-1039.

**Kazakis N., Voudouris K., 2015.** Groundwater vulnerability and pollution risk assessment of porous aquifers to nitrate: Modifying the DRASTIC method using quantitative parameters. *Journal of Hydrology*.525: 13-25.

**Kim H., Kaown D., Mayer B., Lee J-Y., Hydun Y., Lee K.K., 2013.** Identifying the sources of nitrate contamination of groundwater in an agricultural area (Hae-an basin, Korea) using isotope and microbial community analyses. *Science of the Total Environment* 533: 566-575.

**Kopic S., Saleh A., Geibel J.P., 2014.** Capítulo 8. The Heat-stable and Heat-labile enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. En: *Pathogenic Escherichia coli. Molecular and Cellular Microbiology*. EU Reference Laboratory for *E. coli*. Instituto Suoeriore di Sanità. Roma. Italia. ISBN:978-1-908230-37-9.

**Korzeniewska E., Harnisz M., 2012.** Culture-Dependent and Culture-Independent Methods in Evaluation of Emission of Enterobacteriaceae from Sewage to the Air and Surface Water. *Water Air Soil Pollution*. 223: 4039-4046.

**Kowalchuk G.A., Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D.L., 2002.** *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers. Second Edition. Volume 1. ISBN. 1-4020.2176-3.

**Kubota K., 2013.** CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes Environments*. 28(1): 3-12.

**Lan R., Alles M.C., Donohoe K., Martinez M.B., Reeves P.R., 2004.** Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infection and Immunity*. 72: 5080-5088.

**Leclerc H., Mossel D.A., Edberg S.C., Struijk C.B., 2001.** Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 201-234.

**Ley Nº 17234.** Diario Oficial. 09/03/2000. Nº 25477.

**Lebaron P., Catala P., Parthuisot N., 1998.** Effectiveness of SYTOX Green Satin for Bacterial Viability Assesment. *Applied and Environmental Microbiology.* 64: 2697-2700.

**Le Bouguenec C., Servin A.L., 2006.** Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesions (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 256: 185-194.

**Luque J., Herraéz A., 2006.** *Biología Molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud.* ISBN 84-8174-505-7.

**Mackereth, F.J.H., J. Heron, and J.F. Talling. 1978.** *Water analysis: some revised methods for limnologists.* Ambleside, UK: The Freshwater Biological Association.

**Madigan M.T., Martinko J.M, Parker J., 2004.** *Brock. Biología de los Microorganismos. Capítulos 1, 12.* 10a edición. Prentice-Hall. Madrid.

**Masciardi S., Figueredo E., Delfino L., 2006.** Fisonomía y composición florística de Cabo Polonio (Rocha, Uruguay). En: *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya.* VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo. i-xiv+668pp.

**Mazzeo N., 1999.** *Hidrófitas. Capítulo 16. Métodos en ecología de aguas continentales.* Universidad de la República. Facultad de Ciencias. DI.R.A.C

**Melton-Celsa A.R., O'Brien A., 1998.** Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli* strains. Kaper J.B., O'Brien A.D., eds. (American Society for Microbiology, Washington D.C), pp. 121-128.

**Menon P., Billen G., Servais P., 2003.** Mortality rates of autochthonous and fecal bacteria in natural aquatic ecosystems. *Water Research*. 37:4151-4158.

**Morabito S., 2014.** Pathogenic *Escherichia coli*. Molecular and cellular Microbiology. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* Infections in Humans. Caister Academic Press. ISBN: 978-1-908230-37-9.

**Moreno Franco D.P., Quintero Manzano J., López Cuevas A., 2010.** Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. *Contacto S*. 78:25-33.

**Morita R. Y., 1992.** Low-nutrients environments. In *Encyclopedia of Microbiology* ed. Lederberg J. pp. 617-624. San Diego, CA: Academic Press, Inc.

**Mulugeta S., Hindman R., Olszewski A.M., Hoover K., Greene K., Lieberman M., Mauro S., 2012.** Contamination level and location of recreational freshwater influence the ability to predict *Escherichia coli* concentration by qPCR targeting Bacteroides. *Journal of Environmental Management*. 103: 95-101.

**Murphy, J., and J.P. Riley., 1962.** A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31–36.

**Nataro J.P., Kaper J.B., 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. Rev. 1:142-201.

**National Academy of Sciences., 1969.** Eutrophication: causes, consequences, correctives. NAS. Washington. D.C.

**Neish A., 2009.** Reviews in basic and clinical gastroenterology. Gastroenterology. 136: 65-80.

**Neuenschwander S.M., Salcher M.M., Pernthaler J., 2015.** Fluorescence *in situ* hybridization and sequential catalyzed reporter deposition (2C-FISH) for the flow cytometric sorting of freshwater ultramicrobacteria. Frontiers in Microbiology. 6 (247): pp. 1-8.

**Nin M., Soutullo A., Rodríguez-Gallego L., Di Minin E., 2015.** Ecosystem services-based land planning for environmental impact avoidance. Ecosystem Services.

**Noble R.T., Lee I.M., Schiff K.C., 2004.** Inactivation of indicator microorganisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. Journal of Applied Microbiology. 96: 464-472.

**Nounou H.A., Ali S.M., Shalaby M.A., Asala R.G., 2013.** The treats of microbial contamination and total dissolved solids in drinking water of Riyadh`s rural areas, Saudi Arabia. Asian Biomedicine 7(4): 491-498.

**Oliver M.A., Webster R. 1990.** Kriging: a method of interpolation for geographical information systems. International Journal of Geographical Information Systems 4(3):313-332 doi:10.1080/02693799008941549

**Oliver J.D., 2005.** The viable but nonculturable state in bacteria. The Journal of Microbiology. 43: N° S. 93-100.

**Onabolu B., Jimoh D., Igboro S.R., 2011.** Source to point of use drinking water changes and knowledge, attitude and practices in Katsina State, Northern Nigeria. *Physics and Chemistry of the Earth*. 36: 14-15. 1189-1196.

**OPP, OEA, BID., 1992.** Uruguay: Estudio Ambiental Nacional. Disponible en: <http://www.oas.org/usde/publications/Unit/oea10s/begin.htm>. Consultado el 01/12/2015.

**OSE., 2013.** Obras Sanitarias del Estado. *Tratamientos aplicados*. Disponible en: [http://www.ose.com.uy/s\\_tratamientos\\_aplicados](http://www.ose.com.uy/s_tratamientos_aplicados). Consultado el 12/2015.

**Osek J., 2003.** Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factors genes.

**Ootsubo M., Shimizu T., Tanaka R., Sawabe T., Tajima K., Yoshimizu M., Ezura Y., Ezaki T., Oyaizu H., 2002.** Oligonucleotide probe for detecting Enterobacteriaceae by *in situ* hybridization. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 60-68.

**Paruch A. M., Maehlum T., 2012.** Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecological Indicators*. 23: 140-142.

**Paton A., Paton J., 1999.** Direct detection of shiga toxigénica *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *Journal of clinical Microbiology*. 37(10):3362-3365.

**Percival S.L., William D.W., 2014.** *Escherichia coli*. Chapter six. *Microbiology of waterborne diseases*. ISBN 978-0-12-415846-7.

**Perdomo C.H., Casanova O.N., Ciganda V.S., 2001.** Contaminación de aguas subterráneas con nitratos y coliformes en el litoral sudoeste del Uruguay. *Agrociencia*. Vol. V. Nº1. p:10-22.

**Perini L., Quero G.M., Serrano García E., Luna G.M., 2015.** Distribution of *Escherichia coli* in a coastal lagoon (Venice, Italy): temporal patterns, genetic diversity and the role of tidal forcing. *Water research*. 87: 155-165.

**Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R., 2002.** Fluorescence *In Situ* Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 3094-3101.

**Pernthaler., 2005.** Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 1-9.

**Piccini C., Conde D., Alonso C., Sommaruga R., Pernthaler J., 2006.** Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the Southwestern Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: (10) 6560-6568.

**Piccini C., Conde D., Pernthaler J., Sommaruga R., 2009.** Alteration of chromophoric dissolved organic matter by solar UV radiation causes rapid changes in bacterial community composition. *Photochemical & Photo biological Sciences*.8: 1321–1328.

**Pinckney J.L., Paerl H.W., Tester P., Richardson T.L., 2001.** The role of nutrient loading and Eutrophication in estuarine ecology. *Environmental Health Perspectives*. 109(5):699-706.

**Porter K.G., Sherr E.B., Sherr B.F., Pace M., Sanders R.W., 1985.** Protozoa in planktonic food webs. *K. Protozool*. 32: 409-415.

**Proctor C.R., Hammes F., 2015.** Drinking water microbiology- from measurement to management. *Current Opinion in Biotechnology*. 33: 87-94.

**Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., 2007.** SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188–7196. doi: 10.1093/nar/gkm864.

**Quilliam R.S., Williams A.P., Avery L.M., Malham S.K., Jones D.L., 2011.** Unearthing human pathogens at the agricultural-environment interface: A review of current methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in freshwater ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 140: 354-360.

**Rhymes J., Jones L., Lapworth D.J., White D., Fenner N., McDonald J.E., Perkins T.L., 2015.** Using chemical, microbial and fluorescence techniques to understand contaminant sources and pathways to wetlands in a conservation site. *Science of the Total Environment.* 511: 703-710.

**Roszak D.B., Colwell R.R., 1987.** Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Applied Environmental Microbiology.* 53: 2889-2983.

**Savichtcheva O., Okabe S., 2006.** Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water research.* 40: 2463-2476.

**Schraft H., Watterworth L.A., 2005.** Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3MTM Petrifilm™ plates with standard plating procedures. *Journal of Microbiological Methods* 60: 335-342.

**Sharma V.K., Dean-Nystrom E.A., 2003.** Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimina and Shiga toxins. *Veterinary microbiology*. 93: 247-260.

**Shelton D.R., Pachepsky Y.A., Kiefer L.A., Blaustein R.A., 2014.** Response of coliform populations in streambed sediment and water column to changes in nutrient concentrations in water. *Water Research*. 59: 316-324.

**Sherr E.B., Sherr B.F., 2002.** Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 293-308.

**SNAP, 2009.** Proyecto de ingreso del área protegida marino-costera de Cabo Polonio al Sistema Nacional de áreas Protegidas.

**Solarte Y., Peña M., Madera C., 2006.** Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Colombia Médica*. Volumen 37: 74-82.

**Soumastre M., Rodríguez-Gallego L., Piccini C., 2015.** Enterobacterial growth in coastal groundwater wells of Cabo Polonio (Uruguay): an experimental approach. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*. 10 (3): 182-188.

**Spreachmann, Capandengui., 2011.** Plan de Manejo del Parque Nacional Cabo Polonio. Departamento de Rocha, Uruguay. En: Asesoría Externa. 2011.

**Stetler R.E., 1984.** Coliphages as Indicators of Enteroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*. 48:668-670.

**Stewart J.R., Gast R. J., Fujioka R.S., Solo-Gabriele H.M., Meschke S.J., Amaral-Zettler L.A., Del Castillo E., Polz M.F., Collier T.K., Strom M.S., Sinigalliano C.D., Moeller P.D.R., Holland A.F., 2008.** The coastal

environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environmental Health*. 7(Suppl 2):S3.

**Stoecker K., Dorninger C., Daims H., Wagner M., 2010.** Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 922-926.

**Schultz A.C, Vega E., Dalsgaard A., Christensen L. S., Norrung B., Hoorfar J., Vinjé J., 2011.** Development and evaluation of novel one-step TaqMan realtime RT-PCR assays for the detection and direct genotyping of serogroup I and II noroviruses. *Journal of clinical virology*. 50:230-234.

**Tozzoli R., Scheutz F., 2014.** Capítulo 1. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in humans. En: *Pathogenic Escherichia coli*. Molecular and Cellular Microbiology. EU Reference Laboratory for E. coli. Instituto Suoeriore di Sanità. Roma. Italia. ISBN:978-1-908230-37-9.

**UNESO., 2006.** Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura. WWDR2: Water, a Shared Responsibility. The United Nations. World Water Development Report 2. Online: [www.unesco.org/water/wwap](http://www.unesco.org/water/wwap).

**Unión Europea., 2010.** Bienes y servicios ecosistémicos. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea. Setiembre 2009.

**US Bureau of the Census, 2008.** Current housing reports, series H150/07. American Housing Survey for the United States: 2007, U.S. Government Printing Office, Whashington, D.C. 20401 (Printed in 2008. Disponible en: <http://www.census.gov/prod/2008pubs/h150-07.pdf>). Consultado el: 01/12/2015.

**US EPA Seminar Publication. Welhead Protection., 2002** A guide for Small Communities. Chapter 3. "Guetting up to speed" for section C, "Groundwater contamination". EPA/625/R-93/002. Disponible en: <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/mgwc-gwc1.pdf>. Consultado el 01/12/2015.

**Varela G., Jasinski C., Gadea P., Tanzi M.N., Mota M.I., Arenas C., Pardo L., González B. S., González G., Sirok A., Schelotto F., 2007.** Escherichia coli enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. Revista Médica del Uruguay. 23:153-163.

**Valero A., Rodríguez M., Carrasco E., Pérez-Rodríguez F., García-Gimeno R., Zurera G., 2010.** Studying the growth boundary and subsequent time to growth of pathogenic *Escherichia coli* serotypes by turbidity measurements. Food Microbiology. 27: 819-828.

**Weaver J.E., Clements F.E., 1938.** *Plant Ecology*. McGraw-Hill. N.Y.

**WHO., 1993.** WHO. Guidelines for Drinking Water Quality. Vol 1. Recommendations, 2nd Edition. Geneva: World Health Organization.

**W.H.O., 2004.** Guidelines for Drinking-Water Quality Edition, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 3er Edition.

**Williams C.J., Lavrentyev P.J., Jochem F.J., 2008.** Bottom-up and top-down control of heterotrophic bacterioplankton growth in a phosphorus-depleted subtropical estuary, Florida Bay, USA. Marine Ecology Progress Series. 372: 7-18.

**Woese C., Kandler O., Wheelis M.L., 1990.** Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 87: 576-4579.

**Yates M., 1986.** Septic tank density and ground-water contamination. Ground-water 23(5):586-591.

**Yoder J.S., Blackburn B.G., Craun G.F., Hill V., Levy D.A., Chen N., Lee S.H., Calderon R.L., Beach M.J., 2004.** Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water- United States, 2001-2002. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) Surveillance Summaries. 53(8):1-22.

**Zhou J., Bruns M. A., Tiedje J., 1996.** DNA Recovery from soils of diverse composition. Applied and Environmental Microbiology.62: 316-322.

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de esta Tesis de Maestría se realizó en el marco de una Beca de Iniciación a la Investigación financiada por la Comisión Sectorial de Investigación Científica y de una Beca de Posgrado Nacional (POS\_NAC\_2014\_1\_102646) otorgada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación.

Se agradece la colaboración de la Intendencia de Rocha, del Sistema Nacional de Áreas Protegidas, del Servicio de Guardaparques del Parque Nacional Cabo Polonio y al Sr. Gonzalo Picasso.

Agradecimientos especiales al Dr. Matías Victoria y su grupo de investigación del Centro Universitario de la Regional Norte (Salto), por su colaboración durante las jornadas de los muestreos y en la detección de virus entéricos. Al Dr. Martín Bessonart (UdelaR, DINARA), por su apoyo logístico para el trabajo de laboratorio en Cabo Polonio. Al Dr. Juan E. Piccini (UdelaR), por su asesoramiento y contribución en los análisis estadísticos. A la Lic. Carolina Lescano (CURE, UdelaR), por su colaboración en el procesamiento de las muestras para el análisis de nutrientes.

Quisiera agradecer en primer lugar al Dr. Pablo Zunino por permitirme formar parte del equipo de trabajo del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable durante casi cinco años, donde siempre soy bien recibida.

A mi tutora, la Dra. Claudia Piccini, por guiarme en mis inicios como investigadora, durante el desarrollo de mis tesis de grado y posgrado. Especialmente agradecerle su paciencia, sus palabras y consejos, su

dedicación como orientadora y como persona. Su buena disposición para con este trabajo y por recordarme bastante seguido que “disfrute más”. Muchas gracias de corazón.

A mi cotutora, la Dra. Lorena Rodríguez-Gallego por aceptar la cotutoría de este trabajo siempre con buena disposición e interés, por sus sugerencias, ideas y conocimientos que sumaron al éxito de este trabajo.

A la colonia, especialmente a mis amigos de la línea Ecología Microbiana Acuática, por todos estos años de apoyo, escucha y compañerismo. Muchas gracias Gaby, Ger y Pau!!! más que contenta por habernos conocido. Al resto de la colonia, gracias por estar en el día a día, por los mates compartidos, por los intercambios de “piques” de laboratorio y por aguantarme en las etapas finales de este trabajo. Especialmente a mis amigas “Las Clementinas” y al resto de quienes forman parte del Departamento.

A mi madre por brindarme las herramientas para estudiar y vivir en Montevideo mientras fui estudiante, gracias por tu sacrificio diario que junto con al mío me han permitido convertirme en alguien que me gusta mucho.

A mi padre, por intercambiar charlas sobre Ciencia y alentarme a seguir estudiando a pesar de mi cansancio en la recta final de este trabajo.

A mi hermana y mejor amiga. Por ser mi motor y motivo de admiración constante. Gracias por tener siempre las palabras justas para mí y por creer en mí.

A mis primas grandes, mis segundas hermanas. Gracias por las charlas de la vida, la compañía y ser mis referentes. Al resto de mi familia, abuela, tías/os y primos chicos. Gracias por estar a pesar de la distancia.

A mis amigas de Fcien: Se, Romi, Lu y Niki. Hoy termino un camino que empezamos juntas hace diez años, simplemente gracias por estar.

A mis amigas y amigos de la vida.

A Ine, Pau y Pollo de LATU, por compartir conmigo casi dos años mientras hice esta tesis, por su flexibilidad horaria, paciencia y palabras de aliento en momentos claves.

A mis nuevos compañeros de trabajo, Majo, Francisco, Sergio y Gabriel, por acompañarme en las últimas etapas de este trabajo.