



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias del Agua

“Ocurrencia Espacio-Temporal de Colífangos, *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) y Adenovirus humanos (HAdVs) en la Caleta de Yal-kú, Quintana Roo”

Tesis que presenta:

Luis Jorge Negrete Alcalde

En opción al título:

MAESTRO EN CIENCIAS DEL AGUA

Cancún, Quintana Roo. México, agosto de 2019

Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

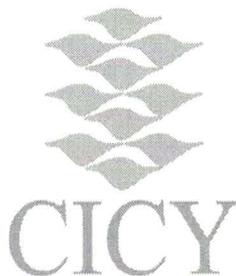
Firma: _____



Nombre: Luis Jorge Negrete Alcalde

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS DEL AGUA



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Luis Jorge Negrete Alcalde** titulado “**Ocurrencia Espacio-Temporal de Colifagos, Pepper mild mottle virus (PMMoV) y Adenovirus humanos (HAdVs) en la Caleta de Yal-kú, Quintana Roo**” fue realizado en la Unidad de Ciencias del Agua, en la línea de Calidad del Agua, en el Laboratorio de Biología Molecular, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la codirección de la Dra. Cecilia Hernández Zepeda perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias del Agua de este Centro y el Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz del Centro de Investigación y Desarrollo, A. C.

Atentamente.

Dra. Clelia De La Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 16 de agosto de 2019.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas otorgadas para poder realizar esta investigación (Número de becario 619259).

Al posgrado en Ciencias del Agua del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

A la Red Mexicana de Virología por los apoyos económicos obtenidos, sin ellos parte importante de esta investigación no hubiera sido posible.

Al laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Ciencias del Agua ya que representa un pilar importante en esta investigación, al laboratorio de biología molecular del Water and Energy Sustainable Technology Center (WEST) de la Universidad de Arizona (The University of Arizona) por el apoyo obtenido durante las estancias de investigación.

A los miembros de mi comité:

Dra. Cecilia Hernández Zepeda, por su paciencia y enseñanzas para hacer de este proyecto algo posible.

Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, por todo el apoyo y consejos recibidos a lo largo de esta investigación.

Dr. Oscar Moreno Valenzuela, por sus consejos y enseñanzas.

Dra. Rosa María Leal, por el apoyo y orientación recibido en la finalización de este proyecto.

Dr. Gilberto Acosta, por sus consejos y orientación en la finalización de este proyecto.

A la M.C Gabriela Rosiles González, técnico de la Unidad de Ciencias del Agua, por todos esos consejos, enseñanzas, orientación, apoyo y paciencia que me brindó a lo largo de este proceso, porque en momentos difíciles fue como una segunda madre para mí.

A los Doctores Charles Gerba y Walter Betancourt de la Universidad de Arizona (The University of Arizona) por acogerme en mis estancias de investigación, también por ampliar mi visión en el panorama científico, sin ellos esta experiencia no hubiera sido tan gratificante.

A los alumnos Tina, Aidan, Yvonne y Daisy, por siempre considerarme, apoyarme y ayudarme en todo a lo largo de la estancia de investigación.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Víctor Hugo Carrillo Jovel y Carlos Eduardo Muñoz Cortes, por acompañarme en las salidas de campo, y por sus consejos para mejorar siempre este proyecto.

A “los chidos del CICY”, sin ustedes esta experiencia hubiera sido solo una más, llenaron de alegría este proceso y pusieron color donde todo era gris, muchas gracias por todos esos momentos.

A mi madre María Esther Alcalde Liaño, por ser el pilar más importante de mi vida, sin todo su apoyo nada de esto sería posible.

Dedicatoria

A mi madre, María Esther Alcalde Liaño, por ser el motor de mi vida y la persona más importante de todos mis caminos recorridos.

Índice

Declaración de Propiedad.....	II
Reconocimiento	III
Agradecimientos	IV
Dedicatoria.....	VI
Listado de abreviaturas.....	XIII
Resumen.....	XIV
Abstract.....	XV
Research Hightlights.....	XVI
1. Introducción	17
2. Antecedentes	18
2.1 Sistemas Kársticos.....	18
2.2 Sistemas Acuíferos kársticos	19
2.3 Sistema Kárstico de la Península de Yucatán	21
2.4 Formación de Caletas	23
2.5 Descargas de agua subterránea.....	23
2.6 Enfermedades gastroentéricas transmitidas por el Agua.....	24
2.7 Indicadores de Calidad del Agua	25
2.8 Indicadores Virales: Colífagos.....	26
2.9 Indicadores Virales: <i>Pepper mild mottle virus</i> (pmmov)	27
2.10 Virus Entéricos.....	28
2.11 Concentraciones de Virus Entéricos en el ambiente acuático	30
2.12 Adenovirus Humanos (hadv).....	30
2.13 hadv's en cuerpos de agua reportados en México	32
3. Justificación	32
4 Hipótesis	33
5. Objetivos	33
5.1 Objetivo General	33

5.2 Objetivos Particulares	33
6. Materiales y Métodos	34
6.1 Estrategia Experimental	34
6.2 Área de Estudio.....	35
6.3 Colecta de muestras de agua	36
6.4 Parámetros fisicoquímicos	38
6.5 Detección y cuantificación de Colífagos.....	38
6.6 Ultrafiltración	40
6.7 Precipitación y concentración de las muestras	41
6.8 Extracción de DNA.....	41
6.9 Extracción de RNA.....	42
6.10 Detección de hadv's por PCR punto final	43
6.11 Ligación de los fragmentos	45
6.12 Preparación de células competentes	46
6.13 Transformación de células competentes.....	47
6.14 Lisis alcalina.....	48
6.15 Digestión Enzimática.....	49
6.16 Secuenciación.....	49
6.17 Análisis de las Secuencias.....	50
6.18 Cuantificación de hadv's por q-PCR (PCR tiempo Real)	50
6.19 Síntesis de c-DNA.....	51
6.20 Cuantificación de pmmov por q-PCR (tiempo real)	52
6.21 Cultivo de hadv	53
6.22 Inoculación de las muestras de agua en la línea celular A549 (ATCC)	54
6.23 Cuantificación de Adenovirus Humanos (hadvs) en Cultivo Celular	55
6.24 Cuantificación de Enterovirus, Reovirus I y Reovirus II en tejido Celular ...	55
6.25 Cuantificación de Norovirus GI, GI y Reovirus III en las muestras concentradas de la Caleta de Yal-kú	58
7. Resultados	60
7.1 Colecta de las muestras.....	60
7.2 Parámetros Fisicoquímicos	61
7.3 Cuantificación de Colífagos Somáticos y F+ específicos	63

7.4 Cuantificación del <i>Pepper mild mottle virus</i> (pmmov)	65
7.5 Cuantificación de Adenovirus.....	67
7.6 Comparación entre las concentraciones virales presentes en la Caleta de Yal-kú.....	69
7.7 Identificación de serotipos de Adenovirus.....	70
7.8 Cuantificación de Virus Entéricos en Cultivo Celular A549	75
8. Discusión	75
9. Conclusiones	79
10. Bibliografía	80
Anexos.....	89
Anexo 1 – Reactivos utilizados para la preparación de Soluciones	89
Anexo 2 – Secuencias analizadas para la identificación de serotipos de hadv en las Caleta de Yal-kú.....	91

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa que muestra resaltado color gris oscuro la ubicación de las regiones Kársticas alrededor del mundo. (imagen extraída de http://www.circleofblue.org/ .)	20
Figura 2. Mapa que ilustra la ubicación de la Península de Yucatán y los tres estados que la conforman, Yucatán, Campeche y Quintana Roo. En el mapa se muestra el tamaño de la superficie de cada estado que conforma la Península y de la superficie total (Tomado de CONAGUA, 2015).	22
Figura 3. Diagrama de la Estrategia Experimental	35
Figura 4. Mapa mostrando la ubicación de Caleta de Yal-kú (modificado de Hernández-Terrones et al., 2015).	36
Figura 5. Imágenes de la Caleta de Yal-kú y de los sitios de muestreo. Los puntos 1 y 2 corresponden al sitio de muestreo (imagen extraída de Google Earth).	37
Figura 6. Concentración de colifagos somáticos expresada en UFP/100ml durante los meses de muestreo. Los números en las barras corresponden densidad reportada en cada sitio y mes.	64
Figura 7. Concentración de colifagos F+específicos expresada en UFP/100ml durante los meses de muestreo. Donde los números en las barras corresponden a las CG/L reportadas en cada sitio y mes.	65
Figura 8. Concentraciones virales de PMMoV y HadV's expresadas en copias de genoma por litro (CG/L) en cada sitio de muestreo. Donde NC= Muestra detectada no cuantificable, NA= Muestra no amplificada, S1 = Sitio de colecta 1 y S2= Sitio de Colecta 2.	69
Figura 9. Porcentaje de Serotipos de HAdV's encontrados en la Caleta de Yal-kú, Quintana Roo.	72
Figura 10 A: Número de clonas por serotipo de HAdV's F-40 y F-41 por sitio y mes, donde S1 corresponde al sitio 1 y S2 corresponde al sitio 2.	73
Figura 11 Árbol filogenético realizado en el software MEGA, clados agrupados por el análisis de Máxima Verosimilitud con un valor de 1000 de Bootstrap.	74

Índice de Tablas

Tabla 1. Coordenadas de los sitios de muestreo	37
Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 300 bp del gen Hexon (Allard et al., 2001).....	43
Tabla 3. Volumen de los reactivos utilizados para cada reacción para el primer PCR, obteniendo un volumen final de 50 µl y una banda esperado de 300 pb.	44
Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar el fragmento de 171 pares de bases del gen Hexon (Reportados por Allard et al., 2001).	44
Tabla 5. Concentraciones de los reactivos utilizados para cada reacción para el PCR anidado, obteniendo un volumen final de 50 µl y una banda esperado de 170 pb.	45
Tabla 6. Concentraciones de los reactivos utilizados para cada reacción de ligación, obteniendo un volumen final de 10 µl.....	46
Tabla 7. Volumen de los reactivos utilizados para la digestión de los plásmidos recombinantes con <i>EcoRI</i>	49
Tabla 8. Volumen de los reactivos utilizados para la secuenciación de las muestras, obteniendo un volumen final de 10 µl.	50
Tabla 9. Secuencia de los cebadores utilizados para la cuantificación de HAdV (reportados por Heim <i>et al.</i> , 2003).....	51
Tabla 10. Volumen de los reactivos utilizados para la obtención de c-DNA, obteniendo un volumen final de 20 µl.....	52
Tabla 11. Secuencia de los cebadores utilizados para la cuantificación de PMMoV (Zhang <i>et al.</i> , 2006):	52
Tabla 12. Listado de muestras correspondientes a las muestras colectadas en la Laguna de Yal-kú, Quintana Roo en el período 2017-2018.	53
Tabla 13. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de HAdV	55
Tabla 14. Concentraciones de los reactivos utilizados para cada reacción con el método de High-Capacity, agregando 10 µl de RNA a cada reacción, obteniendo un volumen final de 20 µl.	56
Tabla 15. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de Enterovirus .	56

Tabla 16. Concentraciones de los reactivos utilizados para el Primer Mix con el método de SuperScript IV, agregando 11 µl de RNA a cada reacción. Obteniendo un volumen final de 13 µl.	57
Tabla 17. Concentraciones de los reactivos utilizados para el Segundo Mix con el método de SuperScript IV, obteniendo un volumen de 7 µl para cada reacción. ...	57
Tabla 18. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de Reovirus I ...	58
Tabla 19. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de Reovirus II ..	58
Tabla 20. Concentraciones de los reactivos utilizados para cada reacción de los grupos Norovirus GI, GII y Reovirus III con el método de High-Capacity, agregando 10 µl de RNA a cada reacción, obteniendo un volumen final de 20 µl.	59
Tabla 21. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de norovirus GI	59
Tabla 22. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de norovirus GII.	60
Tabla 23. Listado de muestras colectadas en la Laguna de Yal-kú, Quintana Roo en el período 2017-2018.	61
Tabla 24. Promedio de los parámetros fisicoquímicos determinados mensualmente en los dos sitios de muestreo desde agosto del 2017 al junio del 2018.	62
Tabla 25. Concentraciones promedio del virus PMMoV por sitio durante los 10 meses de muestreo correspondientes a las temporadas de lluvias, secas y nortes.	66
Tabla 26. Concentraciones promedio del virus HAdV por sitio durante los 10 meses de muestreo correspondientes a las temporadas de lluvias, secas y nortes.	68
Tabla 27. Detección de HAdVs por PCR.	71
Tabla 28. Grupo viral, métodos de obtención de c-DNA de las muestras obtenidas por el cultivo celular A549	75

Listado de abreviaturas

Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Ácido Ribonucleico	ARN
Adenovirus Humanos	HAdV's
Colífagos con Factor Sexual (Male)	CF+
Colífagos Somáticos	CS
Comisión Nacional del Agua	CONAGUA
Instituto Nacional de Estadística y Geografía	INEGI
Norma Mexicana	NMX
Norma Oficial Mexicana	NOM
Número Más Probable	NMP
Organización de Las Naciones Unidas	ONU
Organización Mundial de la Salud	OMS
Península de Yucatán	PY
Reacción en Cadena de la Polimerasa	PCR
Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa Tiempo Real	q-PCR
Ultravioleta	UV
Unidad Formadora de Placa	UFP
United Nations Children's Fund	UNICEF
United States Environmental Protection Agency	USEPA
World Health Organization	WHO

Resumen

En los acuíferos costeros las Descargas de Agua Subterránea (DAS) pueden transportar contaminantes y virus entéricos desde las zonas continentales a las zonas costeras. En la península de Yucatán, se ha reportado la presencia de virus entéricos como los Adenovirus humanos (HAdV's) en agua subterránea y en DAS, los cuales podrían representar un riesgo potencial para la salud de los usuarios especialmente en sitios recreativos. El presente estudio tiene como objetivo detectar y cuantificar la presencia de indicadores virales como el virus *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), colífagos somáticos (CS), colífagos F+ específicos (CF) y HAdV's presentes en la Caleta de Yal-kú. Se tomaron en total 20 muestras de agua (50 L) correspondientes a 2 sitios ubicados en la Caleta de Yal-kú, Quintana Roo durante el periodo de agosto del 2017 a junio del 2018. La colecta mensual de muestras se realizó en una DAS (sitio 1) y en un sitio ubicado a 18 m de la DAS (sitio 2). Los parámetros físico-químicos fueron medidos *in situ* y se realizó la cuantificación de CS y CF por el método de doble capa. Las muestras de agua fueron ultrafiltradas utilizando filtración tangencial. A partir del concentrado se extrajo el DNA y el RNA total y se obtuvo el cDNA. La cuantificación del PMMoV y de HAdV se realizó por PCR cuantitativo (qPCR), utilizando cDNA y DNA total como templado, respectivamente. La identificación de los serotipos de HAdV se realizó mediante la comparación de secuencias obtenidas a partir de la amplificación por PCR anidado de un fragmento de 171 pares de bases (pb) del gen Hexón. Los parámetros físico-químicos (temperatura, conductividad y pH) fueron homogéneos en el sitio 1 y 2, con excepción de la salinidad la cual en promedio fue mayor en el sitio 2. Se detectaron CS y CF en el 100% de los sitios en un rango de 10 a 440 unidades formadoras de placa por cien mililitros (UFP/100 ml) y de 20 a 220 UFP/100 ml, respectivamente. Las concentraciones más altas de CS y CF fueron detectadas durante el mes de marzo en el sitio 1. Los resultados de la cuantificación por qPCR demostraron la presencia del PMMoV y de HAdV's en el 80% y en el 70% de las muestras en concentraciones desde 1.54×10^1 hasta 1.14×10^2 copias de genoma por litro (CG/L) y de 1.60×10^2 hasta 1.57×10^3 CG/L, respectivamente. El sitio 2 presentó las concentraciones más altas del PMMoV durante el mes de marzo y de

HAdV durante el mes de agosto. La identificación de los serotipos de HAdV se realizó a partir de 65 secuencias obtenidas, de las cuales 38 compartieron porcentajes de identidad de entre 96% al 100% con HAdV F serotipo 40 y 27 compartieron porcentajes de identidad entre el 96% al 100% con HAdV F serotipo 41. La presencia de ambos serotipos se detectó en el 10% de las muestras colectadas. El presente trabajo es el primero en realizar un muestreo mensual durante 10 meses, para determinar la concentración de indicadores virales y HAdV presentes en la Caleta de Yal-kú. Los resultados sugieren el siguiente modelo: Las DAS pueden transportar indicadores virales de contaminación fecal y HAdV en concentraciones variables durante la temporada de secas, lluvias y nortes, hacia la Caleta de Yal-kú.

Abstract

Submarine Groundwater Discharges (SGD) allow the transport contaminants and viruses from the continental to coastal areas. In the Yucatan Peninsula, the presence of enteric viruses such as human adenoviruses (HAdV's) in groundwater and in SGD have been reported, which could represent a potential health risk to users, especially in recreational sites. The objective of this study was to detect and quantify viral indicators such as *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), somatic coliphages (SC), F+specific coliphages (FC) and HAdV's present in the Yal-kú Caleta. A total of 20 water samples (50 L) were collected from 2 sites located in the Caleta de Yal-kú, Quintana Roo during the period from August 2017 to June 2018. The monthly collection of samples was carried out in a SGD (site 1) and in a site located 18 m from the SGD (site 2). The physico-chemical parameters were measured in situ and coliphages were densited were obtained using the double layer agar method. The water samples were ultrafiltered using tangential flow filtration. Nucleic acids (DNA and RNA) were extracted from the water concentrates and the cDNA was obtained. The quantification of PMMoV and HAdV was performed by quantitative PCR (qPCR); using cDNA and total DNA as templated, respectively. Adenovirus serotype identification was conducted by sequences comparisons obtained from cloned the nested PCR amplificon of 171 base pairs (bp) of the Hexon gene. The physico-

chemical parameters were homogeneous at site 1 and 2, with the exception of salinity, which was on average greater at site 2. Coliphages (SC and FC) were detected at 100% of the sites in concentrations ranging from 10 to 440 plaque forming units per 100 milliliters (PFU/100ml) and from 20 to 220 PFU/100 ml, respectively. The highest concentrations of CS and CF were detected during March in site 1. The results of the quantification by qPCR showed the presence of PMMoV and HAdV's in 80% and in 70% of the samples in concentrations from 1.54×10^1 up to 1.14×10^2 genome copies per liter (GC/L) and from 1.60×10^2 up to 1.57×10^3 GC/L, respectively. The highest concentrations of PMMoV were detected during March, also the highest concentrations of HAdV during August. The identification of HAdV's serotypes was made from 65 sequences obtained, from which 38 shared identity percentages between 96% to 100% with HAdV F serotype 40, and 27 shared identity percentages between 96% to 100% with HAdV F serotype 41. The presence of both serotypes was detected in 10% of the samples collected. The present work is the first to perform a monthly sampling to determine the concentration of viral indicators and HAdV present in the Caleta de Yal-kú. The results suggest the following model: The DAS can transport viral indicators of fecal contamination and HAdV in variable concentrations during the dry, rainy and northern season, towards the Yal-kú Caleta.

Research Highlights

- Los indicadores virales CS y CF se detectaron en el 100% de las muestras, mientras que el PMMoV se detectó en el 80%.
- La ocurrencia de HAdV's se detectó en el 70% de las muestras en concentraciones entre 160 a 1570 CG/L.
- El serotipo de HAdV predominante en la Caleta de Yal-kú es el 41.

1. Introducción

El desarrollo humano y el proceso de industrialización han generado una mayor demanda de los recursos hídricos a lo largo del mundo, sin embargo, estas actividades generan y liberan una gran cantidad de residuos al ambiente, ocasionando contaminación en el agua en todo su ciclo (Walker *et al.*, 2019). Los cuerpos de agua superficiales son los más afectados por esta situación en relación con los cuerpos de agua subterránea, pero es necesario mencionar que los cuerpos de agua subterránea poseen una menor capacidad de resiliencia, lo cual los convierte en cuerpos de agua con una alta vulnerabilidad a la contaminación (Valencia-Quintana *et al.*, 2007; Machiwal *et al.*, 2018; Perez-Lucas *et al.*, 2018).

Los sistemas kársticos cuyo reservorio corresponde a aguas subterráneas, suministran el 25% del agua a la población mundial, en dichos acuíferos se ha reportado la presencia de distintos tipos de contaminantes como desechos industriales o contaminantes biológicos (Hartmann *et al.* 2014; CONAGUA 2015). Los sistemas kársticos son altamente vulnerables por sus características de porosidad y permeabilidad, algunos de los contaminantes más comunes detectados son los metales pesados, el exceso de nutrientes derivados del uso de fertilizantes, detergentes, así como diversos microorganismos de origen fecal (Futch *et al.*, 2010; Zhang, Han *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019).

El sistema Geológico de la Península de Yucatán (PY) está conformado por un sistema acuífero kárstico, el cual debido a sus características particulares como su permeabilidad y sus flujos de agua subterránea, es altamente vulnerable a la contaminación de origen antropogénico. En este sistema, como en muchos otros, existen descargas de agua subterránea (DAS) hacia las zonas costeras provenientes del continente (Futch *et al.*, 2010; Null *et al.*, 2014). Varios estudios han demostrado que debido a dichos flujos hidrogeológicos se expresan como DAS y pueden transportar contaminantes (Null *et al.*, 2014; Moosdorf, *et al.* 2014), nutrientes (Hernández-Terrones *et al.*, 2015) e incluso microorganismos de origen fecal y virus (Futch *et al.*, 2010; Hernández-Terrones *et al.*, 2011). En la PY las DAS

desembocan en las zonas costeras las cuales transportan compuestos orgánicos o inorgánicos desde la zona continental, acarreando así contaminantes como fertilizantes (Hernández-Terrones *et al.*, 2011), contaminantes de origen fecal (Leal-Bautista *et al.*, 2013) e incluso virus entéricos (Muñoz-Cortes, 2018).

Aún no existen estudios en donde se analice de manera integral la inocuidad del agua en las zonas costeras, tomando en cuenta no solo a los indicadores bacterianos utilizados comúnmente para determinar la calidad del agua, sino también indicadores de contaminación fecal y virus entéricos como Adenovirus humanos. En PY, se ha reportado la presencia de virus entéricos como los Adenovirus humanos (HAdV's) en cenotes (Rosiles-González *et al.*, 2019 en revisión) y zonas costeras (Muñoz-Cortes, 2018) durante las temporadas de secas y lluvias. Sin embargo, a la fecha aún no se ha realizado un monitoreo mensual para determinar la ocurrencia y concentración de estos patógenos presentes en diferentes cuerpos de agua en la región.

En el presente trabajo se realizó la detección y cuantificación de indicadores virales como colifagos somáticos (CS), colifagos F+específicos (CF), PMMoV y de virus entéricos como los HAdV presentes en la Caleta de Yal-kú, la cual es ampliamente utilizada para realizar actividades recreativas durante todo el año. El estudio permitió demostrar la presencia de estos virus en dos sitios seleccionados en la caleta e identificar los serotipos presentes. Los resultados indican una presencia constante de HAdV durante las diferentes temporalidades de la región, así como la de otros indicadores virales, especialmente en cuerpos de agua costeros que reciben DAS y que son utilizados para realizar actividades de recreación en el norte de Quintana Roo.

2. Antecedentes

2.1 Sistemas Kársticos

El término "karst" tiene su origen en la región "Krs" o "Kars" en Eslovenia. Aunque también existen evidencias de que este proviene del término indoeuropeo kar, que significa roca. El rasgo distintivo del sistema kárstico es la presencia de rocas

sedimentarias del tipo calizas, dolomitas y evaporitas (Duarte *et al.*, 2013). El sistema Kárstico se puede definir como un paisaje que contiene cuevas y un extenso sistema de aguas subterráneas, la roca predominante en estos sistemas suelen ser caliza que es especialmente soluble en agua (Ford y Williams, 2013). Este sistema está presente a lo largo del planeta con una distribución equivalente al 20% de la superficie terrestre, en una variedad de climas y regiones del mundo (Ford, 2007). En Europa se distribuye en el 35% del continente (Goldscheider, 2014), en el territorio de Estados Unidos abarca el 20% (Duarte *et al.*, 2013), y en México constituye el 20% del territorio (Fragoso-Servon y Corona, 2014). El sistema kárstico alberga acuíferos que tienen flujos de agua subterránea y que además proveen agua a aproximadamente al 25% de la población mundial (Bakalowicz, 2014). Lo anterior, resalta la vital importancia del estudio de la calidad y contaminación del agua subterránea de los acuíferos kársticos.

2.2 Sistemas Acuíferos kársticos

En amplias regiones del planeta las rocas carbonatadas ocupan extensas superficies que albergan acuíferos kársticos (Figura 1). Algunas características de los estos acuíferos son su constitución por rocas carbonatadas, compactas y solubles, en las que como consecuencia de los procesos de disolución (karstificación), se pueden generar formas superficiales y subterráneas características, que las diferencian de otro tipo de regiones o acuíferos (Antigüedad *et al.*, 2007).

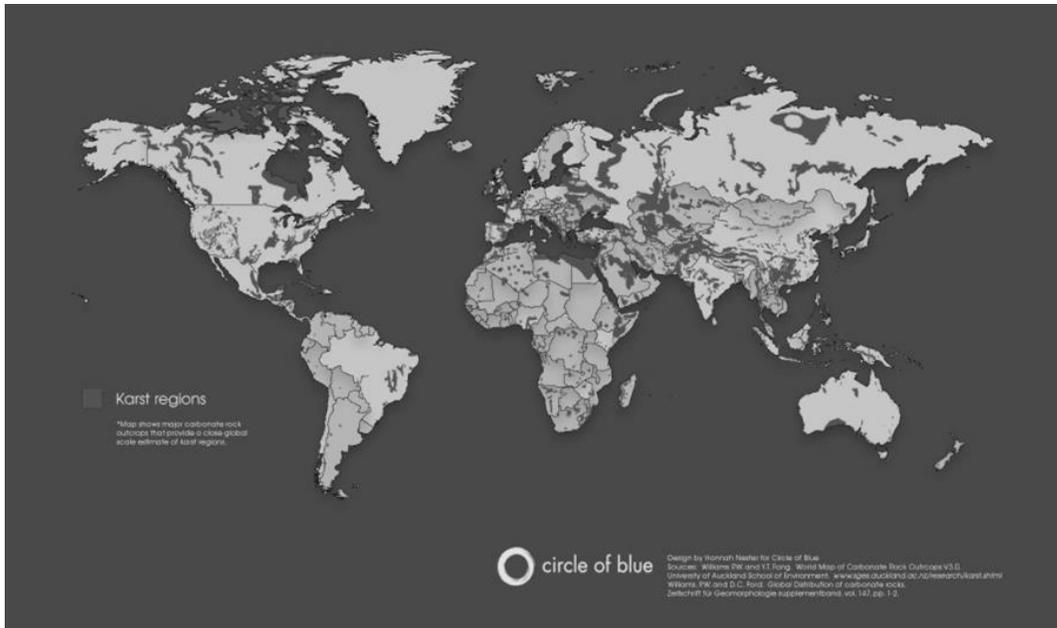


Figura 1. Mapa que muestra resaltado color gris oscuro la ubicación de las regiones Kársticas alrededor del mundo. (imagen extraída de <http://www.circleofblue.org/>.)

Entre las características particulares a considerar de los acuíferos kársticos se encuentra su porosidad efectiva, la cual oscila entre el 5 % y el 15 % y en algunos casos puede alcanzar hasta el 20 % (Gonzalez-Gomez *et al.*, 2015), lo anterior permite una rápida infiltración de la precipitación (Carruthers *et al.*, 2005). Otro factor importante es la disolución entre los minerales de las rocas del acuífero con el agua, el cual depende de factores hidráulicos y físico-químicos (Antigüedad *et al.*, 2007). Esta disolución da lugar a una red organizada de drenaje, compuesta por grutas, cavernas y conductos de disolución, los cuales permiten diferentes patrones de flujos de agua subterránea (Carruthers *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2011). En los acuíferos kársticos pueden incluso formarse notables caudales de agua, con velocidades de flujo variables muy propios de estas regiones (Null *et al.*, 2014). Con base en lo anterior, se ha propuesto que los acuíferos kársticos son muy vulnerables a la contaminación de origen antropogénico. Varios autores han descrito que gracias a la permeabilidad de las zonas kársticas, dentro de ellas pueden infiltrarse contaminantes como fármacos, herbicidas y microorganismos patógenos (Null *et al.*, 2014; Marín *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2016). En el país existen sistemas kársticos en la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre del Sur, la Sierra de Chiapas y en la PY, siendo este último uno de los sistemas más importantes. El acuífero de

la PY posee un flujo desde la zona continental hacia la zona costera siendo el acuífero la única fuente de agua potable para la PY (Fragoso-Servón *et al.*, 2014; Carruthers *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2011).

2.3 Sistema Kárstico de la Península de Yucatán

La PY se ubica en la porción sureste de la República Mexicana y está comprendida entre las coordenadas geográficas 17° 49' 00" y 21° 36' 00" de Latitud Norte y 86° 45' 00" y 91° 20' 00" de Longitud Oeste; abarca una superficie de 141,523 km² conformada por la totalidad de los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán (Figura 2). La PY está formada por rocas calizas y una de las características más notables es su alta permeabilidad la cual da lugar a flujos de agua subterránea que ocurren a tres escalas. De acuerdo con Bauer y colaboradores (2011) el flujo en la PY es complejo, pero la zona presenta cinco regiones o parteaguas importantes en el flujo del acuífero, conformado por la Sierrita de Ticul, el Anillo de Cenotes, la fractura de Holbox, la falla del Río Hondo y la falla del Arco de La Libertad. A partir de estas regiones el flujo tiende a ir de la zona central de la PY hacia la zona costera, por otro lado, a una escala local el flujo se comporta de manera similar, sin embargo existen fracturas geológicas o conductos de disolución que pueden modificar la dirección de las descargas de agua (Bauer *et al.*, 2011).

LOCALIZACIÓN DE LA PENINSULA DE YUCATÁN

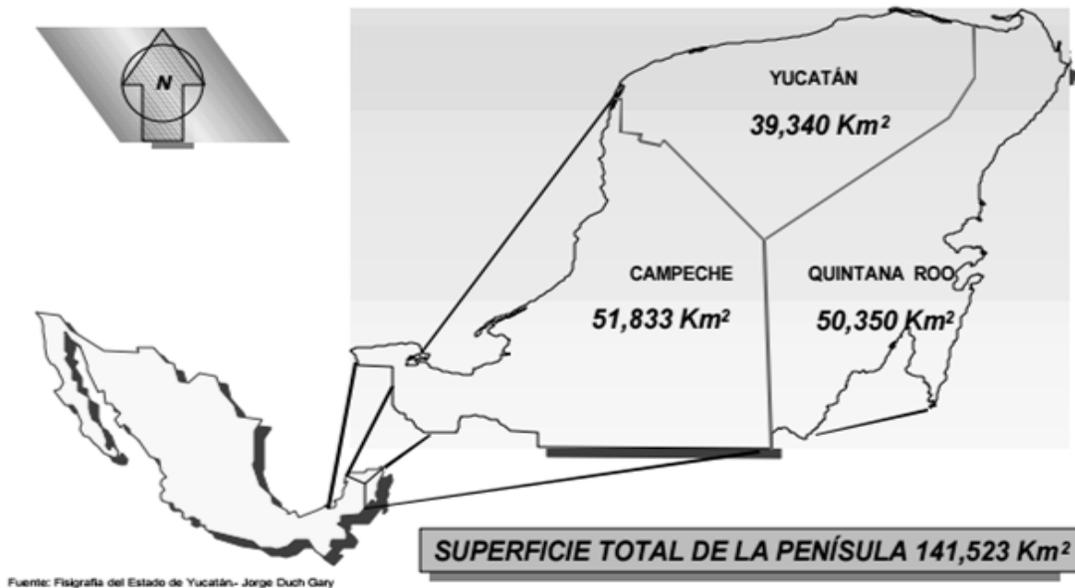


Figura 2. Mapa que ilustra la ubicación de la Península de Yucatán y los tres estados que la conforman, Yucatán, Campeche y Quintana Roo. En el mapa se muestra el tamaño de la superficie de cada estado que conforma la Península y de la superficie total (Tomado de CONAGUA, 2015).

Las características orográficas de la región propician que existan variaciones en la precipitación, lo cual se comprueba al comparar los valores promedios anuales de precipitación en las distintas estaciones climatológicas de la PY (entre 300 mm y 2000 mm). De acuerdo con la Comisión Nacional de Agua (2015) las precipitaciones máximas se presentan en la parte sureste y suroeste de la Península que comprende la zona del estado de Quintana Roo y la parte sur y suroeste del estado de Campeche, y las precipitaciones mínimas en la parte costera norte del estado Yucatán, observándose una distribución variable en la precipitación que recibe la PY (Pérez *et al.*, 2011). Los principales fenómenos meteorológicos que afectan año tras año a la PY están relacionados con la temporalidad: de junio a agosto se observa la temporada de lluvias, de noviembre a febrero la temporada de nortes y por último de marzo a mayo la temporada de secas (CONAGUA, 2015; Schmitter-Soto, 2002). La altitud de la Península es en general inferior a los 300 m, en ella existen gran cantidad de dolinas (cenotes) y lagunas, presentando formas

circulares, alargadas e irregulares (Schmitter-Soto, 2002) Estas geoformas se presentan en la parte continental, además, en la línea de costa se presentan playas angostas y rocosas, playas semicirculares, lagunas costeras y caletas (Schmitter-Soto, 2002; Carruthers *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2011).

2.4 Formación de Caletas

Los caletas son manifestaciones geológicas, típicas de las zonas costeras, las cuales varían en tamaño y profundidad. Su principal característica consiste en una barrera rocosa carente de arena la cual está en constante interacción con agua marina. Esta formación propicia un intercambio de sedimentos y agua entre la bahía y el océano (Leatherman, 1979; FitzGerald *et al.*, 2018). Se ha reportado que las caletas pueden recibir aportes de agua dulce por medio de DAS de la zona continental que desembocan en la zona costera dando como resultado una mezcla de agua salobre (Back *et al.*, 1986; Reay *et al.*, 1993). En la PY se tiene registro de caletas, en la zona costera del estado de Quintana Roo tales como la Caleta de Xel-há y la Caleta de Yal-kú (Back *et al.*, 1986; Hernández-Terrones *et al.*, 2015).

2.5 Descargas de agua subterránea

De manera subterránea el agua se mueve por la porosidad del material geológico que para un sistema kárstico puede ser una porosidad primaria (poros) secundaria (Fracturas) o por los conductos de disolución, que permite que el flujo subterráneo arrive a la costa expresado como Descarga de Agua Subterránea (DAS) o por sus siglas en inglés SGD (Submarine Groundwater Discharge) (Null *et al.*, 2014). Las DAS constituyen un factor importante que impacta en los ciclos geoquímicos marinos de los elementos, gracias a la capacidad de flujo de la zona continental hacia la zona costera (Null *et al.*, 2014). También las DAS actúan como vía de transporte de distintos compuestos y partículas que terminan desembocando en el ambiente marino (Null *et al.*, 2014; Hernández-Terrones *et al.*, 2015; Burnett *et al.*, 2006; van Tussenbroek, 2011). Por otro lado, estos flujos pueden llegar a afectar el

ciclo de nutrientes de la zona costera gracias a que pueden transportar nutrientes propiciando así el proceso de eutrofización y dando como resultado el florecimiento de diversas especies de algas (Moosdorf, *et al.* 2014). En un

estudio en el estado de Florida, Futch y colaboradores (2010) reportaron contaminación del acuífero por la entrada de aguas residuales dando como resultado el transporte de virus entéricos tales como Enterovirus y Adenovirus por medio de las DAS hacía los arrecifes. En la PY se ha reportado que las DAS pueden transportar nutrientes (Hernández-Terrones *et al.* 2015), bacterias coliformes, virus de PMMoV y virus entéricos (Muñoz-Cortes, 2018). Estos últimos a través de derrames de plantas de tratamiento o fosas sépticas en mal estado. Debido a la permeabilidad que posee el sistema kárstico de la PY este favorece una rápida infiltración al acuífero presentando así una alta vulnerabilidad a la contaminación de compuestos químicos y la propagación de patógenos causantes de enfermedades (Futch *et al.*, 2010; Leal-Bautista *et al.*, 2013; Hernández-Terrones *et al.*, 2015).

2.6 Enfermedades gastroentéricas transmitidas por el Agua

El agua es un recurso indispensable para la vida, sin embargo, las condiciones de saneamiento no son óptimas en todas las regiones del mundo, y las enfermedades transmitidas por el agua son muy comunes (Cabral, 2010; CDC, 2017). Aproximadamente 1.5 millones de niños mueren a causa de enfermedades gastroentéricas siendo la diarrea la principal causa (Fenwick, 2006). De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la salud (OMS) (WHO, 2018), la mortalidad por enfermedades asociadas al agua es de 5 millones de personas por año, de los cuales el 50% está relacionada con infecciones intestinales por microorganismos. En México se estima que los casos de gastroenteritis aguda representan la segunda causa de muerte infantil (Luna *et al.*, 2013). Algunos de los principales patógenos asociados a dichas enfermedades gastroentéricas son las bacterias del género *Vibrio spp*, *Salmonella spp*, y los virus entéricos como Norovirus, Enterovirus y Adenovirus (Fenwick, 2006; Sinclair *et al.*, 2009; Cabral, 2010). A lo largo de las últimas décadas se han implementado distintos métodos de detección para predecir

la presencia de patógenos en ambientes acuáticos, no obstante, algunos resultan ser caros y complejos, por esta razón algunos grupos de bacterias como Coliformes totales y *Escherichia coli*, así como grupos de virus como colifagos y PMMoV se han utilizado como indicadores para tratar de estimar la presencia de otros grupos de patógenos en el agua (Ferguson et al., 2012; Hamza et al., 2011; Rosario, Symonds et al., 2009; Grabow, 2001).

2.7 Indicadores de Calidad del Agua

En los ambientes acuáticos pueden ocurrir una gran variedad de patógenos como bacterias, hongos, protozoos y virus que una vez que llegan a contaminar los ambientes acuáticos pueden convertirse en agentes causales de enfermedades tales como el cólera (Fenwick, 2006), la hepatitis (Cabral, 2010), y pueden provocar la gastroenteritis (Lin y Ganesh, 2013), entre otras enfermedades. Normalmente estos microorganismos llegan al agua por las heces y otros restos orgánicos que generan las personas infectadas o enfermas (Jiang, et al., 2001; Haramoto et al., 2013). Por esto, es necesario el uso de un buen indicador de calidad de agua para predecir la presencia de patógenos en ambientes acuáticos. Las bacterias han sido el principal grupo de microorganismos utilizadas como indicadores de la calidad del agua; sin embargo, por sí solas brindan información limitada y los resultados que se obtienen podrían no reflejar la presencia de otros patógenos como los virus, cuya presencia refleja riesgo a la población que esté expuesta (Ferguson et al., 2012; Jofre, 2009). De acuerdo con Arcos-Pulido (2005), las características de un buen indicador de calidad del agua son las siguientes:

- 1) Ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos
- 2) Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales homeotermos
- 3) Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están
- 4) Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación
- 5) Debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotermos

- 6) Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas
- 7) Su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal
- 8) Debe ser fácil de aislar y cuantificar
- 9) No debe ser patógeno

2.8 Indicadores Virales: Colifagos

Pese a que las bacterias coliformes se han utilizado en varios estudios para determinar la calidad del agua, estas no siempre reflejan la posible presencia de otros grupos de patógenos como los virus entéricos (Ferguson *et al.*, 2012; Marion *et al.*, 2014). Por lo anterior se han propuesto a los colifagos como un mejor indicador de contaminación fecal en los ambientes acuáticos (Naidoo, 2013; Armon *et al.*, 2015; Jofre *et al.*, 2016). Las principales características de los colifagos es que son patógenos de bacterias, son muy abundantes en las aguas residuales y son persistentes en ambientes acuáticos. Por estas características se han utilizado en varios estudios como indicadores de contaminación fecal (Skraber *et al.*, 2004; Colford *et al.*, 2007; Jofre, 2009). Gracias a su eficacia como indicadores de calidad del agua, los colifagos se han incluido progresivamente en lineamientos sanitarios alrededor del mundo (North Carolina Administration, 2011; USEPA, 2015, 2016; Western Australian Government, 2012). Los colifagos se dividen en dos grupos los colifagos somáticos y los colifagos F+específicos. Los primeros se caracterizan por infectar a las bacterias coliformes hospederas a través de la pared celular, mientras que los F+específicos infectan a las bacterias coliformes a través del pili (Jofre *et al.*, 2016; Skraber *et al.*, 2004). Los colifagos somáticos han sido utilizados como indicadores de la presencia de virus entéricos en el ambiente acuático, gracias a que comparten algunas características con dichos virus, como su composición, morfología y replicación, lo cual los hace comportarse de manera similar en cuanto a su persistencia ambiental, la variación estacional y el grado de resistencia a tratamientos del agua como la cloración, por lo tanto, su presencia refleja una alta

probabilidad de que también estén presentes virus entéricos (Solano *et al.*, 2012). Sin embargo, los colífagos F+específicos necesitan una temperatura superior a los 30°C para poder replicarse, debido a que utilizan el tracto digestivo de animales de sangre caliente, por ende, su presencia se asocia directamente a contaminación de origen fecal (Gerba, 2006). Sus estructuras son de diversas formas, algunos presentan una cabeza icosaédrica y una cola tubular, otros carecen de cola y otros tienen apariencia de bastón (Jofre *et al.*, 2016). Ambos grupos resultan ser de utilidad para predecir la presencia de virus entéricos, pero a pesar de su eficacia como indicadores de contaminación, en México aún no se han incluido en las normativas para la calidad del agua, aunque cabe mencionar que ya se han utilizado en varios estudios, por ejemplo, en la zona centro del país particularmente en ríos (Magdalena, Cuizimala y Xochimilco) para determinar contaminación por aguas residuales (Arredondo-Hernández *et al.*, 2017). Particularmente en la PY se han reportado en cuerpos de agua dulce, agua salobre y DAS, así como la presencia de otros indicadores virales (Avila, 2017; Rosiles-González *et al.*, 2017; Muñoz-Cortes, 2018).

2.9 Indicadores Virales: *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)

El virus del *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) posee un genoma de RNA de cadena sencilla con sentido positivo con aproximadamente 6.4 kb, no posee una envoltura y tiene forma de bastón, es un patógeno exclusivo de plantas, particularmente del chile y otras solanáceas, entre otros (Peng *et al.*, 2015, Kitajima, *et al.*, 2018). Cuando los frutos son ingeridos por los humanos, estos virus son excretados en las heces fecales, liberando viriones viables que pueden acabar en los sistemas de drenaje o en cuerpos de agua (Rosario *et al.*, 2009; Hamza *et al.*, 2011; Haramoto *et al.*, 2013). Gracias a que el virus del PMMoV no causa infecciones en el ser humano, se ha propuesto como un potencial indicador de contaminación fecal en el ambiente acuático (Rosario *et al.*, 2009; Jofre *et al.*, 2016). En un estudio de Zhang y colaboradores (2006) utilizando la técnica de metagenómica comparó la abundancia del PMMoV en dos individuos sanos de dos continentes distintos,

encontrando concentraciones superiores a 10^9 viriones por gramos de heces, lo que sugiere la prevalencia de dicho virus en las heces fecales humanas. Gracias a su persistencia en el ambiente este virus se ha utilizado como un potencial indicador de otros virus entéricos (Rosario *et al.*, 2009). El PMMoV se ha detectado frecuentemente en muestras de agua residual y en diferentes ambientes acuáticos como agua marina, agua potable y ríos (Rosario *et al.*, 2009; Hamza *et al.*, 2011; Haramoto *et al.*, 2013; Kitajima *et al.*, 2018). Las concentraciones reportadas del PMMoV varían de acuerdo al tipo de agua, por ejemplo, en el agua residual oscilan en 1×10^{10} CG/L (Symonds, *et al.*, 2019), en el agua tratada las concentraciones oscilan entre 1.10×10^7 a 7.0×10^9 CG/L (Rosario *et al.*, 2009) y las concentraciones en las DAS van desde 1.7×10^1 a 1.0×10^4 CG/L (Muñoz-Cortes, 2018). En México se ha reportado su presencia en el estado de Quintana Roo dentro de cenotes y descargas de agua subterránea (Rosiles-González *et al.*, 2017; Muñoz-Cortes, 2018).

2.10 Virus Entéricos

Los virus entéricos son una clase de patógenos que se transmiten por la vía fecal-oral (Griffin, 2003), principalmente a través de alimentos y agua contaminada con heces. La mayoría de los virus entéricos causan enfermedades gastrointestinales en sus huéspedes con síntomas que incluyen vómito, dolor abdominal y diarrea (Yuan y Saif, 2002, Zhang *et al.*, 2006; Reyes-Gómez *et al.*, 2018). Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades diarreicas son la segunda causa de mortalidad en niños menores de cinco años, aunque también afectan a jóvenes y adultos. Los virus entéricos son reconocidos como la causa más frecuente de diarrea especialmente en niños (Reyes-Gómez *et al.*, 2018). Las personas infectadas excretan concentraciones de hasta 10^{13} partículas virales por ml de deposición (Bosch y Pintó, 2010). Los virus entéricos pueden llegar a los ecosistemas acuáticos a través de fallas en el drenaje o en los sistemas sépticos, fecalismo al aire libre, la descarga de aguas residuales tratadas o la descarga de aguas residuales, que provienen directamente de los hogares que no se encuentran

conectados al drenaje y pueden convertirse en un riesgo a la salud humana (Estes *et al.*, 2006; Ganesh y Lin, 2013; OMS, 2017;).

Los virus entéricos pueden sobrevivir en el ambiente acuático durante largos períodos y toleran condiciones ambientales cambiantes de pH y temperatura. En el ambiente acuático pueden sobrevivir en un amplio rango de pH (3 a 10) y por tiempo extendido a bajas temperaturas menores a 14°C (Kocwa-Haluch, 2001; Skraber *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2009). Se ha reportado que ciertos grupos de virus entéricos pueden sobrevivir y permanecer de forma infectiva hasta por 130 días en agua de mar, hasta 120 días en agua dulce y alcantarillado, y hasta 100 días en el suelo de 20 a 30 °C (USEPA, 1992, Jiang *et al.*, 2001). Estos períodos de supervivencia superan los reportados para coliformes fecales y otras bacterias indicadoras en ambientes similares (Rezaeinejad *et al.*, 2014). Con base en las características de persistencia en los ambientes acuáticos, algunos grupos de virus se han propuesto como potenciales indicadores de contaminación fecal y para determinar la calidad de agua (Lin y Ganesh, 2013).

Debido a la presencia de virus entéricos en cuerpos de agua tanto dulces, salobres y agua salada, se han asociado con fuentes de contaminación fecal humana (Aslan *et al.*, 2011) y reflejan un posible riesgo de infección al consumir el agua contaminada o al tener contacto con ésta mediante actividades recreativas debido a su ingestión. Por ello, los virus entéricos asociados a la contaminación antropogénica pueden llegar a cuerpos de agua por medio de descargas de agua residual, sistemas sépticos en mal estado, escorrentía e incluso por medio de descargas de agua subterránea (Futch *et al.*, 2010; Fong y Lipp, 2014). Se ha reportado que existen más de 140 virus entéricos que pueden ser transmitidos por el humano cuando son excretados por las heces fecales (Arcos Pulido *et al.*, 2017). Algunos de los grupos de virus entéricos más estudiados en cuerpos de agua son: Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus, Hepatovirus, Norovirus, Sapovirus, Rotavirus, Poliovirus. Su presencia en el agua refleja una fuente de contaminación de origen humano (Sinclair *et al.*, 2009; Lipp *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2016). Las concentraciones de virus entéricos en el agua son variables y dependen tanto de

las características del virus como las del medio en el que se encuentren (Polaczyk *et al.*, 2008).

2.11 Concentraciones de Virus Entéricos en el ambiente acuático

Las concentraciones de virus entéricos en el ambiente dependen tanto de las características ambientales como las características de los virus, sin embargo, en ocasiones los ambientes acuáticos reciben descargas de agua tratada o agua negra provocando así su contaminación (Espinosa-García y Arias-Ortíz, 2004; Cabral, 2010; Bosch, 2014). En los cuerpos de agua superficiales como ríos se han reportado concentraciones de virus entéricos de 10^2 y 10^5 CG/L (Haramoto *et al.*, 2010), mientras que en lagos se han reportado concentraciones de 10^3 CG/L (Fong *et al.*, 2010). En un reciente estudio hecho por Haramoto *et al.*, (2018), se realizó una revisión de diferentes estudios de las concentraciones de virus entéricos en el agua, en donde se pudo observar que las concentraciones en agua salada oscilan entre 10^2 - 10^9 . También se encontraron concentraciones de virus entéricos en agua subterránea que oscilan entre 10^1 - 10^6 (Haramoto *et al.*, 2018). Otro estudio realizado por Sinclair *et al.*, (2009), determinó por medio de brotes de enfermedades gastrointestinales en aguas de uso recreativo como albercas, lagos etc. que no llevaron a cabo un buen proceso de desinfección. Este estudio se realizó principalmente en la época de verano, donde los principales grupos presentes fueron las Norovirus y los Adenovirus humanos (HAdV).

En la PY las concentraciones de virus entéricos reportadas son de 10^0 - 10^6 . Dichas concentraciones incluyen a grupos de virus como Norovirus GI y GII, Aichivirus y Adenovirus humanos (HAdV) (Muñoz-Cortes, 2018; Rosiles-Gonzalez, *et al.*, 2019)

2.12 Adenovirus Humanos (HAdV)

Los Adenovirus humanos o HAdVs pertenecen al género Mastadenovirus que incluye 68 tipos identificados, divididos en 7 especies (nombradas de la A a la G)

(Harrach, *et al.*, 2011). El descubrimiento y la división de los tipos HAdVs 52 al 68 se basan en la secuencia genómica y el análisis bio-informático, mientras que la identificación de los 51 serotipos de HAdVs previamente reportados se realizó por métodos serológicos tradicionales basados en la composición de la proteína de la cápside y la patogenicidad (Allard *et al.*, 2001). Algunos serotipos se transmiten por un medio de contagio oral-fecal principalmente en ambientes acuáticos de uso recreativo, otros son transmitidos a través de las gotas emitidas a partir del tracto respiratorio de personas infectadas, o de manera mecánica, por ejemplo, se ha descrito que el agua de las piscinas con inadecuada cloración puede transmitir adenovirus que producen infecciones oculares o enfermedades gastroentéricas (Sinclair *et al.*, 2009). También se ha reportado que los HAdV's pueden persistir en aguas residuales hasta por 60 días en un rango de temperatura de 4-15 °C, en concentraciones entre 10^5 - 10^9 (Wold y Horwitz, 2007; Fong y Lipp, 2014). Los serotipos más abundantes identificados en aguas residuales son el 40 y 41 los cuales son causantes de gastroenteritis (Jiang *et al.*, 2005; Haramoto *et al.*, 2007). De acuerdo con Symonds *et al.*, (2006) y Fong *et al.*, (2010), los HAdV suelen estar presentes durante todo el año en el agua. En el ambiente acuático se han reportado en cuerpos de agua dulce tanto en ríos como lagos (Haramoto *et al.*, 2007; Sinclair *et al.*, 2009; Rezaeinejad *et al.*, 2014). Recientemente, Haramoto y colaboradores (2018) evaluaron las concentraciones de varios grupos virales en distintos ambientes, mostrando que las concentraciones de HAdV en agua salada oscilan entre 10^4 - 10^6 , para agua subterránea sus concentraciones son entre 10^1 - 10^2 (Haramoto *et al.*, 2018). De acuerdo con Sinclair *et al.*, (2009), este grupo viral es uno de los principales grupos entéricos causantes de brotes de enfermedades en aguas de uso recreacional como piscinas y lagos. En un estudio realizado en Brasil por Staggemeier *et al.*, (2016), reportaron que el género de protistas *Acanthamoeba* puede funcionar como reservorio de HAdV en agua de piscinas, donde encontraron HAdV dentro de *Acanthamoeba* en 10/16 muestras de agua, en concentraciones de 10^5 , lo cual sugiere un peligro para la salud pública.

2.13 HAdV's en cuerpos de agua reportados en México

En México, se han realizado pocos estudios para la detección de HAdV en cuerpos de agua, en el centro del país se ha detectado su presencia en cuerpos de agua superficiales, con concentraciones que oscilan entre 9.8×10^3 a 9.3×10^6 CG/L (Mazari-Hiriart *et al.*, 2014; Arredondo-Hernández *et al.*, 2017). En otro estudio al norte de México en el estado de Baja California, se detectaron concentraciones de 3.5×10^6 y 1.4×10^6 CG/L en agua de mar (Sassoubre *et al.*, el 2012). Para la PY se ha detectado su presencia en cenotes, agua salobre y DAS (Muñoz-Cortes, 2018; Rosiles-Gonzalez, *et al.*, 2019). Con estos reportes se sugiere la necesidad de conocer y monitorear las concentraciones de virus entéricos en ambientes acuáticos, particularmente, la PY las cual posee numerosos cuerpos de agua, que son utilizados para realizar actividades recreativas por turistas y pobladores locales. Por ello este trabajo sugiere el monitoreo constante (mensual) durante temporadas para determinar las concentraciones virales que posiblemente pudieran causar un impacto en la salud humana. En la PY también se ha reportado la presencia de HAdV, las concentraciones reportadas para cenotes oscilan entre 10^1 - 10^2 (Avila, 2017), también se ha reportado su presencia en agua salobre y DAS con concentraciones entre 10^2 - 10^4 (Muñoz-Cortes, 2018). En distintos países se ha reportado la presencia HAdV en el ambiente lo cual indica que puede utilizarse como un buen indicador de contaminación fecal (Bofill-Mass *et al.*, 2013).

3. Justificación

El acuífero de la PY es la principal fuente de agua para todas las actividades humanas de la región y su conservación es de gran importancia, ya que es considerado como una gran reserva de agua dulce. Debido al ambiente kárstico de la PY, las DAS fluyen hacia la zona costera de manera rápida por medio de fracturas, las DAS pueden transportar nutrientes, herbicidas, pesticidas e incluso virus entéricos (Futch *et al.*, 2010) y otros contaminantes. El transporte de patógenos humanos hacia las zonas costeras a través de las DAS puede tener un gran impacto en la salud de las personas especialmente en sitios de uso recreativo

de la zona norte de Quintana Roo (Hernández-Terrones *et al.*, 2015, Muñoz-Cortes, 2018), donde se encuentra ubicada la Caleta de Yal-Kú en Akumal. Este sitio es ampliamente utilizado para realizar actividades recreativas durante todo el año, por lo tanto, es necesario realizar un monitoreo mensual para determinar la concentración de indicadores virales y de virus que pueden poner en riesgo la salud de los usuarios lo cual facilitaría la creación de estrategias para mantener la salud pública.

4 Hipótesis

Si las DAS transportan colífagos, PMMoV y Adenovirus desde la zona continental hacia los ecosistemas costeros, entonces se detectarán concentraciones virales de forma constante (mensual) durante la temporada de lluvias, secas y nortes.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

-Determinar la ocurrencia espacio-temporal de colífagos, del *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) y de Adenovirus humanos (HAdVs) en la Caleta de Yal-kú, Quintana Roo.

5.2 Objetivos Particulares

-Determinar la concentración de colífagos somáticos, colífagos F+específicos y PMMoV en la caleta de Yal-kú durante un muestreo mensual que incluye la temporada de lluvias, secas y nortes.

-Determinar la concentración de HAdV en la caleta de Yal-kú durante muestreos mensuales que incluyen la temporada de lluvias, secas y nortes.

-Identificar los serotipos de HAdV presentes en la Caleta de Yal-kú durante las temporadas de lluvias, secas y nortes

6. Materiales y Métodos

6.1 Estrategia Experimental

A continuación, se describe el diseño de muestreo. Se colectaron un total de 20 muestras en dos sitios durante diez meses en la Caleta de Yal-kú. En cada sitio se colectó una muestra de 50 L de agua durante el periodo de agosto del 2017 a junio del 2018, exceptuando el mes de enero. El sitio 1 corresponde a agua salobre de una DAS y el sitio 2 se ubica a 18 metros de la DAS.

Para la toma de las muestras de cada sitio se utilizaron bidones de 10 L estériles (previamente lavados con detergente libre de fosfatos y cloro). Previo a la toma de las muestras los bidones se enjuagaban 3 veces con agua correspondiente al mismo punto de muestreo, una vez concluido esto los bidones cerrados fueron sumergidos manualmente en el punto de muestreo, a una distancia aproximada de 30 cm de la superficie. Una vez llenos se cerraron bajo el agua y se repitió lo anterior hasta obtener un volumen de 50 L por réplica de muestreo.

En cada sitio se registraron los parámetros físico-químicos de temperatura, conductividad, potencial óxido-reducción, salinidad y sólidos disueltos totales, fueron tomados *in situ* utilizando una sonda multiparamétrica YSI 600QS, mientras que el pH y oxígeno se midieron con una sonda HACH HQd. Las muestras de agua fueron almacenadas a temperatura ambiente y llevadas al laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Ciencias del Agua, del centro de Investigación Científica de Yucatán.

En el laboratorio de cada muestra se determinó la concentración de colifagos somáticos y F+específicos utilizando el método de doble capa. Dichas concentraciones fueron obtenidas a partir de un volumen de 10 ml de agua colectada en cada sitio de muestreo.

En el laboratorio las muestras fueron sometidas a una ultrafiltración tangencial y a una segunda concentración utilizando PEG. A partir de los concentrados se obtuvo el DNA, RNA y c-DNA. La detección de HAdV's se llevó a cabo por medio de PCR

anidado amplificando la región del gen hexón con un tamaño de aproximadamente 170 pb. Cada fragmento obtenido fue clonado y enviado a secuenciar con el objetivo de determinar los serotipos presentes en las muestras de agua. Posteriormente se realizó la reconstrucción filogenética. Para la cuantificación de HAdV's se utilizó SYBR Green y para el PMMoV sondas Taqman. La concentración final de virus se cuantificó en copias de genoma por litro (CG/L) (Figura 3).

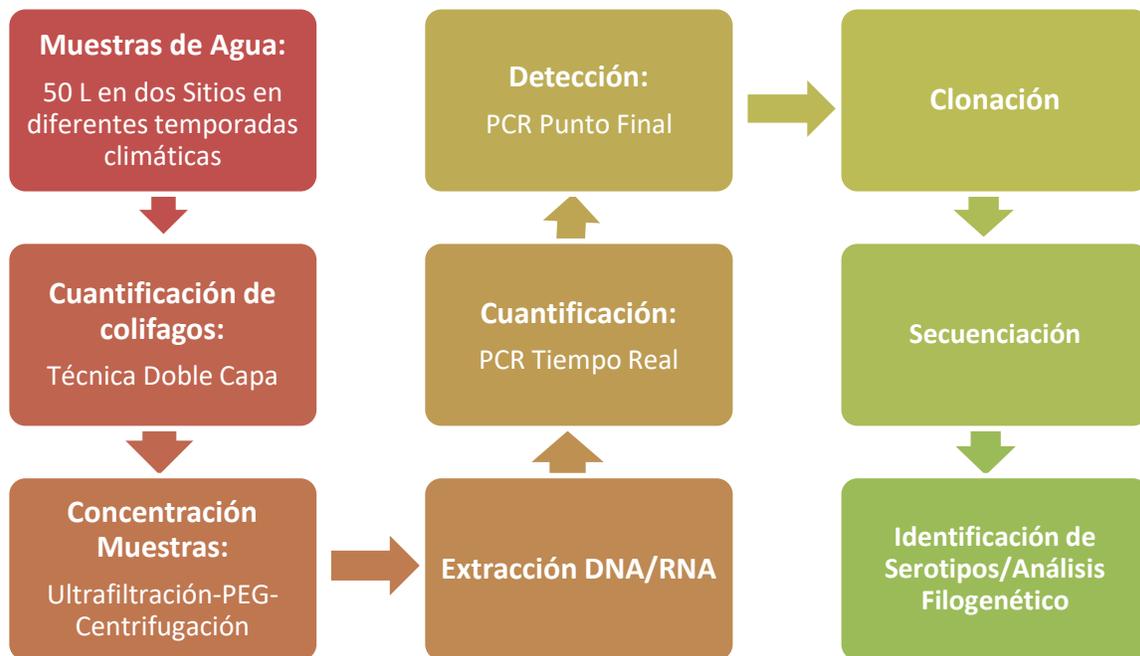


Figura 3. Diagrama de la Estrategia Experimental

6.2 Área de Estudio

La Caleta de Yal-kú se encuentra en la zona norte del Akumal, en el municipio de Tulum, Quintana Roo, a 28 km de la cabecera municipal. Dentro de sus costas se localiza una parte del Sistema Arrecifal Mesoamericano, así como la presencia de comunidades de peces y de tortugas verdes (*Chelonia mydas*). Debido a su vasta diversidad, en este sitio se desarrollan numerosas actividades turísticas durante todo el año, albergando así una gran cantidad de hoteles alrededor de la zona. La caleta de Yal-kú se encuentra en las coordenadas 20°22 N, -87.19 E es un área que presenta condiciones salobres debido a la intrusión de aguas subterráneas con el choque de agua salada proveniente de la costa (Figura 4). En estudios anteriores la

caleta de Yal-kú ha presentado contaminación fecal de origen humano (Hernández-Terrones *et al.*, 2015), siendo este cuerpo vulnerable a la contaminación.

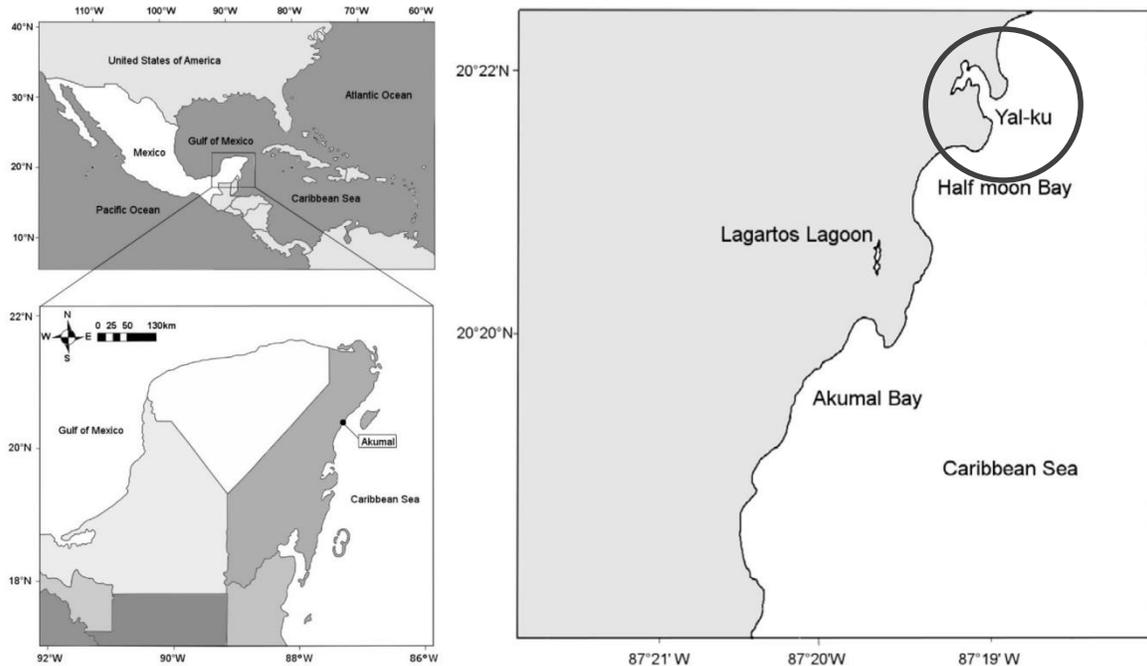


Figura 4. Mapa mostrando la ubicación de Caleta de Yal-kú (modificado de Hernández-Terrones et al., 2015).

6.3 Colecta de muestras de agua

Se realizó una colecta mensual de 50 L de agua por sitio, durante 10 meses en dos sitios de muestreo (Sitio 1 y Sitio 2) localizados en la Caleta de Yal-kú (Figura 5) y en cada sitio se tomaron las coordenadas con un GPS Garmin modelo eTREX 20 (Tabla 1). El sitio 1 corresponde a una descarga de agua subterránea (DAS) mientras que sitio 2 se encuentra a una distancia de 18 m del sitio 1 hacía el interior de la caleta.

Para la toma de las muestras se utilizaron bidones de 10 L previamente lavados con detergente libre de fosfatos y cloro los cuales fueron sumergidos cerrados en cada

punto de muestreo. Previo a la colecta de la muestra, los bidones fueron enjuagados 3 veces con el agua correspondiente a cada punto de muestreo, una vez concluido esto los bidones fueron sumergidos cerrados de manera manual, posteriormente, éstos se destaparon a una distancia aproximada de 30 cm de la superficie y fueron llenados uno por uno hasta obtener un volumen de 50 L (5 bidones de 10 L). Posteriormente las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente (promedio de 1 hora 45 min) hacía el laboratorio y fueron ultrafiltradas el mismo día siguiendo la metodología previamente reportada por Rosiles-González *et al.*, 2017.

Tabla 1. Coordenadas de los sitios de muestreo

Sitios	Latitud	Longitud	Tipo de agua *
1	20°24'38.90" N	87°18'18.54"W	Agua salobre (DAS)
2	20°24'39.24"N	87°18'18.18"W	Agua salobre

La determinación de agua salobre se hizo con base en Lewis (1980)



Figura 5. Imágenes de la Caleta de Yal-kú y de los sitios de muestreo. Los puntos 1 y 2 corresponden al sitio de muestreo (imagen extraída de Google Earth).

6.4 Parámetros fisicoquímicos

Para la toma de los parámetros fisicoquímicos se utilizaron las sondas multi-paramétricas YSI 600 QS y Hach HQd previamente calibradas con soluciones amortiguadoras estándar, tomando los siguientes parámetros *in situ*: la temperatura (°C), el pH, Total de sólidos disueltos (g/L) (TSD), la salinidad, la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y el potencial de reducción (pEh). Se realizaron tres mediciones de cada sitio de muestreo con el objetivo de obtener réplicas de los parámetros.

6.5 Detección y cuantificación de Colifagos

Para el conteo de colifagos se siguió el método de doble capa descrito por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency method 1601 USEPA, 2015). La cepa bacteriana *E. coli* hospedera ATCC 700609 CN-13 (resistente a ácido Nalidíxico) fue utilizada para determinar la densidad de colifagos somáticos. Para determinar la densidad de colifagos F+específicos se utilizó la cepa hospedera *E. coli* ATCC 15597 C-300. Es importante señalar que todas las cepas hospederas se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC) y fueron donadas por el laboratorio del Dr. Charles P. Gerba de la Universidad de Arizona.

Se utilizaron los siguientes medios para el método de doble capa:

- 1) TSA, Tripticasa de soya-agar esterilizado (40 gr en 1000 ml, TSA 22091 Sigma-Aldrich), como cultivo inferior en cajas de Petri del ensayo de doble capa
- 2) TSB-semisólido. Se preparó el cultivo de Tripticasa de soya semisólido (15 gr de TSB 22092 Sigma Aldrich con 4 g de agar-agar, en 500 ml de agua desionizada) y se agregaron 5 ml del medio en tubos de ensayo para su posterior esterilización. Se guardaron a 4 °C para utilizarlos el día del ensayo.
- 3) TSB 24hrs (8 gr de TSB 22092 Sigma-Aldrich en 100 ml de agua desionizada).
- 4) TSB 3hrs (8 gr de TSB 22092 Sigma-Aldrich en 100 ml de agua desionizada).

A cada medio de cultivo en el que se requirió sembrar las bacterias resistentes a antibióticos se le agregó 1% V/V de una solución 1% de ácido nalidíxico de sodio, filtrada en una membrana de 0.22 μm .

Las cepas bacterianas se cultivaron en el medio TSB durante 24 hrs, posteriormente, se tomó 1 ml del cultivo y se sembró en el medio enriquecido TSB durante 3 hrs, con el fin de obtener cultivos en crecimiento exponencial. Después se procedió a seguir con los siguientes pasos:

1. Se prepararon cajas Petri con aproximadamente 30 ml de medio TSA sólido, algunas de ellas con antibiótico al 1% (ácido nalidíxico y ampicilina), etiquetando adecuadamente las cajas. También se utilizaron tubos de cultivo con 5 ml de medio TSB con agar, llamados "semisólido".
2. De los 100 litros de muestra ambiental, se separaron 50 ml para utilizarlos en esta técnica.
3. Los tubos con medio semisólido (TSB + agar) fueron calentados para fundir el medio y puestos en baño maría a 48°C a fin de mantenerlo líquido.
4. Una vez líquido, se tomó un tubo y se le agregaron 2 ml de la muestra ambiental y 0.5 ml del cultivo de la bacteria hospedera (en fase logarítmica) que le correspondía. Esta mezcla fue vertida inmediatamente en la caja Petri con medio sólido TSA con o sin antibiótico según correspondía, moviendo la caja de forma circular a fin de incorporar homogéneamente el contenido del tubo.
5. Se repitieron los pasos anteriores para cada cepa bacteriana, teniendo al final 5 cajas Petri por cada cepa.
6. Del retentado, producto de la ultrafiltración, se tomaron 50 ml y se repitió el procedimiento antes descrito para contar de la misma manera con 5 cajas Petri con 2 ml de muestra por cada una de las cepas bacteriana empleadas. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Después de 18 horas, se observó la formación de las placas sobre la superficie del tapete superior y se contaron las placas formadas (en las 5 cajas Petri por cepa

hospedera). La concentración de colifagos se determinó con base en el número de unidades formadoras de placa por 100 ml (UFP/100ml).

Para calcular la concentración de Colifagos en la muestra directa, se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_a = (P \div 10) \times D$$

Donde P=Placas formadas, D= Dilución, PFU Unidad formadora de placa formada.

6.6 Ultrafiltración

La ultrafiltración de las muestras de agua se realizó siguiendo la metodología de Hill et al., 2005 y Hernández-Morga et al., 2009 con las modificaciones descritas por Rosiles-González et al., 2017. De forma breve, se utilizó un filtro de diálisis de la marca Fresenius F80A de fibra hueca del polímero polisulfona de 200 µm de diámetro y un área de 1.8 m². El tamaño del poro utilizado fue de peso molecular de 15, 000 – 20, 000 MWCOs. Todas las mangueras y las conexiones fueron esterilizadas antes de cada uso y los filtros fueron desechados una vez después de su uso. Se circuló por el sistema un litro de la solución de Polifosfato de sodio (NaPP) al 0.1% durante 15 minutos, con el puerto de salida cerrado. A las muestras de agua se les añadió una solución de NaPP 0.01% y éstas fueron agitadas manualmente para mezclar bien antes de la ultrafiltración. Se circuló la muestra de agua en el sistema durante 8-10 min con el puerto de salida cerrado. Se mantuvo la presión en el filtro entre los 6 y 10 psi. Se abrió el puerto de salida para ir reduciendo el volumen del agua de la muestra y obtener el retentado con un volumen de 0.5 L aproximadamente, se retiró el recipiente del ultrafiltrado y con el puerto de permeado cerrado, se circuló por el sistema 1 L de solución de retrolavado (100 µl al 0.01% de Tween 80, 0.01% Polifosfato de sodio NaPP; 0.1g en 1 L, 10 µl de emulsión al 0.001% de Antifoam Y-30) (Liu, 2012), durante 5 minutos. Sin apagar la bomba peristáltica, se abrió el puerto del permeado hasta reducir el volumen del

retrolavado aproximadamente a 100 ml (Hill et al., 2005), este volumen fue agregado al volumen del retentado para obtener el ultrafiltrado final de un volumen de aproximadamente 0.5 L.

6.7 Precipitación y concentración de las muestras

Una vez que las muestras fueron ultrafiltrada a los concentrados obtenidos, se les agregó una solución de PEG 8000 al 12 % peso volumen disuelto en agua ultrapura tipo I obtenida del sistema Milli-Q Advantage A-10. Se utilizó NaCl se a una concentración de 0.8 Molar. Ambos reactivos se mezclaron con el concentrado producto de la utltrafiltración de manera manual hasta homogenizarse, posteriormente los concentrados se precipitaron durante 12 horas a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo todo el concentrado se repartió en tubos falcon de 50 ml y se centrifugaron a 7,000 rpm durante 30 min, decantando así el sobrenadante obtenido dentro de cada tubo falcon para quedarse con el pellet formado en el fondo de cada tubo. Dicha pastilla se resuspendió en 5 ml de solución buffer PBS (Phosphate Buffer Saline) y se agregaron 5 ml Butanol-Cloroformo 1:1 (2.5 ml de cada uno), para realizar la mezcla los tubos fueron agitados por inversión 10 veces. Después de la mezcla se realizó una segunda centrifugación a 7,000 rpm durante 15 min y se rescató la fase acuosa superficial de cada tubo, la cual fue dividida en tubos eppendorf de 1.5 ml. El valor de los volúmenes finales de cada muestra fue medido para continuar posteriormente con el proceso de cuantificación de los virus encontrados en las muestras.

6.8 Extracción de DNA

Se utilizó el kit de extracción QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen®) para realizar la extracción total de DNA, utilizando 400 µl del concentrado obtenido y modificando la cantidad de reactivos descritos en el kit acorde al volumen de la muestra. El primer paso consistió en colocar 40 µl de Proteinasa K en un tubo eppendorf de 1.5 ml, al mismo tubo se le agregaron 400 µl de la muestra y 400 µl de buffer AL, se mezcló

por medio de vortex durante 15 seg e se incubó en baño seco a 56% por 10 minutos. Después del tiempo transcurrido se agregaron 400 µl de etanol 96-100% y se mezcló por medio de vortex durante 15 seg al finalizar la mezcla se centrifugó para evitar que restos de la mezcla quedaran adheridas a lo largo del tubo. La mezcla obtenida se trasladó a una mini columna dentro de un tubo colector y se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto, enseguida se añadieron 500 µl de buffer AW1 y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm por un minuto; se retiró el tubo colector y se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se añadieron 500 µl de buffer AW2 a la mini columna para posteriormente centrifugar a 13,000 rpm durante un minuto, una vez realizado esto se volvió a cambiar la columna a un nuevo tubo y se añadieron 30 µl de buffer AE dejando incubar la columna por 10 min a temperatura ambiente, una vez concluido el tiempo se centrifugó la columna con el tubo colector a 8,000 rpm por un minuto y se repitió el paso anterior utilizando el mismo tubo colector pero esta vez se añadieron solo 20 µl de buffer AE. Obteniendo así un volumen final de 50 µl, finalmente el tubo fue etiquetado y almacenado a -80°C.

6.9 Extracción de RNA

Se utilizó el kit de extracción QIAmp® RNA Mini Kit (Qiagen®) para realizar la extracción total de RNA, cabe mencionar que se añadieron volúmenes dobles por muestra y reactivos indicados en las instrucciones del fabricante. En un tubo falcon de 15 ml se agregaron 1,120 µl de buffer AVL, 11.2 µl de buffer AVE y 280 µl de muestra los cuales se agitaron por medio de vortex durante 15 seg para mezclar. Dicha muestra se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó brevemente para evitar que restos de la mezcla quedaran adheridas a lo largo del tubo, enseguida se añadieron 1,120 µl de etanol al 96-100 %. De esta mezcla se pasaron 630 µl a una mini columna la cual fue centrifugada con un tubo colector a 8,000 rpm durante 1 min y se repitió el paso anterior. Una vez que toda la mezcla pasó la columna se depositó en un nuevo tubo colector y se le añadieron 500 µl de buffer AW1 y se volvió a centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min pasando nuevamente la columna a un nuevo tubo colector a la cual se añadieron 500 µl de

buffer AW2 y se centrifugó a 13,000 rpm por 4 min. La columna fue depositada en un nuevo tubo colector y se añadieron 30 µl de buffer AE dejando incubar la columna por 10 min a temperatura ambiente, una vez concluido el tiempo se centrifugó la columna con el tubo colector a 8,000 rpm por un minuto y se repitió el paso anterior utilizando el mismo tubo colector pero esta vez se añadieron solo 20 µl de buffer AE. Obteniendo así un volumen final de 50 µl, finalmente el tubo fue etiquetado y almacenado a -80°C.

6.10 Detección de HAdV's por PCR punto final

Para el proceso de amplificación se realizó un primer PCR, utilizando los cebadores reportados por Allard et al. (2001) (Tabla 2). Para la primera reacción de PCR se utilizaron 5 µl como templado de las siguientes diluciones del DNA total obtenido: 1:10, 1:25, 1:50. El volumen final para cada reacción fue de 50 µl. Las concentraciones de los reactivos se describen en la Tabla 3 y para realizar la amplificación se siguió la metodología de Allard et al. (2001) las condiciones de la PCR fueron 1 ciclo: a 95°C por 10 min y 94°C por 30 segundos, 45 ciclos: 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 min, 1 ciclo: 72°C por 5 min y 1 ciclo: a 4°C, los cebadores utilizados se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 300 bp del gen Hexon (Allard et al., 2001).

Primer/probe	Nombre	Secuencia (5'-3')	Volumen µl	Con. Final
F primer	Hex Deg1	GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC	0.5	20 nM
R primer	Hex Deg2	CAGCACSCCICGRATGTCAAA	0.5	20 nM

Tabla 3. Volumen de los reactivos utilizados para cada reacción para el primer PCR, obteniendo un volumen final de 50 μ l y una banda esperada de 300 pb.

Componente	Volumen (μ l)
Buffer 1.5 mM MgCl ₂	10
dNTP's (10 mM)	1
Hexon Deg1 20 μ M	0.5
Hexon Deg2 20 μ M	0.5
Taq Polimerasa 1.25 u	0.25
Nuclease-free H ₂ O	32.75
Volumen Total por reacción	50

Posteriormente se realizó una segunda amplificación del producto obtenido para así completar el proceso de PCR anido siguiendo la metodología de Allard et al. (2001). Los cebadores utilizados amplifican un fragmento de 170 pb aproximadamente (Tabla 4). Como templado se utilizaron 2 μ l del producto de la primera reacción. El volumen final de la segunda reacción fue de 50 μ l. Las concentraciones de los reactivos se describen en la Tabla 5 y para realizar la amplificación se siguió la metodología de Allard et al. (2001), las condiciones de la PCR fueron 1 ciclo: a 94°C por 3 min y 94°C por 30 segundos, 45 ciclos: 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 min, 1 ciclo: 72°C por 5 min y 1 ciclo: a 4°C. Las reacciones de amplificación se realizaron en el equipo Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler.

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar el fragmento de 171 pares de bases del gen Hexon (Reportados por Allard et al., 2001).

Primer/probe	Nombre	Secuencia (5'-3')	Volumen μ l	Con. Final
F primer	neHexDeg3	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC	0.5	20 nM
R primer	neHexDeg4	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA	0.5	20 nM

Tabla 5. Concentraciones de los reactivos utilizados para cada reacción para el PCR anidado, obteniendo un volumen final de 50 μ l y una banda esperada de 170 pb.

Componente	Volumen (μ l)
5x GoTaq Buffer 1.5 mM MgCl ₂	10
dNTP's (10 mM)	1
neHexDeg3 20 μ M	0.5
neHexDeg4 20 μ M	0.5
Taq Polimerasa 1.25 u	0.25
Nuclease-free H ₂ O	35.75
Volumen Total por reacción	50

Los productos de amplificación del PCR anidado se observaron en un gel de agarosa al 2% (1 gr de Agarosa, 50 ml de TAE 1x y 3 μ l de Bromuro de Etidio) por medio de una electroforesis. En cada pocillo del gel se colocaron 5 μ l del producto de PCR anidado y se les añadió 1 μ l del marcador molecular Blue/Orange 6x Loading Dye. Se utilizaron 5 μ l del marcador molecular DNA Step Ladder Promega® que posee un tamaño de 50 pb. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en el equipo 3UV transilluminator de la marca UVP.

6.11 Ligación de los fragmentos

Todos los fragmentos amplificados por la PCR anido fueron ligados al vector de clonación pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega®), siguiendo la metodología del proveedor. La enzima utilizada para este proceso fue la T4 ligasa, posteriormente todas las ligaciones fueron incubadas por 12 horas a 4°C. En la Tabla 6 se muestran los volúmenes utilizados para la reacción de ligación.

Tabla 6. Concentraciones de los reactivos utilizados para cada reacción de ligación, obteniendo un volumen final de 10 μ l.

Componente	Volumen (μ l)
2x Rapid Ligation Buffer	5
pGEM-T Easy Vector 50 ng	1
Producto de PCR anidado	3
T4 DNA ligasa (3u/ μ l)	1
Volumen Total por reacción	10

6.12 Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes se utilizaron las cepas de *E. coli* T-10 de acuerdo utilizando la metodología de Sambrook *et al.* (1989), cabe mencionar que se tomaron en cuenta pequeñas modificaciones. El primer paso fue descongelar células de la cepa *E. coli* T-10 y someterlas a temperatura ambiente, una vez descongeladas, dentro de una campana de flujo laminar se añadieron 5 ml de medio LB líquido en un tubo de cultivo, agregando 100 μ l de la cepa T-10. Después las muestras se incubaron a 37°C durante 12 horas a 150 rpm en una incubadora shaker. Una vez transcurrido el tiempo se utilizó la campana de flujo laminar, se añadieron 2 ml de la incubación a un matraz con 80 ml de medio de cultivo PSI-Broth y nuevamente se incubaron a 37°C durante 2.5 horas a 150 rpm. Posteriormente el cultivo se enfrió sobre hielo por 10 minutos para dividir los 80 ml, en 2 tubos Falcón estériles 40 ml, los cuales se centrifugan a 4,000 rpm por 3 minutos con una temperatura de 4°C. Se desechó el sobrenadante y los tubos se dejaron reposando de forma invertida, para eliminar el medio de cultivo que pudiera quedar. Las células se resuspendieron en 20 ml de TFB-1 frío para cada tubo, se incubaron en hielo por 15 minutos y se mezclaron suavemente para evitar lisis celular. Una vez disueltas las pastillas se retiraron del hielo y se centrifugaron a una

velocidad de 4,000 rpm por 3 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las pastillas fueron resuspendidas con 2 ml de TFB-2 frío para cada tubo. Por último, se mezclaron con cuidado para evitar la lisis celular y se colocan en hielo, se tomaron alícuotas de 100 µl y las células fueron vertidas en tubos de 1.5 ml y se congelaron con nitrógeno líquido para después almacenar los tubos a -80°C en un ultracongelador.

6.13 Transformación de células competentes

Las células competentes fueron transformadas utilizando el método de choque de calor. Se preparó 1 L de medio LB-agar, esterilizado en autoclave por 15 minutos a 121°C. Cuando el medio alcanzó una temperatura aproximada a 65° C se agregó ampicilina (1 ml/L) y el producto fue vertido en cajas de Petri. Cuando se solidificó, las cajas se almacenaron a 4°C, y en una campana de flujo laminar se descongeló en hielo por 5 minutos un tubo con 100 µl de las células de *E. coli* competentes. Después se agregaron 10 µl del producto de la ligación y se dejaron incubando en hielo por 20 minutos. Las células se mezclaron golpeando ligeramente el tubo, pero sin dispersar las células en las paredes, luego de la incubación, la muestra se sometió a un choque térmico durante 1 min a 42°C en un baño termostático de bloque seco y posteriormente en hielo por 5 minutos. Para finalizar se agregaron 200 µl de medio LB líquido al tubo y se incubaron a 37°C por 1 hora a 200 rpm. Para permitir que el medio LB ayude crecer a las células y expresar la β-lactamasa permitiendo generar resistencia a ampicilina, y así células transformadas pudieran sobrevivir en un medio de cultivo con antibiótico. En este paso se eliminaron las células que no fueron transformadas. Después de la incubación se agregaron 30 µl de X-Gal Sigma-Aldrich® a cada caja Petri con el medio LB/ampicilina previamente elaborado y se dispersaron con un asa Drigasky, luego las cajas Petri se cubrieron con papel aluminio y se dejaron reposar por 5 minutos. Después se sembraron con un asa Drigalsky 100 µl de las células recombinantes a cada caja de LB/ampicilina, y se cubrieron con papel aluminio se dejaron secar por 5 min y se incubaron a 37°C

durante 12 horas. Posteriormente se seleccionaron las bacterias (colonias blancas) para realizar la posterior extracción de plásmido.

6.14 Lisis alcalina

Después del proceso de transformación se seleccionaron 5 colonias blancas correspondientes a cada sitio de muestreo por mes y por medio de un palillo estéril cada colonia se inoculó en 4 ml de medio LB con ampicilina (1ml/L) en un tubo de ensayo de vidrio, los cuales se mantuvieron en agitación a 200 rpm y 37°C durante 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo se tomaron 3 ml de cada tubo y se pasaron a tubos eppendorf de 1.5 ml. Los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, desechando el sobrenadante. La pastilla resultante se resuspendió en 100 µl de Solución 1 (50 ml glucosa, 25 ml Tris-Cl pH 8.0 y 10 ml EDTA pH 8.0) y se le agregaron 4 µl de RNAsa A (Invitrogen™), mezclando por medio de vortex. Una vez mezclado se añadieron 200 µl de la solución 2 (0.2 N NaOH y 1% w/v SDS) y se mezclaron por inversión 5 veces, para después incubarlas en hielo por 5 min. Después se agregó la Solución 3 (60 ml acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de H₂O) mezclando por inversión 5 veces cada tubo y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 8 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de 1.5 ml y se añadieron 900 µl de Isopropanol frío, mezclando por medio de vortex e incubando a temperatura ambiente por 3 min, luego se realizó una segunda centrifugación a 13,000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante, conservando así la pastilla. Cuando la pastilla fue obtenida se realizaron dos lavados con 100 µl de Etanol frío al 70% centrifugando a 13,000 rpm por 10 min a 4°C entre cada lavado. Por último, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de H₂O libre de nucleasas y se almacenó a -18°C.

6.15 Digestión Enzimática

Para confirmar la presencia de los insertos y su tamaño, se realizaron digestiones utilizando la enzima *EcoRI*. Cada reacción se preparó en tubo de 0.6 ml, obteniendo un volumen final de 10 µl por reacción (Tabla 7) las cuales fueron incubadas a 37°C durante 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo se observaron los insertos en un gel de agarosa al 2% (1.2 g de agarosa + 60 ml de solución TAE 1X+ 3 µl de bromuro de etidio). En cada pocillo del gel se colocaron 10 µl los fragmentos fueron observados en el equipo 3UV transilluminator de la marca UVP y las muestras que presentaron una banda de 170 pb fueron consideradas positivas.

Tabla 7. Volumen de los reactivos utilizados para la digestión de los plásmidos recombinantes con *EcoRI*.

Componente	Volumen (µl)
DNA plasmídico	3
H ₂ O libre de nucleasas	5.5
Buffer 10x	1
<i>EcoRI</i>	0.5
Volumen Total por reacción	10

6.16 Secuenciación

De los plásmidos recombinantes positivos obtenidos en los pasos anteriores, se seleccionaron 5 muestras de cada sitio de muestreo y se mandaron secuenciar a MACROGEN en Corea del Sur. Cada tubo se preparó con los siguientes reactivos (Tabla 8) y el primer utilizado para secuenciación fue M13 cuya secuencia es la siguiente 5´d[GTAAAACGACGGCCAGT]3´ y posee una concentración de 5 pM.

Tabla 8. Volumen de los reactivos utilizados para la secuenciación de las muestras, obteniendo un volumen final de 10 μ l.

Componente	Volumen (μ l)
Vector con Inserto	0.5
H ₂ O libre de nucleasas	4.5
F Primer M13 5 pM	5
Volumen Total por reacción	10

6.17 Análisis de las Secuencias

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas en el software libre FinchTV ver 1.4.0 con el objetivo de cortar la secuencia y obtener solo el fragmento del gen hexón y borrando las secuencias correspondientes al vector de clonación. Las secuencias fueron comparadas en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool o BLAST por sus iniciales en inglés. Una vez comparadas, solo se tomaron en cuenta las secuencias que tuvieran un valor de porcentaje de identidad igual o menor a 96 %. Las secuencias más parecidas con base en el análisis de BLAST fueron descargadas del GenBank. Se construyó una matriz de secuencias incluyendo las obtenidas en el presente estudio más las secuencias del GenBank, las cuales fueron alineadas utilizando el algoritmo MUSCLE implementado en el programa MEGA 6.0. La reconstrucción filogenética se realizó en el software libre MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 7.021 utilizando el método de Neighbor-Joining y un valor de bootstrap de 1000 repeticiones.

6.18 Cuantificación de HAdV's por q-PCR (PCR tiempo Real)

Para la cuantificación de HAdV's se siguió la metodología reportada por Heim et al., (2003) (Tabla 9), todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en un termociclador Bio-Rad modelo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System

utilizando el software Bio-Rad CFX Manager 3.1. En cada reacción se utilizó 1 µl de DNA y el mix SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix de Bio-Rad, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Cada reacción se preparó a un volumen de 25 µl, las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo: 98°C 3 min y 98°C 15 segundos, 50 ciclos: 55°C 30 sec y 1 ciclo para la curva de disociación (Heim *et al.*, 2003).

Tabla 9. Secuencia de los cebadores utilizados para la cuantificación de HAdV (reportados por Heim *et al.*, 2003)

Cebador	Nombre	Secuencia (5'-3')	µl	Con. Final
F primer	AQ2	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC	1	20 nM
R primer	AQ1	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	1	20 nM
		SuperMix	12.5	10x

Debido a que en la cuantificación de HAdV's se utilizó SYBR Green al final de la amplificación se realizó una curva de disociación para identificar si hubo formación de dímeros o inespecificidad de los cebadores durante la reacción.

6.19 Síntesis de c-DNA

Debido a que el virus PMMoV posee un genoma de RNA se obtuvo c-DNA para su cuantificación por el método de iScript Adv cDNA kit for RT-qPCR de Bio-Rad, utilizando las siguientes concentraciones (Tabla 10). Las condiciones de reacción para obtener c-DNA fueron 1 ciclo: 46°C por 20 min y 1 ciclo: 95°C por 60 segundos. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler.

Tabla 10. Volumen de los reactivos utilizados para la obtención de c-DNA, obteniendo un volumen final de 20 μ l.

Componente	Volumen (μ l)
5x iScript Advance Reaction Mix	4
iScript Advance Reverse Transcriptase	1
H ₂ O libre de nucleasas	10
RNA templado	5
Volumen Total por reacción	20

6.20 Cuantificación de PMMoV por q-PCR (tiempo real)

Para la cuantificación de las muestras se siguió la metodología reportada por Zhang *et al.*, (2006). Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en un termociclador Bio-Rad modelo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System utilizando el software Bio-Rad CFX Manager 3.1. En cada reacción se utilizó 5 μ l de RNA obteniendo un volumen final de 25 μ l y las condiciones del termociclador fueron 1 ciclo: 95°C 2 min, 95°C 30 seg y 50 ciclos: 60°C 60 seg durante y 72°C por 30 seg (Tabla 11).

Tabla 11. Secuencia de los cebadores utilizados para la cuantificación de PMMoV (Zhang *et al.*, 2006):

Cebador	Nombre	Secuencia (5'-3')	μ l	Con. Final
F primer	PMMV-FP1-rev	GAGTGGTTTGACCTTAACGTTTGA	1	20 nM
R primer	PMMV-RP1	TTGTTCGGTTGCAATGCAAGT	1	20 nM
Probe	PMMV-Probe1	FAM-CCTACCGAAGCAAATG-BHQ1	1.5	20 nM

6.21 Cultivo de HAdV

Se dispuso de 20 muestras de agua salobre de aproximadamente 1 mL por duplicado (40 en total), previamente colectadas en la caleta de Yal-kú, Quintana Roo. Las muestras fueron colectadas desde el mes de agosto del 2017 al mes de junio del año 2018 (exceptuando el mes de enero 2018) cada mes de muestreo incluye dos puntos de muestreo dentro de el mismo lugar de colecta (Tabla 12).

Tabla 12. Listado de muestras correspondientes a las muestras colectadas en la Laguna de Yal-kú, Quintana Roo en el período 2017-2018.

Mes	Temporalidad	Sitio 1 (Etiqueta)	Sitio 2 (Etiqueta)
Agosto		AgoYk1	AgoYk2
Septiembre	Lluvias	SepYk1	SepYk2
Octubre		OctYk1	OctYk2
Noviembre		NovYk1	NovYk2
Diciembre	Nortes	DicYk1	DicYk2
Febrero		FebYk1	FebYk2
Marzo		MarYk1	MarYk2
Abril	Secas	AbrYk1	AbrYk2
Mayo		MayYk1	MayYk1
Junio	Lluvias	JunYk1	JunYk2

Cada muestra por duplicado fue concentrada en un una sola en viales criogénicos (CORNING) de 1.8 mL, la concentración se llevó a cabo por medio de una jeringa de 3mL y filtros de 0.2 µm (NALGENE) de manera manual, antes de pasar la muestra se pasaron 200 µL de extracto de carne al 7.3 pH, posteriormente se retiró

el filtro y se colocó en una nueva jeringa de 3mL a la cual se la añadió la muestra, obteniendo así un total de 20 muestras con un volumen aproximado de 1.5 mL en cada vial criogénico. Todas las concentraciones fueron realizadas en una campana de flujo.

6.22 Inoculación de las muestras de agua en la línea celular A549 (ATCC)

Para este procedimiento se utilizaron las muestras AgoYk2 y SepYk2, las cuales se sacaron del refrigerador previamente para mantenerlas a temperatura ambiente antes de ser inoculadas. Se limpió con etanol al 70% la campana de flujo laminar, la botella de Suero Fetal Bovino 0% y la placa con la línea celular A549 de 24 pozos. Una vez todo limpio se realizó una dilución de las muestras utilizando 900 µL de medio F12K (ATCC) y 100 µL de la muestra, obteniendo un volumen final de 1 mL. Se extrajo todo el medio de cultivo con una pipeta de 10 mL de la placa con las células A549 dejando solo las células, en seguida se aplicó un lavado a las células añadiendo a cada pozo 1mL de medio F12K, se agitaron despacio de manera manual y se volvió a realizar un segundo lavado con medio F12K. Después del segundo lavado se inoculó a los pozos 1 mL de las muestras virales y, como se observó que la muestra (dilución 100 µl + 900 de medio F12K) mataba a las células instantáneamente se procedió a hacer una segunda dilución de las muestras virales con el medio F12K (dilución ½) y se inocularon 1 mL, para los controles negativos se añadió 1 mL del mismo medio F12K (utilizado para realizar las diluciones) sin muestra. Posteriormente la placa se dejó en una incubadora de CO² durante 30 min y cada 10 min la placa se agitaba manualmente con la intención de mezclar la muestra con las células. Una vez que transcurrió el tiempo se añadieron 20 µl de Suero Fetal Bovino (para mantener los pocillos al 2%) y se dejaron en la incubadora por 37°C durante 7 días.

6.23 Cuantificación de Adenovirus Humanos (HAdVs) en Cultivo Celular

Tras pasar 7 días en la incubadora, no se observó el efecto citopatogénico de las células, sin embargo, la placa de 24 pozos que contenía las muestras virales se congeló y descongeló tres veces con el objetivo de realizar una lisis celular, una vez realizado esto, los pocillos de cada columna se combinaron en uno solo, de esta mezcla se extrajo material genético con el kit de extracción Qiagen minelute virus spin kit siguiendo las instrucciones del proveedor y obteniendo un volumen de 60 µl por muestra. Para la cuantificación de las muestras se siguió la metodología de Heim *et al.*, 2003 (Tabla 13).

Tabla 13. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de HAdV

Cebador	Nombre	Secuencia (5'-3')	µl	Con. Final
F primer	AQ2	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC	1.25	500 nM
R primer	AQ1	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	1.25	500 nM
Probe	AQP	FAM-TCGACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-BHQ1	2	400 nM
		LC480 Master Mix	12.5	1x
		H ₂ O grado molecular	2	-

La cuantificación se llevó a cabo en el equipo ROCHE LightCycler® 480 qPCR system, por medio de triplicados.

6.24 Cuantificación de Enterovirus, Reovirus I y Reovirus II en tejido Celular

Se realizó la cuantificación de Enterovirus, Reovirus I y Reovirus II, por lo cual se obtuvo c-DNA para poder cuantificar las muestras. Para el grupo de Enterovirus se utilizó el método High-Capacity con las siguientes concentraciones Tabla 14 (a un volumen de 20µl):

Tabla 14. Concentraciones de los reactivos utilizados para cada reacción con el método de High-Capacity, agregando 10 µl de RNA a cada reacción, obteniendo un volumen final de 20 µl.

Componente	Volumen (µl)
10RT buffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0.8
10x RT Random Primers	2
Multiscribe Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor	1
Nuclease-free H ₂ O	3.2
Total por reacción	10

Una vez obtenido el c-DNA se procedió a realizar la cuantificación en el equipo ROCHE LightCycler® 480 qPCR system, por medio de triplicados (Tabla 15) siguiendo la metodología de Gregory et al, (2006).

Tabla 15. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de Enterovirus

Cebador	Nombre	Secuencia (5'-3')	µl	Con. Final
F primer	EV1F	CCCTGAATGCGGCTAA	1	400 nM
R primer	EV2R	TGTCACCATAAGCAGCCA	1	400 nM
Probe	EV probe	FAM- ACGGACACCCAAAGTAGTCGTCGGTTC- BHQ1	1.5	300 nM
		LC480 Master Mix	12.5	1x
		H₂O grado molecular	6.5	-

Para la obtención de c-DNA para los grupos de Reovirus I y II se utilizó SuperScript IV, realizando dos Mix por separado para cada reacción, el primero se llevó a cabo con las concentraciones de la Tabla 16. Después de preparar el Mix, se calentó en el termociclador a 65°C por 5 minutos, una vez concluido el tiempo se incubó en hielo por un minuto.

Tabla 16. Concentraciones de los reactivos utilizados para el Primer Mix con el método de SuperScript IV, agregando 11 μ l de RNA a cada reacción. Obteniendo un volumen final de 13 μ l.

Componente	Volumen (μ l)
50 ng/ μ l random hexamers	1
2 μ M gene-specific reverse primer	1
RNA (templado)	11

Posteriormente se realizó un segundo Mix, para combinarlo con el primero una vez que la última incubación en hielo se llevó a cabo, el segundo Mix contenía las siguientes concentraciones de la Tabla 17.

Tabla 17. Concentraciones de los reactivos utilizados para el Segundo Mix con el método de SuperScript IV, obteniendo un volumen de 7 μ l para cada reacción.

Componente	Volumen (μ l)
5x SSIV Buffer	4
100 mM DTT	1
Ribonuclease Inhibitor	1
SuperScript IV Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1

Después de obtener el c-DNA para Reovirus I y II se procedió a realizar la cuantificación en el equipo ROCHE LightCycler® 480 qPCR system, por medio de triplicados de los mismos, utilizando las siguientes concentraciones para Reovirus I (Tabla 18) y Reovirus II (Tabla 19) siguiendo la metodología de Gallagher y Margolin, 2007:

Tabla 18. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de Reovirus I

Cebadores	Nombre	Secuencia (5'-3')	µl	Con. Final
F primer	RV1-F	GAGGAGGGACACGCGTAGTG	2.25	900 nM
R primer	RV1-R	CCAGATCCAGAACGAATCTCATC	2.25	900 nM
Probe	RV1 probe	FAM-CTTGGATCAGATTGCTC-MGB-NFQ	1.25	250 nM
		LC480 Master Mix	12.5	1x
		H₂O grado molecular	4.25	-

Tabla 19. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de Reovirus II

Cebadores	Nombre	Secuencia (5'-3')	µl	Con. Final
F primer	RV2-F	CGGCTACGGTGTTCAGGATCT	2.25	900 nM
R primer	RV2-R	CGCGCGACGCTATTTTG	2.25	900 nM
Probe	RV2 probe	FAM-TAATCCGAAAGGTATTTTGT-MGB-NFQ	1.25	250 nM
		LC480 Master Mix	12.5	1x
		H₂O grado molecular	4.25	-

No se observó amplificación de ninguna de las muestras correspondientes en cambio los controles positivos (duplicados) sí pudieron ser cuantificados con valores de CP de 28.6 y 29.4 para Reovirus I y valores de CP de 30.1 y 29.3 para Reovirus II.

6.25 Cuantificación de Norovirus GI, GI y Reovirus III en las muestras concentradas de la Caleta de Yal-kú

Debido a que en las muestras del cultivo celular A549 (ATCC) no se logró cuantificar la presencia de varios grupos de virus entéricos se realizó la cuantificación de los grupos virales Norovirus GI, GI y Reovirus III en las muestras de agua salobre iniciales, para determinar si existía la presencia de los mismos. Ya que estos tres grupos virales corresponden a un genoma de RNA se obtuvo c-DNA para su cuantificación por el método de High-Capacity para los tres, utilizando las siguientes concentraciones para el grupo de Norovirus GI, GII Reovirus III (Tabla 20):

Tabla 20. Concentraciones de los reactivos utilizados para cada reacción de los grupos Norovirus GI, GII y Reovirus III con el método de High-Capacity, agregando 10 µl de RNA a cada reacción, obteniendo un volumen final de 20 µl.

Componente	µl/well
10RT buffer	2
25x dNTP Mix (100 mM)	0.8
10x RT Random Primers	2
Multiscribe Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor	1
Nuclease-free H ₂ O	3.2
Total por reacción	10

Una vez obtenido el c-DNA se procedió a la cuantificación de las muestras en el equipo ROCHE LightCycler® 480 qPCR system, por medio de triplicados de los mismos, utilizando las siguientes concentraciones para Norovirus GI (Tabla 10), Norovirus GII siguiendo la metodología de Kageyama *et al.*, 2003 (Tabla 21) y Reovirus III siguiendo la metodología de Gallagher y Margolin, 2007 (Tabla 22):

Tabla 21. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de norovirus GI

Primer/probe	Nombre	Secuencia (5'-3')	µl/well	Con. Final
F primer	COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	1	400 nM
R primer	COG1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	1	400 nM
Probe	RING1(a)-TP	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-BHQ1	1.5	300 nM
	RING1(b)- TP	FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-BHQ1	0.5	100 nM
		LC480 Master Mix	12.5	1x
		H₂O grado molecular	6	-

Tabla 22. Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de norovirus GII.

Primer/probe	Nombre	Secuencia (5'-3')	µl/well	Con. Final
F primer	COG2F	GARGARBCNATGTTYAGRTGRTGGATGAG	1	400 nM
R primer	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	1	400 nM
Probe	RING2-TP	FAM-TGGGAGGGCGATCGATCGCAATCT-BHQ1	1.5	300 nM
		LC480 Master Mix	12.5	1x
		H₂O grado molecular	6.5	-

Tabla Tamaño de los primer utilizados para la cuantificación de norovirus GII las condiciones del termociclador fueron PCR: 94°C 20 seg, 55°C 60 sec, 72°C 30 sec

Primer/probe	Nombre	Secuencia (5'-3')	µl/well	Con. Final
F primer	RV3-F	CTACCGCTGTACCATCGTTAAGCT	1	900 nM
R primer	RV3-R	TGGTACCCCTCCGGGATT	1	900 nM
Probe	RV3-Probe	FAM-ATCACCTGGAATGCT-BHQ1	1.5	250 nM
		LC480 Master Mix	12.5	1x
		H₂O grado molecular	6.5	-

7. Resultados

7.1 Colecta de las muestras

Se colectaron un total de 20 muestras de agua salobre, cada una de 50 L, durante 10 meses de muestreo desde agosto del 2017 a junio del 2018, exceptuando el mes de enero del año 2018. El muestreo abarco las tres temporadas climáticas de la PY (lluvias, secas y nortes) (Tabla 23). La colecta de las muestras se realizó de manera manual en dos sitios diferentes dentro de la Caleta de Yal-kú, la cual presenta condiciones salobres, ver Tabla 23.

Tabla 23. Listado de muestras colectadas en la Laguna de Yal-kú, Quintana Roo en el período 2017-2018.

Mes/Año	Temporalidad	Sitio 1 (Etiqueta)	Sitio 2 (Etiqueta)
Agosto 2017	Lluvias	AgoYk1	AgoYk2
Septiembre 2017		SepYk1	SepYk2
Octubre 2017		OctYk1	OctYk2
Noviembre 2017		NovYk1	NovYk2
Diciembre 2017		DicYk1	DicYk2
Febrero 2018	Nortes	FebYk1	FebYk2
Marzo 2018	Secas	MarYk1	MarYk2
Abril 2018		AbrYk1	AbrYk2
Mayo 2018		MayYk1	MayYk1
Junio 2018		JunYk1	JunYk2

7.2 Parámetros Físicoquímicos

El promedio de todos los meses de muestreo obtenidos para cada parámetro físicoquímico fueron los siguientes: 27.19 °C de Temperatura, 28.17 mS/cm de Conductividad, 15.5 g/L de Sólidos disueltos totales, 16.5 de Salinidad, 64.9 % de oxígeno disuelto, 338.3 mV de Potencial de reducción y 7.3 de pH (Tabla 24).

Tabla 24. Promedio de los parámetros fisicoquímicos determinados mensualmente en los dos sitios de muestreo desde agosto del 2017 al junio del 2018.

Mes	Temperatura (°C)		Conductividad (mS/cm)		Sólidos disueltos (g/L)		Salinidad (psu)		Oxígeno disuelto (%)		Potencial Reducción (mV)		pH	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
Agosto	28.5	29.4	25.7	30.8	15.4	18.4	14.3	17.4	67.1	78.1	368.7	316.6	7.2	7.4
Septiembre	28.2	28.5	29.8	31.3	18.2	19.1	17.1	18.1	55.1	79.1	364.4	349.2	7.2	7.4
Octubre	27.4	27.5	27.8	29.7	17.3	18.4	16.2	17.4	43.1	71.1	352.6	340.6	7.2	7.3
Noviembre	27	27.2	27.9	31	17.4	19.3	16.3	18.3	63.8	72.5	375.5	348.2	7.2	7.3
Diciembre	26.1	25.8	27.8	29.4	17.8	18.8	16.8	17.8	43.9	80.5	359.3	336.4	7.2	7.4
Febrero	26.5	26.5	26.2	27.3	16.5	17.2	15.4	16.2	45.9	76.4	354.4	318.6	7.1	7.3
Marzo	25.6	25.6	24.3	27.2	15.6	18.5	14.5	17.5	43.6	82.6	344.6	312.7	7.3	7.5
Abril	27.1	27.4	23.8	22.3	14.9	13.9	13.7	12.8	73.1	88.6	326.3	296.3	7.4	7.6
Mayo	27.2	27.7	26.5	29.4	16.5	18.1	15.4	17.1	40.5	79.3	330.6	319.2	7.2	7.5
Junio	27.2	27.4	31.1	34.1	19.4	21.2	18.4	20.6	38.1	77.3	343.5	308.7	7.2	7.4

Donde S1= sitio 1, S2= sitio 2

La temperatura más alta registrada correspondió al sitio 2 durante el mes de agosto con 29.4 °C y la más baja fue de 25.6 °C para el mes de marzo en ambos sitios. Los valores más altos de conductividad fueron de 34.1 mS/cm en el mes de junio en el sitio 2 y los más bajos se observaron en el mes de abril en el sitio 2 con 22.3 mS/cm. La concentración más alta de sólidos disueltos fue de 19.4 g/L en el mes de junio en el sitio 1 y la más baja de 13.9 en el mes de abril en el sitio 2. La mayor salinidad se detectó en el mes de junio en el sitio 2 con un valor de 20.6 psu, mientras que la más baja corresponde al mes de abril en el sitio 2 con un valor de 12.8 psu. El porcentaje más bajo de oxígeno disuelto se observó el mes de mayo en el sitio 1 el cual fue de 40.5%, mientras que el más alto fue de 88.6% en el mes de abril en el sitio 2. Para el potencial de reducción el valor más alto encontrado fue de 375.5 en el mes de noviembre en el sitio 1 y el más bajo 296.3 en el mes de abril en el sitio 2. Los valores de pH encontrados oscilaron entre un valor de 7, el valor más alto fue 7.6 en el mes de abril en el sitio 2 y el más bajo de 7.1 en el mes de febrero en el sitio 1. Cabe mencionar que todos los parámetros reportados fueron muy homogéneos en los diferentes meses de muestreo.

7.3 Cuantificación de Colifagos Somáticos y F+ específicos

Los resultados de la concentración de colifagos son expresados en unidades formadoras de placa por cada cien mililitros (UFP/100 ml), en cada una de las bacterias hospederas de *E. coli*:

CN13. (Cepa ATCC® 700609™ CN13) resistente a ácido nalidíxico (mutante de ATCC 13706). Durante los meses de agosto a febrero se detectaron colifagos somáticos en el 100% de los sitios de muestreo abarcando así todas las temporalidades. En el Sitio 1 se encontró un rango de concentraciones entre 10 a 440 UFP/100 ml y para el Sitio 2 se presentaron valores entre 10 a 280 UFP/100.

Las concentraciones mayores de colifagos somáticos fueron detectadas para ambos sitios en el mes de marzo, mientras que las concentraciones menores fueron

detectadas en el mes de mayo para el sitio 1 y en el mes de mayo y noviembre para el sitio 2 (Figura 6).

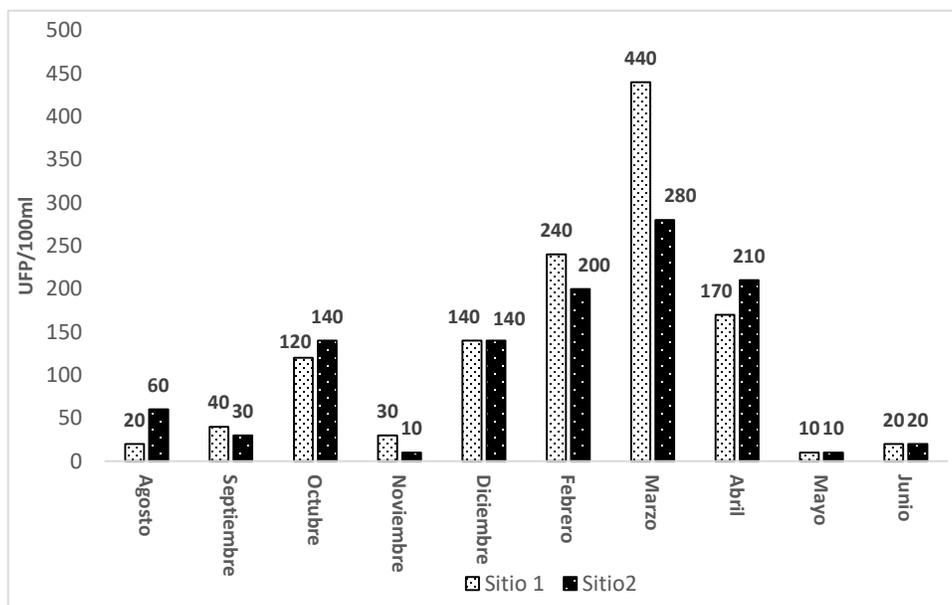


Figura 6. Concentración de colifagos somáticos expresada en UFP/100ml durante los meses de muestreo. Los números en las barras corresponden densidad reportada en cada sitio y mes.

15597. (Cepa ATCC® 15597™ C-300). Durante los meses de agosto a octubre se detectaron colifagos F+ específicos en el 100% de los sitios de muestreo con un rango de concentración entre 20 a 220 UFP/100 para el sitio 1, mientras que para el para el sitio 2 se presentaron valores entre 10 a 110 UFP/100 ml. Las concentraciones mayores de colifagos F+específicos fueron detectadas en el mes de marzo para el sitio 1, mientras que las concentraciones menores fueron detectadas en el mes de mayo en el sitio 2 (Figura 7).

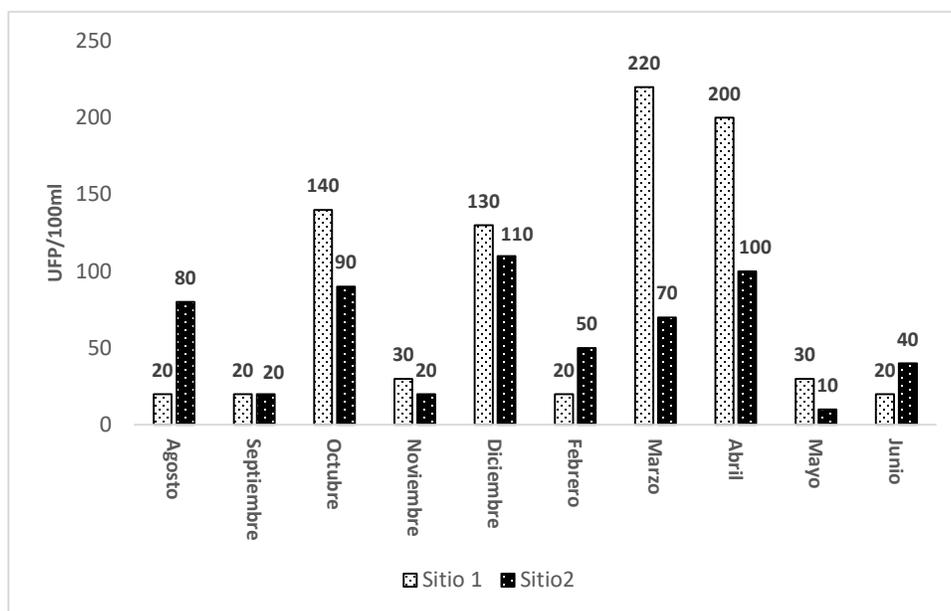


Figura 7. Concentración de colifagos F+específicos expresada en UFP/100ml durante los meses de muestreo. Donde los números en las barras corresponden a las CG/L reportadas en cada sitio y mes.

Es importante mencionar que en el mes de marzo en el Sitio 1 fueron cuantificadas concentraciones más altas tanto para Colifagos somáticos como F+ específicos. Posteriormente se realizó un promedio total para determinar en qué sitio se encontraba la mayor densidad de colifagos, siendo las concentraciones de colifagos somáticos más altas, con un valor de 116.5 CG/L, mientras que el valor promedio total para colifagos F+específicos fue de 71 CG/L.

7.4 Cuantificación del *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)

El PMMoV se detectó en el 80% de las muestras totales colectadas, en los meses correspondientes a las temporadas de lluvias, secas y nortes en los dos sitios muestreados. El único mes en el cual no se detectó la presencia del PMMoV en ambos sitios fue en octubre (Tabla 25). Las concentraciones del PMMoV detectadas por qPCR se registraron en un rango de 1.54×10^1 CG/L a 1.14×10^2 CG/L. La mayor concentración se encontró en el mes de marzo en el sitio 2 con un valor de 1.14×10^2 CG/L y la menor concentración del PMMoV fue detectada en el mes de septiembre

en el sitio 2 con un valor 1.54×10^1 CG/L (Tabla 25). Durante la temporada de lluvias se detectó la mayor cantidad de muestras positivas, con un total de 6 muestras positivas considerando ambos sitios, mientras que en la temporada de secas y nortes se detectaron un total de 5 muestras positivas considerando ambos sitios. La concentración promedio mayor se observó en la temporada de secas con un valor de 8.64×10^1 CG/L, mientras que la temporada con la concentración promedio menor fue la de lluvias con un valor de 7.03×10^1 y la temporada de nortes presentó un valor de 7.81×10^1 CG/L (Tabla 25).

Tabla 25. Concentraciones promedio del virus PMMoV por sitio durante los 10 meses de muestreo correspondientes a las temporadas de lluvias, secas y nortes.

Muestra Colectada Mes y Año	Concentración de PMMoV en el Sitio 1 en CG/L	Concentración de PMMoV en el Sitio 2 en CG/L	Concetración promediodel PMMoV por temporada
Agosto 2017	6.62×10^1	7.78×10^1	7.03×10^1 (Lluvias)
Septiembre 2017	9.28×10^1	1.54×10^1	
Octubre 2017	N/A	N/C	
Junio 2018	8.16×10^1	8.64×10^1	
Noviembre 2017	4.5×10^1	8.15×10^1	7.81×10^1 (Nortes)
Diciembre 2017	4.66×10^1	N/A	
Febrero 2018	9.47×10^1	1.13×10^2	
Marzo 2018	7.67×10^1	1.14×10^2	8.64×10^1 (Secas)
Abril 2018	6.82×10^1	6.42×10^1	
Mayo 2018	N/A	1.09×10^2	

N/A= Muestra Negativa

N/C= Muestra con valores de concentración bajo el límite de cuantificación que corresponde a 10 copias por genoma.

Los valores generados por el equipo durante la cuantificación de PMMoV en las diferentes corridas de qPCR fueron los siguientes: eficiencia= 96.88%, $r^2 = 0.996$, la ordenada al origen= 36.387 y la pendiente= -3.373.

El valor de eficiencia se encuentra entre el 96-100% lo cual indica que la duplicación del templado fue exitosa en el termociclador, siendo 100% la reacción ideal, de otra forma se estaría subestimando o sobrestimando la cantidad de templado amplificado. El valor de r^2 se refiere a la correlación de los datos obtenidos con la curva estándar utilizada, siendo el valor de 1 en más alto. La ordenada al origen se relaciona con el límite de detección de la reacción, es decir, la capacidad de detectar cuando tiene lugar una amplificación. Por último, el valor de la pendiente está estrechamente relacionado con el de la eficiencia donde valores cercanos a -3.32 se acercarán a una eficiencia del 100%.

7.5 Cuantificación de Adenovirus

Se detectó la presencia de HAdV's en el 70% de las muestras colectadas en concentraciones entre el rango de 1.6×10^2 CG/L a 1.57×10^3 CG/L. La mayor concentración se encontró en el mes de agosto en el sitio 2 con un valor de 1.57×10^3 CG/L y la menor concentración se detectó en el mes de noviembre en el sitio 1 con un valor de 1.6×10^2 CG/L (Tabla 26).

Por lo tanto, la presencia de HAdV's se detectó en las tres temporadas de muestreo (lluvias, secas y nortes). El mayor porcentaje de muestras positivas se detectó durante la temporada de secas y de nortes, con un 83% de muestras positivas en cada caso, mientras que se detectaron 50% de muestras positivas durante la temporada de lluvias (Tabla 26). Durante la temporada de lluvias se detectó la concentración promedio más alta de HAdVs de 6.54×10^2 CG/L (Tabla 26).

Tabla 26. Concentraciones promedio del virus HAdV por sitio durante los 10 meses de muestreo correspondientes a las temporadas de lluvias, secas y nortes.

Muestra Colectada Mes y Año	Concentración de HAdV en el Sitio 1 en CG/L	Concentración de HAdV en el Sitio 2 en CG/L	Concentración promedio del HAdV por temporada
Agosto 2017	N/C	1.57x10 ³	6.54x10 ² (Lluvias)
Septiembre 2017	N/C	2.09x10 ²	
Octubre 2017	N/A	N/C	
Junio 2018	4.08x10 ²	4.32x10 ²	
Noviembre 2017	1.6x10 ²	2.85x10 ²	2.67x10 ² (Nortes)
Diciembre 2017	1.63x10 ²	N/A	
Febrero 2018	3.31x10 ²	3.96x10 ²	
Marzo 2018	3.84x10 ²	5.72x10 ²	4.33x10 ² (Secas)
Abril 2018	3.41x10 ²	3.23x10 ²	
Mayo 2018	N/A	5.47x10 ²	

N/A= Muestra Negativa

N/C= Muestra con valores de concentración bajo el límite de cuantificación que corresponde a 10 copias por genoma.

Los valores generados por el equipo durante la cuantificación de HAdV en las diferentes corridas de qPCR fueron los siguientes: eficiencia= 93.01%, $r^2 = 0.969$, la ordenada al origen= 38.755 y la pendiente= -3.514.

7.6 Comparación entre las concentraciones virales presentes en la Caleta de Yal-kú

De acuerdo a la cuantificación previamente realizada se realizó una comparación entre la ocurrencia del virus PMMoV y HAdV's para observar en que meses de muestreo y sitios estaban presentes ambos grupos virales. Se identificó un rango de concentraciones de ambos virus que va desde los 10^1 a 10^3 CG/L. Ambos grupos virales estuvieron presentes en todos los meses de muestreo en al menos en uno de los sitios con excepción del mes de octubre correspondiente a la temporada de lluvias, donde ninguno de los grupos virales pudo ser cuantificado como se muestra en la Figura 8.

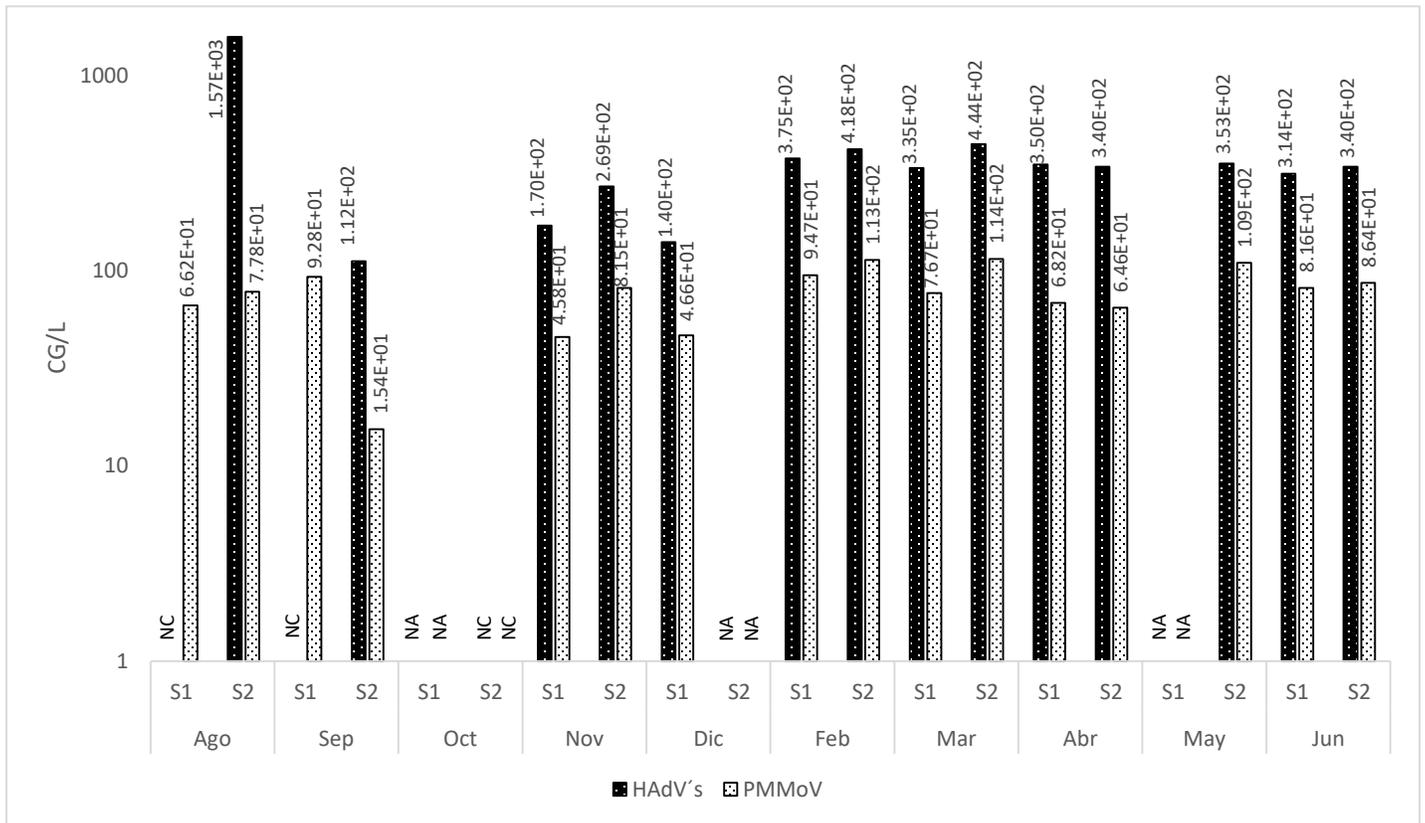


Figura 8. Concentraciones virales de PMMoV y HAdV's expresadas en copias de genoma por litro (CG/L) en cada sitio de muestreo. Donde NC= Muestra detectada no cuantificable, NA= Muestra no amplificada, S1 = Sitio de colecta 1 y S2= Sitio de Colecta 2.

De forma general, de las 20 muestras de agua analizadas en la Caleta de Yal-kú, la concentración viral más alta registrada fue de HAdV's en el sitio 2 del mes de agosto con un valor de 1.57×10^3 , mientras que la concentración promedio más baja detectada fue de 1.12×10^1 para el mes de septiembre en el sitio 2 (Figura 8). Se detectó la presencia de ambos grupos virales de forma simultánea en el 70% de las muestras-

También cabe recalcar que para el mes de octubre las concentraciones de ambos grupos virales fueron detectadas por debajo del límite de cuantificación o no fueron amplificadas por el termociclador, siendo la colecta del mes de octubre la que incluye las más bajas concentraciones para ambos grupos virales en ambos sitios de muestreo. En cuanto al sitio 2 del mes de diciembre, tampoco se detectó la muestra para HAdV's ni PMMoV, lo mismo ocurrió en el mes de mayo en el sitio 1, ya que ninguno de los dos grupos virales pudo ser detectado.

7.7 Identificación de serotipos de Adenovirus

Mediante el uso de PCR anidado, se obtuvieron un total de 16 muestras positivas para HAdV's es decir el 80% de los sitios fue positivos. Se detectaron 7 muestras positivas durante la temporada de lluvias, 5 durante la temporada de nortes y 4 durante la temporada de secas. Se observó que la temporada de lluvias albergó la mayor cantidad de muestras positivas, mientras que la menor cantidad de muestras positivas se reportó en la temporada de secas, todos los fragmentos detectados corresponden a un tamaño de aproximadamente 170 pb (Tabla 27).

Tabla 27. Detección de HAdVs por PCR.

Muestra Colectada Mes y Año	Resultados de la detección de HAdV por PCR anidado		Concentración promedio del HAdV por temporada
	Sitio 1	Sitio 2	
Agosto 2017	(+) 1:25	(+) 1:25	7 muestras positivas (Lluvias)
Septiembre 2017	(+) 1:25	(+) 1:25	
Octubre 2017	(-)	(+) 1:10	
Junio 2018	(+) 1:25	(+) 1:25	
Noviembre 2017	(-)	(+) 1:10	5 muestras positivas (Nortes)
Diciembre 2017	(+) 1:50	(+) 1:50	
Febrero 2018	(+) 1:10	(+) 1:10	
Marzo 2018	(+) 1:10	(+) 1:10	4 muestras positivas (Secas)
Abril 2018	(-)	(-)	
Mayo 2018	(+) 1:10	(+) 1:10	

(+) = Muestra Positiva, donde el número equivale a la dilución del DNA total utilizado como templado.

(-) = Muestra no amplificada

Se obtuvieron un total de 65 secuencias, las cuales presentaron porcentajes de identidad arriba del 96% que se encuentran en la base de datos de GenBank para Adenovirus Humanos. Del total de secuencias el 52% compartió homología con el

serotipo 41 (96-100% de identidad) y el otro 48% restante compartió homología con el serotipo 40 (96-100% de identidad) (Figura 9).

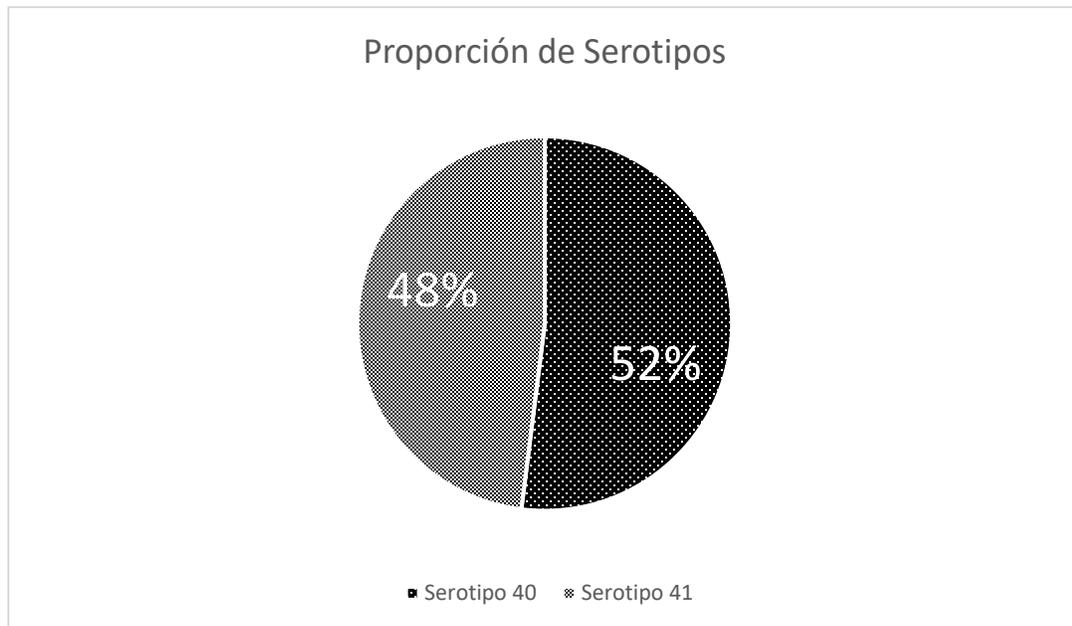


Figura 9. Porcentaje de Serotipos de HAdV's encontrados en la Caleta de Yal-kú, Quintana Roo.

Los resultados demostraron que el serotipo HAdV 40 es el más abundante representado en este estudio con 38 clonas, mientras que el serotipo HAdV 41 presentó un total de 27 clonas. La presencia de ambos serotipos en un mismo sitio se registró en el 15% de las muestras. El serotipo HAdV F-40 se detectó durante los meses febrero, mayo y junio, mientras que en el mes de noviembre solo se reportó la presencia del serotipo F-41. Para la temporada de lluvias y nortes se encontró la presencia de ambos serotipos en los dos sitios de muestreo, mientras que la temporada de secas no se reportó el serotipo F-41 en el sitio 1. El número mayor de clonas (n=10) correspondientes al serotipo HAdV F-40 se reportó en la temporada de nortes en el sitio 2 y el número mayor de clonas (n=8) correspondientes al serotipo HAdV F-41 se reportó en la temporada de lluvias en el sitio 2 (Figura 10A y 10B). El 100% de las secuencias obtenidas a partir de las muestras se agruparon en un clados con un soporte de bootstrap del 97%. Las

secuencias obtenidas a partir de los sitios de muestreo se agruparon en clados con secuencias previamente reportadas en países como Australia, Brasil (serotipo 40 y serotipo 41), se incluyó como raíz dos secuencias correspondientes al gen hexón de Adenovirus 2 de simio, así como 3 secuencias correspondientes al serotipo 31 de HAdV's con el objetivo de observar una diferencia en la agrupación de los clados, las secuencias Yk2 Oct 194AZAA006 y Yk2 Jun IC33ZAB261 no se agruparon en algún clado, esto se debe a la mala calidad de la secuencia en el proceso de secuenciación. No se encontró similitud con secuencias reportadas previamente en México (Figura 11).

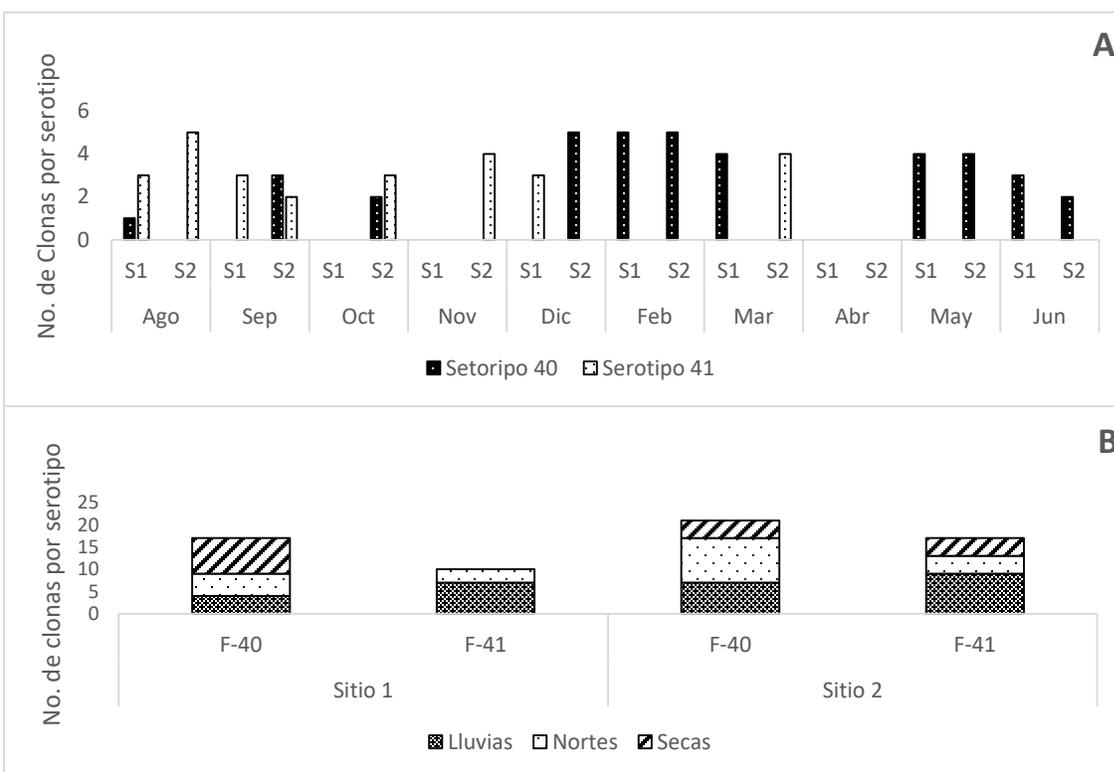


Figura 10 A: Número de clonas por serotipo de HAdV's F-40 y F-41 por sitio y mes, donde S1 corresponde al sitio 1 y S2 corresponde al sitio 2.

Figura 10 B: Número de clonas por serotipo de HAdV's encontrados para F-40 y F-41 durante la temporada de lluvias, nortes y secas.

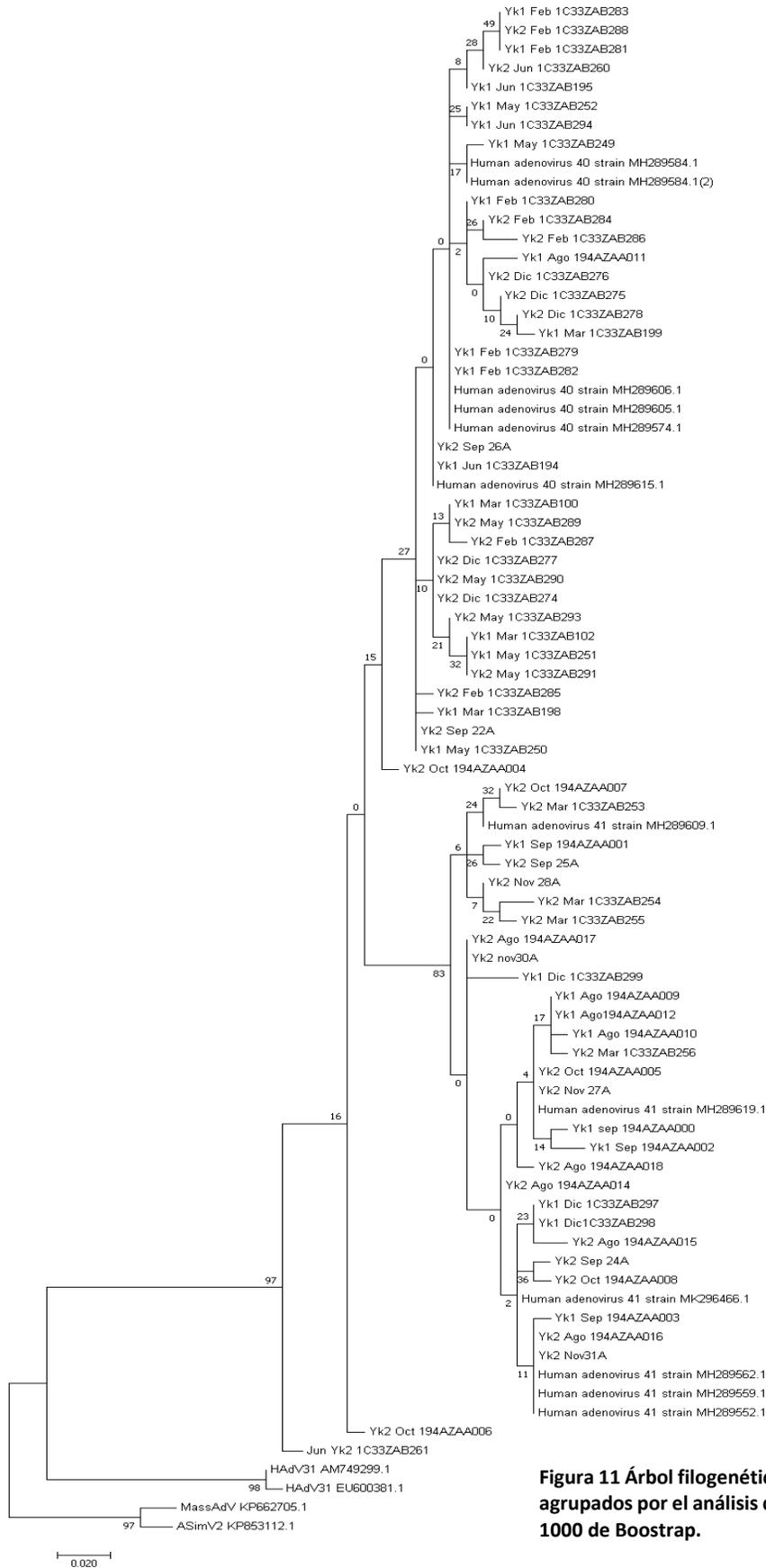


Figura 11 Árbol filogenético realizado en el software MEGA, clados agrupados por el análisis de Máxima Verosimilitud con un valor de 1000 de Bootstrap.

7.8 Cuantificación de Virus Entéricos en Cultivo Celular A549

Se realizó la cuantificación de los grupos de virus entéricos HAdV, Enterovirus, Reovirus I y Reovirus II del cultivo celular A549, pero no se logró la amplificación de las muestras (Tabla 28).

Tabla 28. Grupo viral, métodos de obtención de c-DNA de las muestras obtenidas por el cultivo celular A549

Virus	Método c-DNA	Amplificación	
		Controles Positivos	Muestras Cultivo Viral
HAdV (Heim et al., 2003)	X	✓✓	XX
Enterovirus (Gregory et al., 2006)	High-Capacity	✓✓	XX
Reovirus I (Gallager and Margolin, 2007)	SuperScript IV	✓✓	XX
Reovirus II (Gallager and Margolin, 2007)	SuperScript IV	✓✓	XX

8. Discusión

Los datos registrados de temperatura, pH y salinidad en las muestras de agua de este estudio se encuentran dentro de los rangos reportados por otros autores para el acuífero de la PY (Hernández-Terrones *et al.*, 2015; Pérez-Ceballos *et al.*, 2012; Schmitter-Soto *et al.*, 2002). Particularmente dentro de la caleta de Yal-kú se reportan variaciones en los parámetros fisicoquímicos entre cada temporalidad. Se ha reportado que en la Caleta de Yal-kú la temperatura, oscila entre los 26.2°C a los 30.1°C a lo largo del año (Muñoz-Cortes, 2018; Kennish, 2015). En el presente estudio la temperatura promedios fue de 25.8°C a 29.4°C. En cuanto a los valores de pH reportados previamente en la caleta oscilan entre 7.1 a 8.3, la conductividad 17.6 a 47 mS/cm y salinidad entre 12.6 a 34.9 psu (Muñoz-Cortes, 2018; Kennish, 2015) . Los rangos obtenidos en este estudio fueron 7.1 a 7.6 para pH, 23.8 a 34.1

mS/cm para conductividad y 12.8 a 20.6 psu. Algunos rangos de los parámetros fisicoquímicos como el pH, conductividad y salinidad previamente reportados son ligeramente más altos que los reportados en el trabajo de Kennish, 2015, esto se debe a que los puntos de muestreo dentro de la Caleta fueron distintos en el trabajo y durante todas las temporalidades, otro factor a considerar es que los puntos de muestreo sitio 1 y sitio 2 de este trabajo se encuentran cerca de una DAS, debido a esto los parámetros de conductividad y salinidad son ligeramente menores, sin embargo, dichos valores oscilan dentro de los reportados en la PY (Leal-Bautista, et al., 2013; Rosiles-González et al., 2017; Muñoz-Cortes, 2018).

Las concentraciones más altas de colifagos fueron cuantificadas durante la temporada de secas, sin embargo, se ha reportado previamente que en cenotes presentes en el acuífero noreste de la PY las concentraciones de colifagos somáticos y F+específicos son más altas durante la temporada de lluvias (Rosiles-González *et al.*, 2017). Así mismo dentro de la caleta de Yal-kú en estudios previos de acuerdo con Muñoz-Cortes (2018) las mayores concentraciones de colifagos somáticos y F+específicos fueron en la temporada de lluvias. Varios estudios incluyendo el presente, han reportado que las concentraciones de colifagos somáticos son mayores con respecto a las concentraciones de colifagos F+específicos (Grabow, 2001, Lin and Ganesh, 2013 y Rezaeinejad *et al.*, 2014). Este patrón se puede atribuir a la capacidad de replicación en el ambiente de los colifagos somáticos (Jofre, 2009), no obstante, Rezaeinejad *et al.*, (2014) atribuyen un incremento significativo en la concentración de colifagos (en general) durante eventos con lluvias. Los resultados de este estudio podrían sugerir que la temporalidad es un factor determinante en la concentración de colifagos en el acuífero de la PY. Las concentraciones más altas reportadas en este trabajo fueron en la temporada de secas para ambos grupos de colifagos, los cuales se pueden encontrar presentes a lo largo de la temporalidad en la Caleta de Yal-kú. De acuerdo con Wiedenmann *et al.*, 2006 cuando se detectan concentraciones mayores a 10 UFP/100ml podría existir un riesgo para la salud humana, y es importante resaltar que en el presente trabajo, durante todos los meses de muestreo se encontraron concentraciones iguales y mayores a 10 UFP/100 ml. Por otro lado, se ha

determinado que el incremento de concentraciones de los colifagos F+específicos pueden estar asociados a un riesgo en contraer enfermedades gastrointestinales en los humanos (Wade *et al.*, 2005; Colford *et al.*, 2007), dichos incrementos se pueden observar en este estudio con cambios en las concentraciones de un mes a otro, por ejemplo de septiembre a octubre, de noviembre a diciembre y de febrero a marzo, lo anterior sugiere que en cualquier temporalidad podría existir un riesgo de contraer enfermedad gastrointestinal, sin embargo, habría que utilizar otras herramientas como un análisis de riesgo para poder determinarlo.

Las concentraciones de colifagos están por debajo de las reportadas previamente por Muñoz-Cortes (2018) en el mismo sitio las cuales fueron de 80 a 2560 UFP/100ml para Colifagos somáticos y de 350 a 1810 UFP/100 ml para F+específicos, mientras que en este estudio las concentraciones para colifagos somáticos fueron de 10 a 440 UFP/100ml y para F+ específicos de 10 a 220 UFP/100ml, lo anterior sugiere que la variabilidad en las concentraciones promedio de este estudio se debe a un mayor cantidad de mediciones, esta diferencia entre las concentraciones detectadas en un mismo sitio podría deberse a la escorrentía o una contaminación puntual en la zona a la hora del muestreo (Jofre, 2009; Reed *et al.*, 2011) que ocurren a lo largo de la temporalidad. Por otro lado las concentraciones de este estudio concuerdan con las concentraciones reportadas previamente en cenotes y en zonas de agua salobre en la PY (Rosiles-González *et al.*, 2017), donde los rangos de colifagos somáticos en agua salobre oscilan entre las 10 UFP/100ml para la temporada de lluvias y de 30 a 190 UFP/100 ml para la temporada de secas. De acuerdo con Rosiles-Gonzalez *et al.* (2017) en cuanto a las concentraciones de colifagos F+específicos para la temporada de lluvias en agua salobre los colifagos F+específicos no fueron reportados, en la temporada de secas oscilan entre 10 a 20 UFP/100ml, concordando así con los datos obtenidos en este estudio. Es importante mencionar que la presencia de colifagos en el ambiente acuático es un reflejo de contaminación fecal y dichos agentes sugieren una inclusión en las normativas para la calidad del agua ya que pueden utilizarse como un potencial indicador de contaminación (Jofre *et al.*, 2016; Skraber *et al.*, 2004).

Las concentraciones del PMMoV reportadas en diversos ambientes acuáticos varían de acuerdo al tipo de agua en el que se encuentren, por ejemplo en aguas residuales, aguas tratadas, agua en cenotes y agua salobre (Kitajima *et al.*, 2014; Symonds *et al.*, 2014; Rosiles-González *et al.*, 2017). Las concentraciones reportadas de PMMoV en agua residual oscilan en 1×10^{10} CG/L (Symonds *et al.*, 2019). En agua tratada las concentraciones oscilan entre 1.10×10^7 a 7.0×10^9 CG/L (Rosario *et al.*, 2009) y las concentraciones en el agua de los cenotes y agua salobre se encuentran en el rango de 1.7×10^1 a 1.0×10^4 CG/L (Rosiles-González *et al.*, 2017). En la Caleta de Yal-kú se han registrado previamente concentraciones de PMMoV que oscilan en el rango de 10^1 CG/L donde en la temporada de secas se encontró la concentración más alta con un valor de 7.54×10^1 dichos valores son menores a los reportados en este estudio (10^1 a 10^2) (Muñoz-Cortes, 2018). En cuanto a la persistencia del PMMoV reportada por Muñoz-Cortes *et al.*, (2019) en la Caleta de Yal-kú fue del 50% de los muestreos durante la temporada de lluvias y secas, mientras que en este estudio se encontró en el 85% de las muestras colectadas, de igual manera la persistencia reportada por (Rosiles-González *et al.*, 2017) dentro de la PY en el aguas de los cenotes fue del 50%, siendo los resultados de este estudios más altos a los reportados previamente en la zona. En cuanto a la temporalidad no hubo un cambio en las concentraciones de PMMoV cuantificadas en este estudio, lo cual concuerda los datos reportados por (Haramoto *et al.*, 2013) donde cuantificaron las concentraciones de PMMoV en una planta de tratamiento para agua de consumo humano en Japón y la temporalidad de los muestreos no influyó en las concentraciones de los virus. Así mismo en Alemania en el trabajo de (Hamza *et al.*, 2011) las concentraciones de PMMoV en ríos, no presentaron una variabilidad asociada a la temporalidad durante un año de muestreo, esta condición concuerda con los resultados obtenidos en este estudio ya que las concentraciones cuantificadas no varían a lo largo de la temporalidad.

Los serotipos HAdV's F-40 y F-41 encontrados en este trabajo ya habían sido reportados previamente en el aguas de los cenotes y la zona costera de la PY (Avila, 2017; Rosiles-González *et al.*, 2019). Ambos serotipos son los más abundantes en los cuerpos de agua, debido a que se excretan en grandes cantidades en las heces,

estos mismos son uno de los principales agentes causantes de gastroenteritis a nivel mundial afectando principalmente a niños (Colford *et al.*, 2007; Haramoto *et al.*, 2018). Se estima que su alta prevalencia en las ambientes acuáticos se debe a sus características, ya que los HAdV's resisten a varios métodos convencionales de desinfección como la radiación UV y cloración (Love *et al.*, 2010; Sidhu *et al.*, 2018). En el presente trabajo los HAdV's se encontraron dentro de la Caleta de Yal-kú en concentraciones entre 10^2 y 10^3 CG/L. Estas concentraciones están por debajo de las reportadas para las plantas de tratamiento las cuales oscilan entre 10^6 a 10^8 CG/L (Kuo *et al.*, 2010; Jatinder *et al.*, 2013), las concentraciones de HAdV's reportadas en agua superficial oscilan entre 10^2 a 10^4 CG/L (Fong *et al.*, 2010; Aslan *et al.*, 2011). En el presente estudio las concentraciones encontradas concuerdan con las reportadas para agua superficial, también los rangos de concentraciones concuerdan con los reportados en DAS de la zona, cuyo rango es de 10^2 a 10^4 CG/L (Muñoz-Cortes, 2018).

Para finalizar y con base en los resultados obtenidos, en el uso de indicadores virales como los colifagos somáticos y F+específicos y el PMMoV, así como el virus entérico HAdV, este grupo indicadores resultó ser eficiente para el monitoreo por temporalidad en la zona costera de la PY. Sin embargo, aún es necesario es necesario realizar más estudios para definir la trazabilidad que tienen estos patógenos en la zona, así como evaluar el riesgo potencial que podría amenazar con sus concentraciones. En México aún no se contempla el uso de virus entéricos como indicadores de calidad del agua, el presente trabajo fundamenta una base para la futura toma de decisiones con respecto a la normatividad de calidad de agua ya que la presencia de patógenos en los ambientes acuáticos costeros es constante durante todas las temporadas.

9. Conclusiones

Este estudio permitió demostrar la presencia de estos virus en las DAS e identificar los serotipos presentes. Los resultados indican una presencia constante de HAdV

durante las diferentes temporalidades de la región, así como la de otros indicadores virales como la presencia de colifagos somáticos, F+específicos, el virus del PMMoV y HAdVs F-40 y F-41. Se precisa un estudio hidrogeológico para determinar la trazabilidad de dichos virus, así como su origen.

10. Bibliografía

- Allard, Anika; Bo Albinsson y Göran Wadell (2001). Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 498–505
- Antigüedad, I., Morales, T., & Uriarte, J. A. (2007). The karstic aquifers . Cases of the Basque Country. *Enseñanza de Las Ciencias de La Tierra*, 325–332.
- Arcos Pulido, M. D. P., Ávila de Navia, MSC, S. L., Estupiñán Torres, MSC, S. M., & Gómez Prieto, A. C. (2017). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*, 3(4), 69. <https://doi.org/10.22490/24629448.338>
- Avila, G. (2017). Detección y cuantificación de coliformes, colifagos y adenovirus en el sistema acuífero del norte del estado de Quintana Roo. *Centro de Investigación Científica de Yucatán*.
- Back, W., Hanshaw, B. B., Herman, J. S., & Van Driel, J. N. (1986). Differential dissolution of a Pleistocene reef in the groundwater mixing zone of coastal Yucatan, Mexico. *Geology*, 14(2), 137–140. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1986\)14<137:DDOAPR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1986)14<137:DDOAPR>2.0.CO;2)
- Bakalowicz, M. (2014). Karst groundwater : A challenge for new resources Karst groundwater : a challenge for new resources, (January 2005). <https://doi.org/10.1007/s10040-004-0402-9>
- Bosch, A. (2014). Human enteric viruses in the water environment: a ... [Int Microbiol. 1998] - PubMed result, (October 1998). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

- Cabral, J. P. S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Colford, J. M., Wade, T. J., Schiff, K. C., Wright, C. C., Griffith, J. F., Sandhu, S. K., ... Weisberg, S. B. (2007). Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology*, 18(1), 27–35. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000249425.32990.b9>
- Comisión Nacional del Agua. (2015). Actualización de la disponibilidad media anual de agua en el acuífero Península de Yucatán (3105), Estado de Yucatán. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Duarte, Y. A., Bautista, F., Mendoza, M. E., & Delgado, C. (2013). Vulnerabilidad y riesgo de contaminación de acuíferos kársticos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(2), 243–263.
- Espinosa-garcía, A. C., & Arias-ortíz, C. F. (2004). Virus in aquatic systems and public health implications, 14(2), 166–178.
- Fenwick, A. (2006). Waterborne infectious diseases - could they be consigned to history? (vol 313, pg 1077, 2006). *Science*, 313(5795), 1887.
- Ferguson, A. S., Layton, A. C., Mailloux, B. J., Culligan, P. J., Williams, D. E., Smartt, A. E., ... van Geen, A. (2012). Comparison of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in groundwater. *Science of the Total Environment*, 431, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.060>
- FitzGerald, D. M., & Pendleton, E. (2018). Inlet Formation and Evolution of the Sediment Bypassing System: New Inlet, Cape Cod, Massachusetts. *Journal of Coastal Research*, 36(36), 290–299. <https://doi.org/10.2112/1551-5036-36.sp1.290>
- Fong, T.-T., & Lipp, E. K. (2014). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments : Health Risks , Detection , and Potential Water Quality

... Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments : Health Risks , Detection , and Potential Water Quality, 69(March), 357–371.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357>

Ford, D. (2007). *Speleogenesis: The development of cave systems*. *Karst Hydrogeology and Geomorphology*. <https://doi.org/10.1002/9781118684986>

Ford, D., & Williams, P. D. (2013). *Karst hydrogeology and geomorphology*. John Wiley & Sons.

Fragoso-Servon;, & Corona. (2014). El karst de la porción este de la Península de Yucatán, (June). <https://doi.org/10.13140/2.1.5098.5280>

Fragoso-servón, P., Bautista, F., & Frausto, O. (2014). Caracterización de las depresiones kársticas (forma , tamaño y densidad) a escala 1 : 50 , 000 y sus tipos de inundación en el Estado de Quintana Roo , México, 127–137.

Futch, J. C., Griffin, D. W., & Lipp, E. K. (2010). Human enteric viruses in groundwater indicate offshore transport of human sewage to coral reefs of the Upper Florida Keys. *Environmental Microbiology*, 12(4), 964–974.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02141.x>

Goldscheider, N., & Goldscheider, N. (2014). Karst groundwater vulnerability mapping : Application of a new method in the Swabian Karst groundwater vulnerability mapping : application of a new method in the Swabian Alb , Germany, (August 2005). <https://doi.org/10.1007/s10040-003-0291-3>

González-Gómez, W. S., Quintana, P., May-Pat, A., Avilés, F., May-Crespo, J., & Alvarado-Gil, J. J. (2015). Thermal effects on the physical properties of limestones from the Yucatan Peninsula. *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences*, 75, 182-189.

Hamza, I. A., Jurzik, L., Überla, K., & Wilhelm, M. (2011). Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. *Water Research*, 45(3), 1358–1368.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.021>

- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., & Ohgaki, S. (2007). Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2153–2159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03453.x>
- Haramoto, Eiji, Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J. R., Masago, Y., Sano, D., & Katayama, H. (2018). A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Research*, *135*, 168–186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.004>
- Haramoto, Eiji, Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., & Akiba, M. (2013). Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus in Drinking Water Sources in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(23), 7413–7418. <https://doi.org/10.1128/aem.02354-13>
- Hernández-Terrones, L. M., Null, K. A., Ortega-Camacho, D., & Paytan, A. (2015). Water quality assessment in the Mexican Caribbean: Impacts on the coastal ecosystem. *Continental Shelf Research*, *102*, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2015.04.015>
- Hernández-Terrones, L., Rebolledo-Vieyra, M., & Merino-Ibarra, M. (2011). Groundwater Pollution in a Karstic Region (NE Yucatan): Baseline Nutrient Content and Flux to Coastal Ecosystems, 517–528. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0664-x>
- Jiang, S., Noble, R., & Chu, W. (2001). Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(1), 179–184. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.179-184.2001>
- Jofre, J. (2009). Is the replication of somatic coliphages in water environments significant? *Journal of Applied Microbiology*, *106*(4), 1059–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03957.x>

- Jofre, Juan, Lucena, F., Blanch, A. R., & Muniesa, M. (2016). Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water (Switzerland)*, 8(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/w8050199>
- Kennish, M. J. (2015). Coastal lagoons. *Earthquake Disturbances*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/281347241_Coastal_Lagoons
- Kitajima, M., Iker, B. C., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2014). Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes - Identification of potential viral indicators. *Science of the Total Environment*, 488–489(1), 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.087>
- Kitajima, M., Sassi, H. P., & Torrey, J. R. (2018). Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *Npj Clean Water*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0019-5>
- Kocwa-Haluch, R. (2001). Waterborne Enteroviruses as a Hazard for Human Health. *Polish Journal of Environmental Studies*, 10(6), 485–487.
- Kuo, D. H. W., Simmons, F. J., Blair, S., Hart, E., Rose, J. B., & Xagorarakis, I. (2010). Assessment of human adenovirus removal in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water Research*, 44(5), 1520–1530. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.039>
- Leal-Bautista, Morgan, C., Gahala, A., Lenczewski, M., Ma., R., & McLain, J. E. (2013). Assessing Fecal Contamination in Groundwater from the Tulum Region, Quintana Roo, Mexico. *Journal of Environmental Protection*, 04(11), 1272–1279. <https://doi.org/10.4236/jep.2013.411148>
- Leatherman, S. P. (1979). Migration of Assateague Island, Maryland, by inlet and overwash processes, (1968), 104–107.
- Lin, J., & Ganesh, A. (2013). Water quality indicators: Bacteria, coliphages, enteric viruses. *International Journal of Environmental Health Research*, 23(6), 484–506. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.769201>

- Love, D. C., Silverman, A., & Nelson, K. L. (2010). Human virus and bacteriophage inactivation in clear water by simulated sunlight compared to bacteriophage inactivation at a Southern California beach. *Environmental Science and Technology*, 44(18), 6965–6970. <https://doi.org/10.1021/es1001924>
- Machiwal, D., Jha, M. K., Singh, V. P., & Mohan, C. (2018). Assessment and mapping of groundwater vulnerability to pollution: Current status and challenges. *Earth-Science Reviews*, 185(September 2017), 901–927. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2018.08.009>
- Muñoz-Cortez, C. (2018). Detección de colifagos y virus entéricos en descargas de agua subterránea en la zona costera de Akumal. *Centro de Investigación Científica de Yucatán*.
- Null, K. A., Knee, K. L., Crook, E. D., de Sienes, N. R., Rebolledo-Vieyra, M., Hernández-Terrones, L., & Paytan, A. (2014). Composition and fluxes of submarine groundwater along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula. *Continental Shelf Research*, 77, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2014.01.011>
- Null, K. A., Knee, K. L., Crook, E. D., Sienes, N. R. De, Rebolledo-vieyra, M., Hernández-terrones, L., & Paytan, A. (2014). Composition and fluxes of submarine groundwater along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula. *Continental Shelf Research*, 77, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2014.01.011>
- Pérez-Ceballos, R., Pacheco-Ávila, J., Euán-Ávila, J. I., & Hernández-Arana, H. (2012). Regionalization based on water chemistry and physicochemical traits in the ring of Cenotes, Yucatan, Mexico. *Journal of Cave and Karst Studies*, 74(1), 90–102. <https://doi.org/10.4311/2011es0222>
- Pérez, L., Bugja, R., Lorenschat, J., Brenner, M., Curtis, J., Hoelzmann, P., ... Schwalb, A. (2011). Aquatic ecosystems of the Yucatán Peninsula (Mexico), Belize, and Guatemala. *Hydrobiologia*, 661(1), 407–433.

<https://doi.org/10.1007/s10750-010-0552-9>

- Reay, W. G., Gallagher, D. L., & Simmons, G. M. (1993). GROUNDWATER DISCHARGE AND ITS IMPACT ON SURFACE WATER Nonpoint source nutrient loadings to the, 28(6).
- Reed, T. M., Fryar, A. E., Brion, G. M., & Ward, J. W. (2011). Differences in pathogen indicators between proximal urban and rural karst springs, Central Kentucky, USA. *Environmental Earth Sciences*, 64(1), 47–55.
<https://doi.org/10.1007/s12665-010-0816-8>
- Rezaeinejad, S., Vergara, G. G. R. V, Woo, C. H., Lim, T. T., Sobsey, M. D., & Gin, K. Y. H. (2014). Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment. *Water Research*, 58, 122–131.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.051>
- Rosario, K., Symonds, E. M., Sinigalliano, C., Stewart, J., & Breitbart, M. (2009). Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7261–7267.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00410-09>
- Rosiles-González, G., Ávila-Torres, G., Moreno-Valenzuela, O. A., Acosta-González, G., Leal-Bautista, R. M., Grimaldo-Hernández, C. D., ... Hernández-Zepeda, C. (2017). Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) in Groundwater from a Karst Aquifer System in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Food and Environmental Virology*, 9(4), 487–497.
<https://doi.org/10.1007/s12560-017-9309-1>
- Rosiles-Gonzalez, G, Avila-Torres, G., Hernandez-Flores C., Moreno-Valenzuela, O. A., Acosta-Gonzalez, G., Brown, J., Chaidez-Quiroz, C., Betancourt, W., Gerba, C., Hernandez-Zepeda. C (2019). Norovirus and Human Adenovirus occurrence and diversity in recreacional water from a karst aquifer in the Yucatan Peninsula, Mexico. En revisión.

- Schmitter-Soto. (2002). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico), 215–228.
- Sidhu, J. P.S., Sena, K., Hodgers, L., Palmer, A., & Toze, S. (2018). Comparative enteric viruses and coliphage removal during wastewater treatment processes in a sub-tropical environment. *Science of the Total Environment*, 616–617, 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.265>
- Sidhu, Jatinder P.S., Ahmed, W., & Toze, S. (2013). Sensitive detection of human adenovirus from small volume of primary wastewater samples by quantitative PCR. *Journal of Virological Methods*, 187(2), 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.002>
- Sinclair, R. G., Jones, E. L., & Gerba, C. P. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1769–1780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x>
- Skraber, S., Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., & Gantzer, C. (2004). Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Research*, 38(12), 2927–2933. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.041>
- Staggemeier, R., Arantes, T., Caumo, K. S., Rott, M. B., & Spilki, F. R. (2016). Detection and quantification of human Adenovirus genomes in acanthamoeba isolated from swimming pools. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 88, 635–641. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150151>
- Symonds, E. M., Verbyla, M. E., Lukasik, J. O., Kafle, R. C., Breitbart, M., & Mihelcic, J. R. (2014). A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. *Water Research*, 65, 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.032>
- Symonds, Erin M., Rosario., Karyna Breitbart, M., & Al, E. (2019). Pepper mild mottle virus : Agricultural menace turned effective tool for microbial water

quality monitoring and assessing (waste) water treatment technologies, 1–7.

Valencia-Quintana, R., Sánchez-Aalarcón, J., Ortiz-Ortiz, E. y, & Gómez-Olivares, J. L. (2007). La contaminación de los ríos, otro punto de vista. *Revista de Ciencia y Tecnología de La UACJ*, V(1), 35–49.

Wade, T. J., Williams, A. H., Dufour, A. P., Beach, M., Brenner, K. P., Calderon, R. L., & Sams, E. (2005). Rapidly Measured Indicators of Recreational Water Quality Are Predictive of Swimming-Associated Gastrointestinal Illness. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 24–28.
<https://doi.org/10.1289/ehp.8273>

Wiedenmann, A., Krüger, P., Dietz, K., López-Pila, J. M., Szewzyk, R., & Botzenhart, K. (2006). A randomized controlled trial assessing infectious disease risks from bathing in fresh recreational waters in relation to the concentration of *Escherichia coli*, intestinal enterococci; *Clostridium perfringens*, and somatic coliphages. *Environmental Health Perspectives*, 114(2), 228–236. <https://doi.org/10.1289/ehp.8115>

WOK Grabow. (2001). Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA*, 27(2), 251–268.
<https://doi.org/10.4314/wsa.v27i2.4999>

Zhang, Q., Han, G., Liu, M., & Liang, T. (2019). Spatial distribution and controlling factors of heavy metals in soils from Puding Karst Critical Zone Observatory, southwest China. *Environmental Earth Sciences*, 78(9), 1–13.
<https://doi.org/10.1007/s12665-019-8280-6>

Zhu, Z., Wang, J., Hu, M., & Jia, L. (2019). Geographical detection of groundwater pollution vulnerability and hazard in karst areas of Guangxi Province, China. *Environmental Pollution*, 245, 627–633.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.017>

Anexos

Anexo 1 – Reactivos utilizados para la preparación de Soluciones

TFB-1

- 200ml de agua destilada
- 0.588gr de Acetato potásico (30 mM)
- 2.42gr de RbCl (100 mM)
- 0.294gr de CaCl₂ (10 mM)
- 2 gr de MnCl₂ (50 mM)
- 30ml de Glicerol (15% v/v)
- Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M.
- Esterilizar por filtración. Almacenar en frío.

TFB-2

- 100ml de agua destilada
- 0.21gr de MOPS (10 mM)
- 1.1gr de CaCl₂ (75 mM)
- 0.121gr de RbCl 10 mM
- Glicerol 15ml
- Ajustar el pH a 6,5 con KOH.
- Esterilizar por filtración. Almacenar en frío.

Placas LB agar

- Preparar medio LB como se indicó anteriormente y añadir agar a una concentración final de 15 g/L
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
- Atemperar a 55°C y dispensar en placas de Petri, aproximadamente 30ml de medio por caja.
- Dejar enfriar y posteriormente almacenar a 4°C.

Placas de LB agar/ampicilina/X-gal

Al medio LB agar preparado previamente, en una campana de flujo laminar y con una temperatura alrededor de 55°C, se añaden por cada 100 ml:

- 1 µl/mL de Ampicilina
- 20 mg/mL de X-gal
- Mezclar y dispensar en placas de Petri
- Guardar a 4°C

Solución 1 de lisis alcalina:

- 50mM glucosa
- 25mM Tris-Cl (pH 8.0)
- 10mM EDTA (pH 8.0)
- Guardar a 4°C

Solución 2 de lisis alcalina:

- 0.2N NaOH
- 1% (w/v) SDS
- Guardar a temperatura ambiente

Solución 3 de lisis alcalina:

- 5M acetato de potasio, 60.0 mL
- Ácido acético glacial, 11.5 mL
- H₂O, 28.5 ml
- Guardar a 4°C

Anexo 2 – Secuencias analizadas para la identificación de serotipos de HAdV en las Caleta de Yal-kú

Sitio de colecta	Temporada	Etiqueta de la muestra	Serotipo	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Número de Accesoión del GenBank	País del reporte
Sitio 1	Lluvias (Ago-Sep-Jun)	>194AZAA009	HAdV F41	100%	98.27%	MK296466.1	Australia
		>194AZAA010	HAdV F41	97%	98.22%	MH289562.1	Brasil
		>194AZAA011	HAdV F40	98%	97.60%	MH289606.1	Brasil
		>194AZAA012	HAdV F41	98%	99.40%	MH289613.1	Brasil
		>194AZAA000	HAdV F41	98%	98.22%	MH289619.1	Brasil
		>194AZAA001	HAdV F41	99%	97.63%	MH289609.1	Brasil
		>194AZAA002	HAdV F41	95%	97.59%	MH289619.1	Brasil
		>194AZAA003	HAdV F41	97%	98.82%	MH289559.1	Brasil
		>1C33ZAB194	HAdV F40	97%	98.82%	MH289606.1	Brasil
		>1C33ZAB195	HAdV F40	97%	98.82%	MH289605.1	Brasil
	>194AZAA348	HAdV F40	97%	99.41%	MH289605.1	Brasil	
	Nortes (Dic-Feb)	>1C33ZAB297	HAdV F41	98%	99.41%	MK296466.1	Australia
		>1C33ZAB298	HAdV F41	98%	99.41%	MK296466.1	Australia
		>1C33ZAB299	HAdV F41	97%	97.01%	MH289599.1	Brasil
		>1C33ZAB279	HAdV F40	97%	99.41%	MH289574.1	Brasil
>1C33ZAB280		HAdV F40	97%	98.22%	MH289574.1	Brasil	
>1C33ZAB281		HAdV F40	99%	98.82%	MH289615.1	Brasil	
>1C33ZAB282		HAdV F40	97%	99.41%	MH289605.1	Brasil	
>1C33ZAB283		HAdV F40	99%	98.82%	MH289615.1	Brasil	
Secas (Mar-May)	>1C33ZAB100	HAdV F40	96%	99.40%	MH289615.1	Brasil	
	>1C33ZAB102	HAdV F40	97%	97.63%	MH289615.1	Brasil	

		>1C33ZAB198	HAdV F40	97%	98.22%	MH289615.1	Brasil
		>1C33ZAB199	HAdV F40	97%	97.63%	MH289606.1	Brasil
		>1C33ZAB249	HAdV F40	97%	99.40%	MH289584.1	Brasil
		>1C33ZAB250	HAdV F40	97%	98.22%	MH289615.1	Brasil
		>1C33ZAB251	HAdV F40	97%	97.63%	MH289615.1	Brasil
		>1C33ZAB252	HAdV F40	97%	98.80%	MH289606.1	Brasil
		>194AZAA014	HAdV F41	98%	99.41%	MK296465.1	Australia
		>194AZAA015	HAdV F41	96%	98.20%	MK296465.1	Australia
		>194AZAA016	HAdV F41	97%	99.41%	MH289552.1	Brasil
		>194AZAA017	HAdV F41	97%	98.82%	MH289599.1	Brasil
		>194AZAA018	HAdV F41	98%	98.82%	MK296465.1	Australia
	Lluvias	>22A	HAdV F40	97%	97.63%	MH289615.1	Brasil
	(Ago-Sep-	>24A	HAdV F40	96%	98.80%	MH289594.1	Brasil
	Oct-Jun)	>25A	HAdV F41	98%	97.2%	MH289609.1	Brasil
		>26A	HAdV F40	97%	100%	MH289615.1	Brasil
Sitio 2		194AZAA004	HAdV F40	97%	96.45%	MH289615.1	Brasil
		194AZAA005	HAdV F41	98%	99.41%	MH289619.1	Brasil
		194AZAA006	HAdV F40	97%	96.45%	MH289606.1	Brasil
		194AZAA007	HAdV F41	97%	99.41%	MH289609.1	Brasil
		194AZAA008	HAdV F41	97%	98.82%	MH289594.1	Brasil
		>1C33ZAB260	HAdV F40	97%	98.82%	MH289574.1	Brasil
		>1C33ZAB261	HAdV F40	95%	96.36%	MH289584.1	Brasil
	Nortes	>27A	HAdV F41	100%	98.84%	MK296465.1	Australia
	(Nov-Dic-	>28A	HAdV F41	97%	98.22%	MH289619.1	Brasil
	Feb)	>30A	HAdV F41	97%	98.22%	MH289619.1	Brasil

	>31A	HAdV F41	97%	99.41%	MH289559.1	Brasil
	>1C33ZAB274	HAdV F40	99%	98.22%	MH289615.1	Brasil
	>1C33ZAB275	HAdV F40	99%	97.63%	MH289574.1	Brasil
	>1C33ZAB276	HAdV F40	100%	97.11%	MK214287.1	Australia
	>1C33ZAB277	HAdV F40	97%	98.22%	MH289615.1	Brasil
	>1C33ZAB278	HAdV F40	98%	97.63%	MH289574.1	Brasil
	>1C33ZAB284	HAdV F40	98%	97.63%	MH289574.1	Brasil
	>1C33ZAB285	HAdV F40	97%	98.82%	MH289615.1	Brasil
	>1C33ZAB286	HAdV F40	99%	97.63%	MH289584.1	Brasil
	>1C33ZAB287	HAdV F40	100%	98.79%	MH289615.1	Brasil
	>1C33ZAB288	HAdV F40	99%	98.82%	MH289615.1	Brasil
	>1C33ZAB253	HAdV F41	96%	98.80%	MH289609.1	Brasil
	>1C33ZAB254	HAdV F41	96%	97.60%	MH289609.1	Brasil
	>1C33ZAB255	HAdV F41	100%	98.18%	MH289599.1	Brasil
Secas	>1C33ZAB256	HAdV F41	97%	98.22%	MH289619.1	Brasil
(Mar-May)	>1C33ZAB289	HAdV F40	97%	98.22%	MH289615.1	Brasil
	>1C33ZAB290	HAdV F40	96%	98.20%	MH289615.1	Brasil
	>1C33ZAB291	HAdV F40	97%	98.82%	MH289615.1	Brasil
	>194AZAA405	HAdV F40	97%	97.60%	MH289615.1	Brasil