



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias del Agua

**Detección y cuantificación de coliformes, colífagos
y adenovirus en el sistema acuífero del norte del
estado de Quintana Roo**

Tesis que presenta:

Biól. Gerardo Ávila Torres

En opción al título de
**MAESTRO EN CIENCIAS
DEL AGUA**

Cancún, Quintana Roo, México 2017

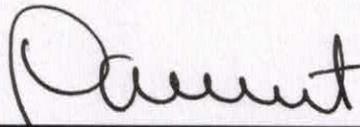
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Gerardo Ávila Torres** titulado **“DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES, COLÍFAGOS Y ADENOVIRUS EN EL SISTEMA ACUÍFERO DEL NORTE DEL ESTADO DE QUINTANA ROO”** fue realizado en la Unidad de Ciencias del Agua, en la línea de Ecología y Dinámica de Ecosistemas Acuáticos, en el laboratorio de Biología Molecular, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Cecilia Hernández Zepeda, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias del Agua de este Centro.

Atentamente.



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 23 de mayo de 2017

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, éstos 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: Gerardo Ávila Torres

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Dra. Cecilia Hernández Zepeda, Directora de la presente tesis por su dirección formativa y alentadora, a la M.C. Gabriela Rosiles González, Técnica de Laboratorio por sus enseñanzas y amistad, al Dr. Óscar A. Moreno Valenzuela miembro del Comité tutorial por su profesionalismo y ayuda desinteresada, a la Dra. Judith K. Brown, miembro del Comité tutorial por ser mi profesora y mostrarme el lado divertido de los virus, a la Dra. Luisa A. López Ochoa, miembro del Comité tutorial por sus consejos a distancia y al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, miembro del Comité revisor de tesis por su interés en el proyecto.

Dra. Rosa Ma. Leal Bautista, Directora de la UCIA CICY, a la M.C. Cinthya Grimaldo Hernández, Técnica de laboratorio, al Dr. Gilberto Acosta González, Investigador de Cátedras y al Dr. Mario Rebolledo Vieyra, Investigador titular, gracias a todos ustedes por su apoyo y asesoría en temas de su especialidad.

A la planta de Académicos de la Unidad de Ciencias del Agua, gracias por compartir sus conocimientos.

Gracias a César, Ma del Pilar, Myrna, Tonatiuh, Nazario y a los compañeros de todas las generaciones por integrarme a su equipo, brindarme su amistad incondicionalmente.

A los profesionales de la Unidad de Ciencias del Agua gracias por su apoyo en la gestión administrativa.

Gracias al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. y a la Unidad de Ciencias del Agua.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca de Maestría otorgada Núm. de apoyo 404910. Al proyecto de desarrollo científico para atender problemas nacionales del CONACYT PDCPN2013-01, dentro del cual se suscribe la presente tesis, con clave 216093, denominado “Detección de virus entéricos presentes en cuerpos de agua de uso recreativo del acuífero noreste de la Península de Yucatán: Evaluación del riesgo potencial para la salud”.

DEDICATORIA

A mi esposa Verónica quien con su amor incondicional y valores me alienta para alcanzar mis aspiraciones.

A Ximena por ser una hija ejemplar, es quien me anima a seguir mis sueños.

A Rocío y David quienes comparten su tiempo y enriquecen mi vida con su compañía consejos y cariño.

A los que no están y tengo presentes recordando con cariño sus enseñanzas y compañía.

A la Dra Cecilia Hernández por su guía que me permitió encausar mis esfuerzos a lograr la culminación de este proyecto, gracias a su paciente instrucción, apoyo y motivación.

MC Gabriela Rosiles por su presencia oportuna cuando y donde requería soporte, comprensión o entusiasmo para avanzar hasta el término de este estudio.

A los Profesores por compartir su tiempo y su compromiso para mejorar el desempeño en mi actividad profesional.

A mis compañeros de generación y del laboratorio de biología molecular, por todos los días que compartimos y experimentamos todo tipo de reconocimientos y satisfacciones.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
1. ANTECEDENTES	3
1.1 CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA ACUÍFERO CÁRSTICO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN	3
1.1.1 LOS CENOTES EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN	6
1.2 LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA	8
1.2.1 LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA EN LA PY	10
1.2.2 CONTAMINACIÓN DEL AGUA EN QUINTANA ROO	11
1.2.3 ENFERMEDADES INFECCIOSAS TRANSMITIDAS A TRAVÉS DEL AGUA.....	12
1.3 LA CALIDAD DEL AGUA	15
1.3.1 NORMAS OFICIALES MEXICANAS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD DEL AGUA	15
1.3.2 INDICADORES DE CALIDAD DEL AGUA	18
1.4 LOS VIRUS ENTÉRICOS EN EL AMBIENTE ACUÁTICO.....	23
1.4.1 LOS ADENOVIRUS HUMANOS (HADV)	24
1.4.2 MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS EN EL AMBIENTE ACUÁTICO.....	30
1.5 HIPÓTESIS	33
1.6 OBJETIVOS.....	33
1.6.1 OBJETIVO GENERAL	33
1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
1.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
CAPÍTULO II.	36

2.0 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, <i>E. COLI</i>, COLÍFAGOS SOMÁTICOS Y COLÍFAGOS F+ ESPECÍFICOS EN CUERPOS DE AGUA DEL NORTE DE QUINTANA ROO.....	36
2.1 INTRODUCCIÓN	36
2.2 OBJETIVOS.....	39
2.2.1 OBJETIVO GENERAL	39
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
2.3.1 ÁREA DE ESTUDIO	39
2.3.2 PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	41
2.3.3 CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y DENSIDADES DE <i>E. COLI</i>	41
2.3.4 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLÍFAGOS.....	41
2.3.5 ULTRAFILTRACIÓN.....	42
2.3.6 DETECCIÓN DE COLÍFAGOS SOMÁTICOS Y F+ ESPECÍFICOS, ENSAYO DE DOBLE CAPA ...	43
2.3.7 COMPARACIÓN ENTRE MÉTODOS DIRECTO Y EL ULTRAFILTRADO	45
2.4 RESULTADOS	45
2.4.1 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y BACTERIOLÓGICOS	45
2.4.2 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y DENSIDADES DE <i>E. COLI</i>	46
2.4.3 CUANTIFICACIÓN DIRECTA DE COLÍFAGOS SOMÁTICOS Y F+ ESPECÍFICOS.....	48
2.4.4 CUANTIFICACIÓN DE COLÍFAGOS SOMÁTICOS Y F+ ESPECÍFICOS DESPUÉS DE LA ULTRAFILTRACIÓN	50
2.4.4 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CONTEO DE COLÍFAGOS SOMÁTICOS Y F+ ESPECÍFICOS.....	53
2.5 DISCUSIÓN	57
CAPÍTULO III	61
3.0 DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS ADENOVIRUS HUMANOS (HADVS) PRESENTES EN CUERPOS DE AGUA EN EL SISTEMA ACUÍFERO DEL NORTE DE QUINTANA ROO.....	61

3.1 INTRODUCCIÓN	61
3.2 OBJETIVOS.....	63
3.2.1 OBJETIVO GENERAL	63
3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
3.3.1 ÁREA DE ESTUDIO Y COLECTA DE MUESTRAS DE AGUA.....	64
3.3.2 EXTRACCIÓN DEL ADN TOTAL	64
3.3.3 DETECCIÓN DE HAdVs POR PCR PUNTO FINAL	64
3.3.4 IDENTIFICACIÓN DE SEROTIPOS DE HAdVs	65
3.3.5 CUANTIFICACIÓN DE HAdVs POR QPCR.....	66
3.3.6 RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA	67
3.3.7 PORCENTAJE DE IDENTIDAD POR PARES	67
3.3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	67
3.4 RESULTADOS	68
3.4.1 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADENOVIRUS EN CUERPOS DE AGUA DE LA ZONA NORTE DE QUINTANA ROO.....	68
3.4.2 IDENTIFICACIÓN DE SEROTIPOS DE HAdVs	69
3.4.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO	74
3.4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	75
3.5 DISCUSIÓN	79
CAPÍTULO IV.....	83
4.0 DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	83
4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	83
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	86
4.3 PERSPECTIVAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo conceptual del sistema cárstico Pool Tunich en Quintana Roo (tomado de López Tamayo, 2015).....	3
Figura 2. Proceso de formación de los cenotes. a. Caverna abovedada cuyo techo no se ha desplomado. b. Proceso posterior en el parte del techo se ha desplomado, los restos quedan depositados en el fondo. c. La mayor parte de lo que era el techo se ha caído y la acumulación de materia modifica la estructura del fondo. d. Cenote típico de paredes verticales. e. Desgaste ulterior de las paredes y mayor acumulación de material. f. Cenote tipo aguada con las paredes muy desgastadas con un cuerpo de agua de fondo (tomado de Suárez-Morales et al., 1996).	5
Figura 3. Clasificación de las dolinas, con respecto a los mecanismos de falla del suelo y la naturaleza del material (tomado de Waltham y Fookes, 2003).	7
Figura 4. Caudal de agua residual generada y colectada (m ³ /s) a nivel nacional (tomada de "Situación del Subsector Agua Potable, Drenaje y Saneamiento", CONAGUA, 2015)...	8
Figura 5. Defunciones por diarrea en menores de cinco años de edad en México (tomado de Mota-Hernández, 2000).....	14
Figura 6. Distribución de casos nuevos de enfermedades infecciosas intestinales por año, de 2002 a 2014. Fuente: Secretaria de Salud. "Boletín Epidemiológico" (tomado de CONAGUA, 2015).	14
Figura 7. Intervención y brote de agentes etiológicos en gastroenteritis (en diferentes países principalmente Estados Unidos) (A) Agentes causales de la diarrea aguda, (B) Origen de los brotes de la diarrea aguda (basado en Hedberg, 1993; Goodgame, 2006).	24
Figura 8. Características de adenovirus. Los adenovirus tienen un tamaño de aproximadamente 90 a 100 nm y su estructura consiste en una cápside icosaédrica que está formada por tres componentes principales: hexon localizado en las caras y bordes de la cápside; base de penton ubicada en los 12 vértices cinco veces; fibras finas unidas a la base del pentón. Otros componentes secundarios: IIIa, VI, VIII y IX también están	

asociados con la cápside. En el interior de la cápside se encuentra la proteasa del virión que desempeña un papel vital en el ensamblaje del virión y del genoma de ADN de doble hebra asociado con cinco polipéptidos (proteína terminal (TP), V, VII, Mu y IVa2) (tomado de Waye y Sing, 2010).25

Figura 9. Gráfico del número de investigaciones sobre tres tipos de virus entéricos (PubMed PubReMiner en <http://hgserver2.amc.nl/cgi-bin/miner/miner2.cgi>). Los estudios sobre Adenovirus en el agua constituyen la quinta parte.....30

Figura 10. Diagrama de la estrategia experimental seguida para cumplir con los objetivos del presente trabajo.....35

Figura 11. Mapa de la zona de muestreo señalando los sitios visitados Norte de Quintana Roo. Los números y los puntos negros corresponden a los diez sitios de muestreo (mapa elaborado por la M.C. Gabriela Rosiles González).40

Figura 12. Aparato de ultrafiltración utilizado para concentrar las muestras de agua. (A) Esquema del aparato de ultrafiltración de 10 litros (Hill et al., 2005). (B) Fotografía del sistema de ultrafiltración utilizado en laboratorio (UCIA, 2016).....42

Figura 13. Concentración de coliformes totales y densidades de *E. coli*. A) Gráfica mostrando la concentración de Coliformes Totales (C Tot) y de *E. coli* (C Fec) en los 10 sitios de muestreo durante la temporada de lluvias y de secas. Los números arriba de cada barra representan la concentración absoluta en NMP/100 ml. B) Mapa mostrando la ubicación de los sitios de muestreo.....47

Figura 14. Gráficas de los resultados del muestreo de 10 sitios en el acuífero de Quintana Roo. A) Gráfica con las concentraciones de colifagos somáticos en log₁₀ PFU/100 ml para temporada de lluvias y secas; B) Gráfica con las concentraciones de colifagos F+ específicos en en log₁₀ PFU/100 ml para las temporada de lluvias y secas. En el recuadro rojo se resaltan las concentraciones más altas detectadas.49

Figura 15. Gráficas de las concentraciones obtenidas por ultrafiltración del muestreo de 10 sitios en el acuífero de Quintana Roo. A) Gráfica con las concentraciones de colifagos somáticos en log para temporada de lluvias y secas; B) Gráfica con las concentraciones

de colifagos F+ específicos en en log₁₀ PFU/100 ml para las temporada de lluvias y secas. En el recuadro rojo se resaltan las concentraciones más altas detectadas.52

Figura 16. Porcentaje de los serotipos de HAdV encontrados en el agua de los sitios muestreados en el acuífero PY en el noreste de Quintana Roo tomando en cuenta ambas temporadas.....70

Figura 17. Porcentaje de secuencias de nucleótidos similares a las secuencias previamente reportadas en Europa, Asia, África y Latinoamérica.71

Figura 18. Esquema representando el porcentaje de identidad por pares del conjunto de secuencias encontradas en los sitios de estudio en ambas temporadas.....72

Figura 19. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de Adenovirus obtenidas y secuencias de referencia del GenBank con sus respectivos números de accesoión. Los porcentajes representan los valores de Bootstrap. En el árbol: 7B = 7, LM = 8, VL= 6, MT= 10, PN= Planta Norte, TZ = Tucson, ADVR= temporada de lluvias y ADVS= temporada de secas. Los números corresponden a los números de accesoión del GenBank en las secuencias de referencia y a las etiquetas de identificación de cada muestra en el presente trabajo.....73

Listado de Abreviaturas

Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Ácido Carbónico	HCO
Ácido Ribonucleico	ARN
Adenovirus Humanos	HADVS
Agua Residual Tratada	ART
Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica	AMIMC
Asociación Mexicana de Información Médica	AMIM
Colifagos con Factor Sexual	F+ ESPECÍFICOS
Colifagos con Factor Sexual (Male)	CF+
Colifagos Somáticos	CS
Comisión Nacional del Agua	CONAGUA
Control de Enfermedades Diarreicas	CONACED
Cuenca de La Península De Yucatán	CPY
Diario Oficial de la Federación	DOF
Dirección General de Epidemiología	DGE
Enfermedades Diarreicas Agudas	EDA'S
Gobierno de Quintana Roo	GOBQROO
Gobierno de Yucatán	GOBYUC
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos	IDRE
Infecciones Respiratorias Agudas	IRA
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán	INCMNSZ
Instituto Nacional de Estadística y Geografía	INEGI
Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica	INDRE
Internal Terminal Repeat	ITR
Marca de Producto Registrada	IDEXX
Norma Mexicana	NMX
Norma Oficial Mexicana	NOM
Número Más Probable	NMP
Organización de Las Naciones Unidas	ONU
Organización Mundial de la Salud	OMS
Organización para la Salud	OPS
Península de Yucatán	PY
Pesticidas Organoclorados	OCPS
Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales	PTAR
Programa de Agua Potable y Alcantarillado	APAZU
Proteína Terminal	TP
Reacción en Cadena de la Polimerasa	PCR
Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa, Tiempo Real	qPCR
Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente	SEDUMA
Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales	SEMARNAT
Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud	SPPS
Secretaría de Salud	SS
Sistema Acuífero Cárstico	SAC

Ultravioleta	UV
Unidad Formadora de Colonias	UFC
Unidad Formadora de Placa	UFP
United Nations Children's Fund	UNICEF
United States Environmental Protection Agency	USEPA
World Health Organization	WHO

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Lista de Normativas para determinar la calidad del agua de diferentes usos en México.	16
Cuadro 2. Supervivencia en días de patógenos e indicadores en diferentes medios ambientales, (tomado de Carr, 2001).	22
Cuadro 3. Lista de especies y serotipos de HAdVs y las enfermedades que provocan (Basado en Mitchell et al., 2000; Kojaoghlanian et al., 2003; Lewis et al., 2009; Romero et al., 2010).	26
Cuadro 4. Concentraciones de Adenovirus encontradas en diferentes cuerpos de agua en Japón (basado en información de Haramoto et al., 2005).	29
Cuadro 5. Ventajas y desventajas de los tipos de filtros para recuperación de virus en el agua (tomado de Cashdollar et al., 2013).	31
Cuadro 6. Concentración promedio de colifagos en Unidades formadoras de placa por 100 ml (UFP/100ml) detectados en agua superficial (tomado y modificado de Jofre et al., 2016).	37
Cuadro 7. Porcentaje de muestras positivas para colifagos presentes en el agua subterránea (tomado de Jofre et al., 2016).	38
Cuadro 8. Elementos que se combinaron para crear la capa superior del ensayo de doble capa para la replicación de colifagos.	44
Cuadro 9. Valores mínimos y máximos obtenidos de los diferentes parámetros fisicoquímicos en los 10 sitios de colecta que comprenden agua dulce y agua salobre....	46
Cuadro 10. La presencia o ausencia de colifagos somáticos y colifagos F+ específicos durante la temporada de lluvias y la temporada de secas en cada uno de los diez sitios de muestro.	53
Cuadro 11. Concentración en magnitudes logarítmicas (cada cuadro representa una un orden de magnitud) de las UFP/100 ml encontradas en los grupos de colifagos	

reconocidos con las cepas bacterianas, para cada uno de los sitios muestreados y para cada uno de los métodos de obtención utilizados. El cuadro negro significa la temporada de lluvias y el cuadro gris la temporada de secas.	56
Cuadro 12. Brotes infecciosos de Adenovirus registrados en diferentes años y lugares (tomado de Sinclair et al., 2009).....	62
Cuadro 13. Cebadores y sonda utilizados para cuantificar HadVs de acuerdo a Heim et al., (2003).	66
Cuadro 14. Detección de adenovirus por PCR y cuantificación por qPCR de 10 sitios de muestreo durante la temporada de lluvias y de secas. ND = no detectado.	68
Cuadro 15. Número de clonas y porcentajes de identidad de nucleótidos de las secuencias de HAdVs obtenidas de los 10 sitios de muestreo durante la temporada de lluvias y de secas.	69
Cuadro 16. Resultados del análisis bidireccional de PERMANOVA para determinar si existe o no influencia de la temporada climática (lluviosa y seca), el tipo de agua (agua dulce y salobre) en los cuatro tipos de colifagos obtenidos por el conteo del Método Directo. En color rojo se resaltan los valores significativos (<p 0.05).	75
Cuadro 17. Resultados del análisis bidireccional de PERMANOVA para determinar la influencia de la época climática (lluviosa y seca) y el tipo de agua (agua dulce y salobre) en los cuatro tipos de colifagos obtenidos por ultrafiltración.....	76
Cuadro 18. Resultados del análisis bidireccional de PERMANOVA (p value) y Modelo de Regresión Múltiple (R ²) para determinar la diferencia y la correlación de los dos tipos de coliformes con los cuatro colifagos obtenidos por el método directo y los adenovirus.	77
Cuadro 19. Modelo de Regresión Múltiple para la concentración de colifagos por el método directo, coliformes y Adenovirus. Se muestra el valor de T para cada variable....	78
Cuadro 20. Comparación de presencia de Coliformes, colifagos y Adenovirus en las temporadas de lluvias y secas para cada uno de los sitios muestreados.....	79

RESUMEN

El acuífero cárstico de la Península de Yucatán es vulnerable a los efectos de la contaminación y en él se han detectado diversos contaminantes microbiológicos. Para determinar la calidad del agua se utilizan las bacterias coliformes, sin embargo, éstas no siempre reflejan la presencia de otros patógenos como los virus. El objetivo principal de este estudio es detectar, identificar y cuantificar a los Adenovirus humanos (HAdVs), a los colifagos (somáticos-CS y F + específicos- CF+) y a los Coliformes (Totales, Fecales y *E. coli*) en 10 cuerpos de agua del acuífero norte de Quintana Roo (8 de agua dulce y 2 de agua salobre). Se colectaron 100 L de agua (en 5 sitios urbanos y 5 sitios de uso recreativo), durante las temporadas de lluvias y de secas. En cada sitio se tomaron los parámetros físico-químicos y se cuantificaron los coliformes totales, las densidades de *E. coli* y los colifagos. Se utilizó el método de ultrafiltración para concentrar las partículas virales y extraer el ADN total. La detección de HAdVs se realizó mediante PCR anidado y se cuantificaron las copias del genoma por litro (CG/L) mediante qPCR. La identificación de los serotipos de HAdVs se realizó con base en el porcentaje de identidad de nucleótidos que compartieron las secuencias obtenidas, con secuencias reportadas en el GenBank. Los resultados mostraron la presencia de coliformes totales en el 100% de los sitios muestreados en ambas temporadas, con concentraciones desde 770 a más de 2,420 MPN/100 ml. Se detectaron densidades de *E. coli* en el 10% y en el 30% de los sitios en temporada de lluvias y secas, respectivamente, en concentraciones menores a 40 NMP/100 ml. En la temporada de lluvias se detectaron CS en el 90% de los sitios (de 10 a 920 UFP/100 ml) y CF+ en el 50% (de 10 a 330 UFP/100 ml). Para la temporada de secas se detectaron CS en el 70% de los sitios (de 10 a 200 UFP/100 ml) y CF+ en el 40% (de 10 a 110 UFP/100 ml). Se detectó la presencia de HAdVs en el 30% de los sitios (1.7×10^1 a 5.6×10^2 CG/L) en temporada de lluvias y en el 20% (3.8×10^2 a 9.9×10^2 CG/L) en temporada de secas. Las concentraciones mayores de HAdVs se detectaron en agua dulce de uso recreativo durante la temporada de secas. Se identificaron las especies HAdVs F 40 y 41 y la especie HAdVs A 31 con porcentajes de identidad de nucleótidos del 94 al 100%. Se determinó una correlación significativa entre la concentración de CF+ y el tipo de sitios (urbano o de uso recreativo) ($P=0.0399$) y entre temporadas climáticas ($P=0.0277$). Este trabajo reporta por primera vez la presencia de adenovirus en el acuífero norte de Quintana Roo en diferentes cuerpos de agua, lo que puede representar un riesgo para la salud de los usuarios.

ABSTRACT

The northeast aquifer of the Yucatan Peninsula supports a rapid population growth and a growing tourism industry. This karst aquifer is vulnerable to the effects of anthropogenic contamination. Coliform bacteria are commonly used to determine water quality; however; they do not always reflect the presence of other pathogens such as viruses. The main objective of this study was to detect, identify and quantify human Adenoviruses (HAdVs), Coliphages (somatic-CS and F + specific-CF +), and coliform bacteria, in 10 water bodies (8 freshwater and 2 brackish water) located in the state of Quintana Roo. A total of 100 L of water (5 urban and 5 recreational sites) were collected during the rainy and dry season. Physicochemical parameters were obtained from each site; in addition total coliforms, *E. coli* densities and coliphages were quantified. The ultrafiltration method was used to concentrate the viral particles from water samples. Concentrates were used to obtain total DNA. Detection of HAdVs was performed by nested PCR and HAdVs concentrations were determined by qPCR based on the genome copies per liter (CG/L). Identification of the HAdVs serotypes was conducted based on the percentage of nucleotide identity from each sequence compared to sequences reported at GenBank. The results showed the presence of total coliforms in 100% of the sites sampled during both seasons, with concentrations from 770 to more than 2420 MPN / 100 ml. *E. coli* densities were detected in 10% and 30% of sites during the rainy and dry seasons, respectively, at concentrations below 40 NMP / 100ml. During the rainy season CS were detected in 90% of the sites (from 10 to 920 PFU / 100 ml) and CF + in 50% of the sites (from 10 to 330 PFU / 100 ml), whereas during the dry season CS were detected 70% (10 to 200 PFU / 100 ml) and CF + in 40% (10 to 110 PFU / 100 ml) of sites. The presence of HAdVs was detected in 30% of the sites (1.7×10^1 to 5.6×10^2 CG / L) during the rainy season and in 20% (3.8×10^2 to 9.9×10^2 CG / L) of the sites during the dry season. The highest average concentrations of HAdVs were detected in recreational freshwater during the dry season. Serotype identification, showed the presence of HAdVs species F 40 and 41 and HAdVs species A 31 with nucleotide identity percentages of 94 to 100%. A significant correlation between the concentration of CF + and the type of sites (urban or recreational use) ($P = 0.0399$) and between climatic seasons ($P = 0.0277$) was determined. This work is the first to report the presence of HAdVs in different water bodies from the north aquifer system of Quintana Roo, which might represent a potential health risk.

INTRODUCCIÓN

La Península de Yucatán (PY) es una región geológicamente joven (formada al final del Terciario), está constituida por roca sedimentaria caliza que conforma un sistema acuífero cárstico, cuya permeabilidad permite una recarga del 24% de los 1,500 mm³ de precipitación anual de la zona (González-Herrera et al., 2002; INEGI, 2015). Por otro lado, Quintana Roo es uno de los últimos estados constituidos en México (Octubre de 1974) y su ciudad más importante en la zona norte es Cancún, la cual inició sus actividades turísticas en el año 1971. Desde entonces, su crecimiento económico no se ha detenido y en la actualidad viven ahí 800,000 personas y la visitan más de 5 millones de personas por año (Lagunas-Puls et al., 2016). Con el desarrollo económico y la vulnerabilidad del acuífero cárstico (Aguilar-Duarte et al., 2016), el ingreso de contaminantes de origen humano a la única fuente de agua de la zona es de gran preocupación. Diversos contaminantes pueden ingresar al agua en la PY por factores como: la disposición y manejo de aguas residuales, las entregas clandestinas de agua negra y fosas sépticas con fugas, al acarreo por filtración del fecalismo al aire libre y los lixiviados (González-Herrera y Rodríguez-Castillo, 2006). Los tipos de contaminantes que se pueden encontrar en el agua son diversos, por ejemplo, se han detectado contaminantes de uso personal, de uso doméstico, plaguicidas (Gasca et al., 2011), herbicidas, fertilizantes, fármacos, cosméticos (Metcalf et al., 2011), además de diferentes microorganismos de origen fecal humano y animal (Pacheco et al., 2000).

La demanda de agua potable en el mundo ha ido en aumento y los organismos patógenos entéricos presentes en las aguas residuales pueden contaminar los cuerpos de agua a nivel mundial, lo que es muy importante ya que impacta la salud pública (Bain et al., 2014B). Entre los diversos contaminantes del agua, se encuentran los virus, los cuales causan brotes infecciosos por el uso y el consumo de agua contaminada en la población (Bofill-Mas et al., 2013). A pesar de las mejoras en el tratamiento de aguas residuales en los países desarrollados, aún son muchos los brotes causados por virus transmitidos por agua contaminada, estos brotes ocurren aún sin haber detectado la presencia de indicadores bacterianos en el agua, por lo tanto, es necesario incluir a los virus entre los indicadores para determinar la calidad del agua (Rames et al., 2016). De todos los virus entéricos que infectan al humano, los Adenovirus (HAdVs) han sido reportados

comúnmente en el ambiente acuático en diferentes lugares en el mundo (ver Lin y Ganesh, 2013). Los HAdVs pertenecen al género Mastadenovirus y son responsables de provocar enfermedades gastrointestinales, tóxicas y respiratorias, entre otras (Okoh et al., 2010). Los HAdVs son muy persistentes y estables debido a su genoma de doble cadena de ADN (Jiang, 2006), incluso se ha reportado que pueden resistir los tratamientos de aguas residuales (Meng y Gerba, 1996) y permanecer más estables, prevalentes y viables en el medio acuático que varios de los indicadores más comunes utilizados para determinar la calidad del agua (Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2006; Haramoto et al., 2007). La presencia de los HAdVs en el ambiente acuático se considera específica de contaminación por heces humanas, ya que éstos no se encuentran en aguas residuales asociadas a granjas de animales (Bofill-Mas et al., 2005). Los HAdVs son abundantes y resistentes en el ambiente acuático, son detectados por métodos moleculares, están presentes en la población durante todo el año y son de gran impacto en la salud pública, por lo tanto, han sido propuestos como indicadores viables para determinar la calidad del agua (Silva et al., 2011).

Para determinar la calidad del agua es importante medir las concentraciones de coliformes totales y densidades de *Escherichia coli* según las normas mexicanas (NOM-127-SSA1-1994) (Novelo et al., 2016), además en muchos lugares en el mundo se utilizan los colifagos tanto somáticos como F+ específicos para determinar la calidad del agua (Jofre et al., 2016). A pesar de que los adenovirus se encuentran distribuidos en todo el mundo (Banerjee et al., 2016) y son tan persistentes en el ambiente acuático, en el estado de Quintana Roo a la fecha no existe información sobre la presencia de éstos en diferentes cuerpos de agua. El objetivo de este estudio fue realizar la detección y cuantificación de los coliformes, colifagos y Adenovirus humanos en el acuífero norte del estado de Quintana Roo.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1 CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA ACUÍFERO CÁRSTICO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

Los sistemas acuíferos cársticos (SAC) comprenden más del 15% de la superficie terrestre y proveen de agua potable a más de un cuarto de la población mundial. La Península de Yucatán (PY) alberga en su mayoría un sistema acuífero cárstico no confinado (cerca de la costa existe un acuífero confinado por una capa fina, plana, calcárea casi impermeable), constituido por un lente de agua dulce flotando sobre un cuerpo de agua salobre (Figura 1), denso que penetra varios kilómetros tierra adentro en la PY (Perry et al., 1989). El SAC de la PY es uno de los más grandes del mundo y se extiende en un área aproximada de 165, 000 km² entre México, Guatemala y Belice y mantiene una gran cantidad de ecosistemas acuáticos (Bauer-Gottwein et al., 2011).



Figura 1. Modelo conceptual del sistema cárstico Pool Tunich en Quintana Roo (tomado de López Tamayo, 2015).

En el acuífero, la formación de depósitos de agua subterráneos se recargan con aproximadamente entre el 17% y el 24% de la precipitación anual entre los 840 y 1,550 mm³/año (Gondwea et al., 2010; González-Herrera et al., 2002). La rapidez de la integración de la precipitación al lente de agua se debe a la porosidad y la permeabilidad primaria de su litología cárstica (Beddows, 2003). El acuífero es el único recurso hídrico disponible en la PY (Marín y Perry, 1994). La PY es plana y por sus características geológicas, la escorrentía del agua superficial y el drenaje vertical se ubican en las fracturas y fallas del cárstico y es de unos cuantos metros (Marín et al., 2008). El almacenamiento de agua subterránea se produce en el SAC de la PY por tres vías de flujo preferentes, de acuerdo a un rango de escalas; la primera son las zonas de fractura de escala regional (~ 10-100s de kilómetros), la segunda son grandes conductos de disolución (~ 1-10s de kilómetros) y la tercera a pequeña escala, fracturas y cavidades de disolución (~ 10s de metros). Finalmente el SAC tiene los principales sistemas de cuevas, donde el flujo de agua subterránea está dominado por conductos de flujo turbulento. La diferencia del volumen de agua entre las precipitaciones y la recarga (17% al 24%), es descargada del acuífero por medio del flujo costero (descarga natural de los acuíferos costeros), el bombeo de extracción (agua para consumo), la evapotranspiración y la evaporación (Michael et al., 2005; Bauer-Gottwein et al., 2011).

El lente de agua dulce del sistema acuífero tiene un espesor variable a lo largo de la PY. El espesor del lente de agua dulce en el Caribe, a 50 km de la costa tiene 50 metros; a 11.7 km de la costa, (en el cenote Angelita), en Quintana Roo, el espesor del lente es de 30 metros y se reduce a entre 10-15 metros a cuatro y medio kilómetro de la costa respectivamente (Beddows, 2003), mientras que en el centro de la península alcanza los 60 m (Perry et al., 2009). En uno de los puntos de descarga del Sistema de Ox Bel Ha (la caverna subacuática más grande del mundo), existe un manantial con un espesor de agua dulce de 12 metros (Le Maillot, 2001). El nivel freático en el SAC de la PY se encuentra a 2.1 metros sobre el nivel del mar a 46 km de la costa (Marín et al., 2005).

El acuífero de la zona presenta una porosidad triple porque el flujo de agua subterránea se dá a través de la matriz, las fracturas y las cavernas interconectadas que facilitan el flujo del agua (Beddows, 2003). Este flujo erosiona áreas solubles de la roca creando conductos y cuevas que a menudo resulta en un colapso total de los techos de la cueva

de la pequeña capa que queda en el suelo superficial de la tierra. Durante los últimos 2 millones de años, los techos de algunas de estas cavidades han colapsado para formar un fallo del suelo, formando depresiones de la superficie del suelo con diferentes profundidades llamadas dolinas, cenotes (Figura 2), depresiones, sumideros o sinkholes (por su término en inglés) (Schmitter-Soto et al., 2002).

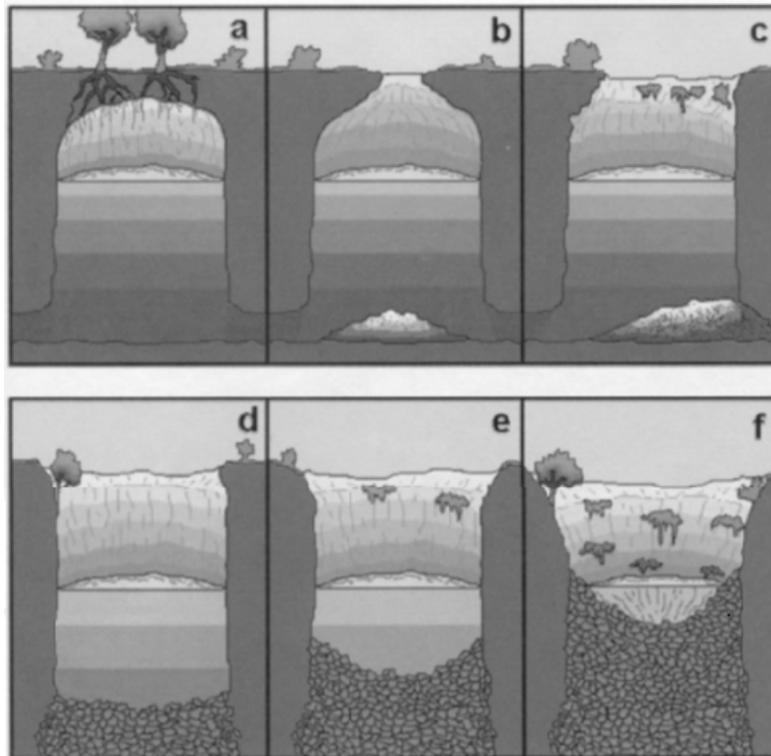


Figura 2. Proceso de formación de los cenotes. a. Caverna abovedada cuyo techo no se ha desplomado. b. Proceso posterior en el parte del techo se ha desplomado, los restos quedan depositados en el fondo. c. La mayor parte de lo que era el techo se ha caído y la acumulación de materia modifica la estructura del fondo. d. Cenote típico de paredes verticales. e. Desgaste ulterior de las paredes y mayor acumulación de material. f. Cenote tipo aguada con las paredes muy desgastadas con un cuerpo de agua de fondo (tomado de Suárez-Morales et al., 1996).

El gradiente hidráulico en la PY es muy pequeño, de 7 a 10 mm/km apuntando a una alta permeabilidad, lo que resulta en un sistema vulnerable que tradicionalmente recibe descargas domésticas, agrícolas e industriales (Marín y Perry, 1994), con contaminantes disueltos o en suspensión que afectan la calidad del agua, para los ecosistemas y las poblaciones humanas.

1.1.1 Los Cenotes en la Península de Yucatán

En el acuífero cárstico de la PY se encuentran las depresiones llamadas dolinas, sumideros, “sinkholes” llamados así por los ingenieros norteamericanos (Marín et al., 2008; Schmitter-Soto et al., 2002) o bien cenotes, del vocablo maya ts’ono’ot o d’zonot, que quiere decir “caverna con depósito de agua” (Beddows et al., 2002). En la PY no hay ríos ni arroyos superficiales, la infiltración de las aguas de lluvia satura el lecho de roca y el agua fluye a través de cavernas rocosas y/o lecho de roca porosa (Herrera-Silveira, 2006).

En la formación del relieve del cárstico se combinan tres procesos: 1) la disolución; 2) el colapso; y 3) la construcción de la caliza. Los factores intrínsecos incluyen la litología, el grado de porosidad de la matriz y la fractura de la roca; los extrínsecos, el clima, la temperatura, la vegetación, la mezcla de agua dulce y salada y el tiempo de duración de la exposición al proceso. El resultado es la disolución de rocas solubles por las condiciones hidrológicas que resultan en forma negativa al terreno (Waltham y Fookes, 2003). El resultado de los tres procesos originan dolinas de diferentes tipos, cada una con características que afectarán el flujo de agua, la composición de la biota y por tanto su vulnerabilidad a los contaminantes (Beddows et al., 2002).

Las dolinas se forman por diversos procesos. **Las dolinas de disolución** son formadas por la disolución del afloramiento calcáreo o de la roca, ayudada por el socavamiento y el colapso a pequeña escala. **Las dolinas de colapso** están formadas por un fallo instantáneo o progresivo y el colapso del techo de piedra caliza sobre una gran caverna o sobre un grupo de cuevas más pequeñas. La caliza intacta es fuerte y el colapso en gran escala de la caverna es raro. **Las dolinas de Caprock** (Techo de roca) son comparables a las dolinas de colapso, excepto que hay socavamiento y colapso de un “techo de roca” insoluble sobre una cavidad cárstica en piedra caliza subyacente.

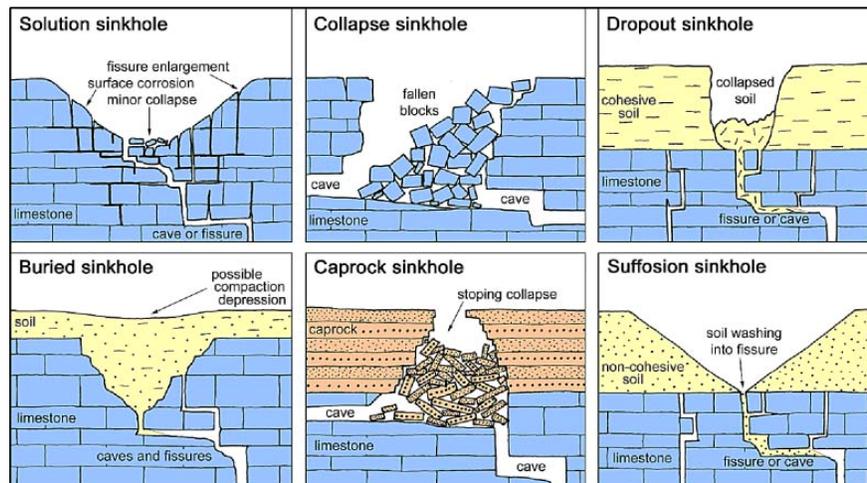


Figura 3. Clasificación de las dolinas, con respecto a los mecanismos de falla del suelo y la naturaleza del material (tomado de Waltham y Fookes, 2003).

En las dolinas de desagüe o de colapso de cubierta, la falla rápida de la superficie del suelo ocurre cuando en un hueco que se ha ido ampliando lentamente (Waltham y Fookes, 2003) (Figura 3) **Las dolinas de sufusión** (infiltración) o de hundimiento de cubierta, se forman en una cubierta de suelo no cohesiva, donde el agua de lluvia que se filtra ha lavado el suelo en fisuras y cuevas estables en la piedra caliza subyacente. Cuando el suelo se desploma y se asienta en sus capas superiores mientras que por debajo se lava en la piedra caliza subyacente. **Las dolinas enterradas** o de compactación, ocurren donde los antiguos desagües de disolución o colapso están llenos de tierra, escombros o sedimentos debido a un cambio de ambiente (Figura 3) (Waltham y Fookes, 2003).

La tipología para las dolinas es en términos morfológicos en la región y son: 1) cenotes cántaro (también llamados en maya ch'e'n), en los que la abertura al exterior es pequeña con relación al diámetro del embalse; 2) cenotes cilíndricos (propriadamente ts'onot), de paredes verticales, donde la abertura equivale al diámetro del cuerpo de agua; y 3) cenotes aguada (ak'al che'), azolvados, con contorno en forma de plato y grutas (aktun), en los que la entrada es lateral (Schmitter-Soto et al., 2002). La mayor concentración de cenotes está ubicada geográficamente en el norte y noreste de la PY y se estima que existen más de 8,000 en la PY (Bauer-Gotwein et al., 2011; Kauffer & Villanueva, 2011).

1.2 LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA

El agua es un recurso finito y actualmente es necesario reciclarlo, para ello se requiere regenerarla (Yamaguchi et al., 2011). Es por eso que el agua de origen residual es canalizada por alcantarillas y cañerías hacia las plantas de tratamiento, en donde es procesada con la intención de eliminar, entre otros contaminantes a los metales pesados, detergentes, aceites, residuos sólidos, a los patógenos virales, bacterianos, protozoarios y helmintos, por medio de mecanismos físicos o químicos como la precipitación, aireación, iluminación, cloración y desecación (Campos, 2001). El objetivo del saneamiento es sustituir agua de primer uso por agua residual tratada (ART) y así recuperar la calidad de las aguas superficiales y acuíferos. Las ART se vierten a sitios puntuales de las aguas ambientales donde cursarán las últimas barreras para su reciclaje (CONAGUA, 2015). Algunos cuerpos de agua superficiales o acuíferos son utilizados también con fines recreativos y en ocasiones pueden recibir descargas de aguas residuales tratadas, es por ello que la eficacia en los procesos de desinfección y la naturaleza prevaleciente de los patógenos determinarán el potencial de posibles brotes epidemiológicos en lugares con aguas de uso recreativo ligados a liberación de ART (Ahmed, 2016).

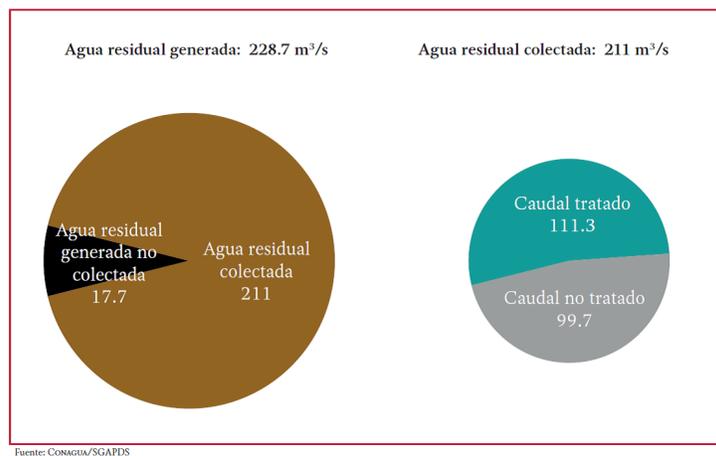


Figura 4. Caudal de agua residual generada y colectada (m^3/s) a nivel nacional (tomada de “Situación del Subsector Agua Potable, Drenaje y Saneamiento”, CONAGUA, 2015).

En muchas ocasiones, la descarga en estos sistemas contribuye a la contaminación del agua subterránea (Figura 4) (CONAGUA, 2015). En México las descargas de agua residual colectada a nivel nacional registran proporciones de caudal de agua no tratado de

99.7 (m³/s) lo que representa un 47%, el agua residual no colectada es de 17.7 (m³/s), representa un 8% (Programa de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento en Zonas Urbanas) (APAZU), por lo que si sumamos el total del agua residual no tratada con la no colectada tenemos un caudal de 117.4 m³/s que puede llegar a contaminar las aguas del ambiente equivalente al 51.3% a nivel nacional.

Los desechos humanos pueden llegar a los cuerpos de agua (Marín y Perry, 1994) no sólo por las ART, también existen diversas vías no menos importantes como por ejemplo, la existencia de fosas sépticas que no garantizan un buen funcionamiento cuyo contenido puede entrar en contacto con el cuerpo de agua (Marín et al., 2000), o los sistemas alternativos que descargan directamente al agua como letrinas, pozos negros (Marín y Perry, 1994; GobQroo, 2011), así como el acarreo e infiltración de fecalismo al aire libre originado por las lluvias (GobQroo, 2011) o las actividades agropecuarias (CONAGUA, 2015).

La presencia de patógenos en el agua potable permite la transmisión de las enfermedades con gran rapidez (Díaz, 2003), ya que suelen contagiarse por la vía fecal-oral. La magnitud de la propagación depende de la concentración del organismo patógeno y de la cantidad de excremento de humanos y animales infectados que son introducidos al agua. Entre los microorganismos patógenos se pueden considerar diversas bacterias, virus, protozoos y, en ocasiones, helmintos y hongos (Bradbury et al., 2013).

Los procesos de saneamiento de las aguas residuales están determinados por las recomendaciones internacionales de la Organización Mundial para la Salud (OMS), con directrices que asumen los países en sus controles de calidad de las aguas en sus efluentes (Armon, 2015). Las normas mexicanas para la determinación de la calidad del agua responden a las recomendaciones de saneamiento del agua para el consumo, uso y disposición para las actividades humanas (ver inciso 1.3 de éste capítulo). Las normas para el control de patógenos presentes en el agua están basadas en un indicador, la concentración de un procarionte habitante común del tracto digestivo de animales de sangre caliente, *E. coli* y de bacterias coliformes con los que comparte nicho, los géneros de la familia Enterobacteriaceae (NMX-AA-102-1987).

1.2.1 La contaminación del agua en la PY

Las crisis relacionadas con el desarrollo sostenible ocurren debido a la falta de acceso y al manejo inadecuado del agua, lo que provoca la destrucción de los ecosistemas acuáticos, la extinción de especies, la muerte de millones de personas por enfermedades relacionadas con el agua y un riesgo del aumento de conflictos regionales e internacionales por la escasez de suministros de agua compartidos (Gleick, 1998).

El acuífero de la PY es la única fuente de agua dulce para toda la región, en éste, la contaminación se ha incrementado en los últimos años como resultado de las actividades antropogénicas (Bauer-Gottwein et al., 2011). Desde finales de los 90's se han reportado diversos contaminantes del sistema acuífero de la PY. Cerca de la ciudad de Mérida se detectaron compuestos orgánicos disueltos (Borges et al., 1997), además de altas concentraciones de nitratos en diversos pozos al norte de la ciudad (Pacheco et al., 1997) y concentraciones de coliformes totales y fecales, así como otras bacterias de los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pectobacterium*, *Serratia*, *Proteus* y *Providencia* en el área rural de la ciudad de Mérida (Pacheco et al., 2000; Novelo et al., 2016). En la zona llamada "anillo de cenotes" en Yucatán, se han detectado esteroides fecales (Arcega-Cabrera et al., 2014) y pesticidas organocolorados (Polanco et al., 2015). En las costas del estado de Quintana Roo (Caribe mexicano) cerca de los asentamientos de Tulum y Puerto Aventuras, se han detectado diversos fármacos (como acetaminofén e ibuprofeno), productos de cuidado personal (como triclosán) e hidrocarburos policíclicos aromáticos, además de diversos herbicidas (Metcalf et al., 2011). En la zona de la costa del Caribe cerca de Puerto Morelos, se han identificado altas concentraciones de nutrientes como fósforo orgánico, nitrógeno orgánico, además de coliformes fecales, *Vibrio spp* y cafeína (Hernández-Terrones et al., 2011; Leal-Bautista et al., 2011). En la zona de Akumal se han detectado altos contenidos de nutrientes y de bacterias como *Enterococci* y de *E. coli* (Hernández-Terrones et al., 2015). La contaminación por fecalismo afecta la calidad del agua no sólo la de consumo también la destinada a la recreación. La falta de cuidado en la calidad del agua recreativa se puede convertir en un importante agente de infecciones que afecte a gran número de personas y diversas actividades económicas (Collado, 2008).

Los esfuerzos de las administraciones Municipal y Estatal para mantener la integridad del sistema acuífero y alcanzar la cobertura total en el alcantarillado así como el tratamiento de aguas residuales en la PY no ha sido suficiente. Yucatán y Campeche son los estados con menor cobertura de tratamiento de aguas residuales; 4.2% y 6.6% respectivamente (CONAGUA, 2015). El acuífero sigue siendo susceptible de ser contaminado con sustancias y materia fecal de origen humano, debido a las características orográficas, líticas, climáticas y la presencia de áreas urbanas de gran extensión y rápido crecimiento (Pacheco y Cabrera, 1997). Debido a lo anterior, el riesgo del surgimiento de brotes de enfermedades infecciosas es latente (Marín et al., 2000; Skraber et al., 2005). La región presenta la necesidad de una gestión integral del agua de la Cuenca de la Península de Yucatán (CPY), que debe enfocarse en el sistema cárstico y en la problemática de contaminación, lo que constituye un reto en la actualidad (Kauffer y Villanueva, 2011).

1.2.2 Contaminación del agua en Quintana Roo

La actividad turística de México tiene una participación del 8.7% del PIB nacional al año, del cual el Estado de Quintana Roo participa con el 11.5% (INEGI, 2014). La zona norte del estado, en particular el municipio de Benito Juárez, recibió en el 2013 el 56.6% del ingreso estatal de turismo (INEGI, 2014). La economía del Estado depende principalmente de la actividad turística, que promueve la visita de más de 5 millones de turistas al año para el municipio de Benito Juárez. El consumo de los visitantes con relación a la población local en electricidad los supera 3 a 1 y de los recursos ambientales (en agua) 6.5 a 1 (INEGI, 2015a). El INEGI reporta un total 6.020 millones de visitantes a la ciudad de Cancún en 2014 (INEGI, 2015), teniendo como una de las principales actividades la recreación acuática en el mar y en las dolinas (Moncada, 2011).

La Encuesta Intercensal del 2015 reporta un total de 1.5 millones de pobladores con una tasa de crecimiento anual promedio del 2010 al 2015 del 2.7% (INEGI, 2015a). Para el 2015, en el municipio de Benito Juárez se concentra el 49.5% del total de habitantes del estado (INEGI, 2015a). La alta tasa de crecimiento poblacional en Quintana Roo provoca un mayor uso del recurso hídrico, lo que incrementa la contaminación del acuífero (CONAGUA, 2012). En el Estado de Quintana Roo la cobertura estatal de agua potable es de alrededor del 97%, una cifra que está por encima de la media nacional y la cobertura

del servicio de drenaje y saneamiento es de aproximadamente un 91% en zonas totalmente urbanizadas (CONAGUA, 2015). Del porcentaje de cobertura, se estima que se aprovecha el 70% de la infraestructura existente, esta consiste en 33 plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), que operan con estándares apegados a las normas mexicanas (“Programa de desarrollo institucional de infraestructura hidráulica y sanitaria 2011-2016”, GobQRoo).

En ausencia de ríos superficiales donde se descargan las aguas residuales tratadas o no tratadas en Quintana Roo, éstas son reinyectadas en el acuífero o utilizadas para riego en jardines o campos de golf, como parte de los servicios de la zona turística (Beddows et al., 2005; Krekeler et al., 2007). El 95% de la descarga del agua residual tratada es reciclada para áreas públicas y campos de golf (excepto el municipio de Solidaridad, con sólo el 19.3% de agua reciclada) (GobQroo, 2011). Se cuenta con alcantarillado en un 91% en las zonas con servicio, pero existe un 9% de la población sin servicios (CONAGUA, 2015). De acuerdo a GobQroo (2011), la construcción de infraestructura para canalizar las aguas residuales a las plantas de tratamiento son insuficientes porque los pronósticos de crecimiento poblacional son rebasados en todas las ciudades. La Ciudad de Cancún tiene un estimado de 140, 000 viviendas ubicadas en sitios irregulares sin servicios urbanos, (como en otras ciudades del Estado), donde hacen uso de sistemas alternativos como letrinas, pozos negros o fosas séptica mal diseñadas (FONATUR, 2014).

La contaminación del agua en el estado es, por lo tanto, originada por diversos factores, como el crecimiento poblacional y de la industria turística, el uso inadecuado de los sistemas sépticos, la descarga inapropiada de aguas residuales o de drenaje directamente en el acuífero y la práctica de fecalismo al aire libre, entre otros factores. Por lo tanto, es importante mantener un constante monitoreo de la calidad del agua y de los contaminantes presentes en el acuífero (Foster et al., 2002).

1.2.3 Enfermedades infecciosas transmitidas a través del agua

A nivel mundial, la contaminación del agua origina la muerte de 2 millones de personas al año (la gran mayoría niños menores de 5 años), muertes que están relacionadas con la

insalubridad del agua, el saneamiento y la higiene (Bofill-Mas et al., 2005) y a las prácticas inadecuadas de eliminación de las heces (Prüss-Üstün et al., 2008).

De acuerdo a las Guías para la Calidad del Agua Potable de la OMS (2017), se han clasificado en cuatro categorías a 29 patógenos que se transmiten a través del agua; 19 bacterias, 8 virus, 11 protozoarios y 4 helmintos y oficialmente sólo se propone a las bacterias coliformes como indicadores de calidad (Basulto, 2015). En países como Estados Unidos se lleva un registro de las enfermedades gastrointestinales, en donde se disgrega la información por el tipo de agente infeccioso y el total de enfermedades causadas. En el caso de las enfermedades gastrointestinales causadas por alimentos contaminados, se estima que los virus son los agentes causales en el 80% de los casos (Collado, 2008).

La situación de las enfermedades diarreicas provocadas por agentes patógenos sufrió un incremento en la primera década del siglo XXI. A pesar de la importante disminución del número de muertes causadas por diarrea en niños en México, provocadas por bacterias, virus y otros organismos, se considera que el registro de más de 3,000 fallecimientos por año, en un país de alrededor de 100 millones de habitantes, representa un número inaceptable; la mayoría de ellas se pueden prevenir con la mejoría de las condiciones sanitarias y del manejo efectivo de casos (Mota-Hernández, 2000). Para controlar la elevada morbilidad y mortalidad causada por estas enfermedades es necesario mejorar la calidad de vida de la población mediante el suministro de agua potable, drenaje, y los servicios básicos que hacen falta, sobre todo en comunidades rurales (Campos, 2001).

Antes del inicio del Programa Nacional de Hidratación Oral y Control de Enfermedades Diarreicas en 1984, se reportaron alrededor de 26,000 muertes anuales en México. Posteriormente, se disminuyó el número de decesos en tres etapas, la primera al inicio del programa “Vida suero oral”, la segunda relacionada con la capacitación clínica del personal de salud de todas las entidades federativas de México y la tercera atribuida a la creación del Consejo Nacional para el Control de las Enfermedades Diarreicas con la entrada del cólera al país y la puesta en marcha del programa “Agua Limpia” (Mota-Hernández, 2000) (Figura 5).

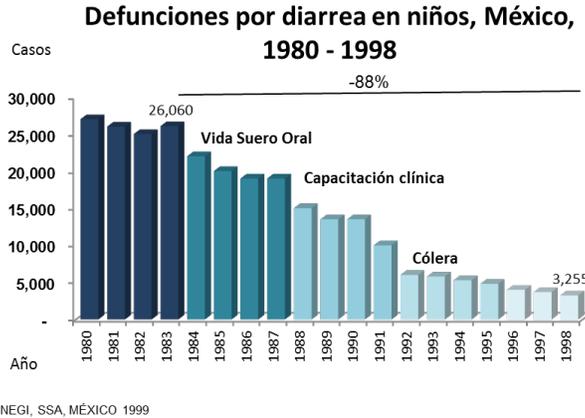


Figura 5. Defunciones por diarrea en menores de cinco años de edad en México (tomado de Mota-Hernández, 2000).

Es difícil conocer qué porcentaje de enfermedades gastrointestinales de presunto origen infeccioso corresponde a enfermedades transmitidas por virus, debido a que generalmente no se identifica al agente causal (SINAVE, 2013). Durante el 2008 la morbilidad por diarrea se mantuvo en todo el país por arriba de los parámetros reportados en el año 2000 (Figura 6). Los últimos tres años reportados cambian la tendencia, al reducir los casos registrados para infecciones del aparato digestivo en la República. Por el contrario, en el segmento de las diarreas provocadas por virus y otros organismos y las catalogadas como mal definidas presentaron un incremento todos los años, elevándose hasta el 2014, representando el 90% en los registros epidemiológicos (Figura 6).

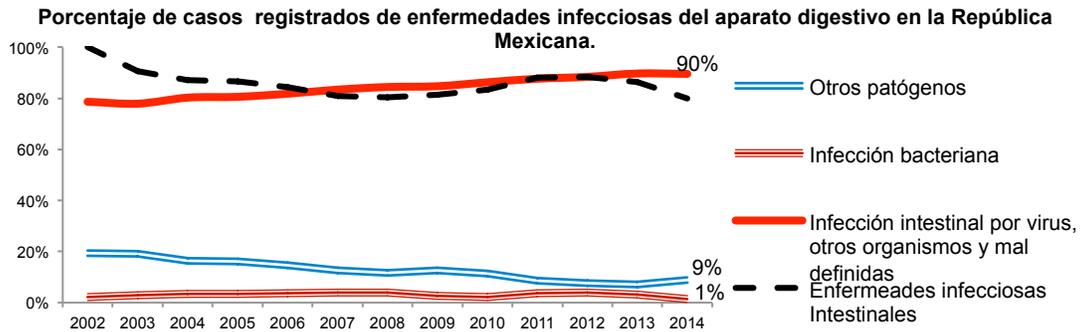


Figura 6. Distribución de casos nuevos de enfermedades infecciosas intestinales por año, de 2002 a 2014. Fuente: Secretaria de Salud. "Boletín Epidemiológico" (tomado de CONAGUA, 2015).

Las enfermedades gastrointestinales más comunes en México causadas por virus son: gastroenteritis aguda causada por los rotavirus, norovirus, los sapovirus que infectan a infantes y personas mayores; producen brotes epidémicos de gastroenteritis, casos de diarreas en niños menores de tres años, pacientes inmunodeprimidos y con trasplante de médula ósea (Hernández et al., 2011).

1.3 LA CALIDAD DEL AGUA

1.3.1 Normas oficiales mexicanas para el control de la calidad del agua

Las normas de control de calidad para la descarga de las aguas residuales en aguas nacionales son emitidas por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y exigen en las mismas una serie de técnicas que deben seguirse para comprobar la carga de contaminantes en las aguas. Las mediciones básicas para determinar la calidad del agua son: sólidos sedimentables, grasas y aceites, materia flotante, nitrógeno, total demanda bioquímica de oxígeno, fósforo total, sólidos disueltos, coliformes totales y fecales, arsénico, metales, plomo, cianuros, cadmio, mercurio, cobre, zinc, nitrógeno de nitratos y de nitritos (NOM-001-ECOL-1996 (06/01/1997)). Las normas de calidad del agua establecen los parámetros que se deben seguir sobre la presencia de contaminantes patógenos, en las aguas residuales para su descarga y reutilización. Considerando que el cuidado de los cuerpos de agua es la única forma de tener un recurso renovable, las normas mexicanas constituyen los parámetros para mantener la calidad del agua en su naturaleza química, física, organoléptica y biológica (Cuadro 1).

La NOM-001-ECOL-1996 (06/01/1997) describe a los contaminantes patógenos y parasitarios como, “aquellos microorganismos, quistes y huevos de parásitos que pueden estar presentes en las aguas residuales y que representan un riesgo a la salud humana, flora o fauna”. En lo que corresponde a esta Norma Oficial Mexicana, se consideran “los coliformes fecales y los huevos de helminto” y agrega en su inciso 4.2 que “el límite máximo permisible para las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, así como las descargas vertidas al suelo (uso en riego agrícola) es de 1,000 y 2,000 como número más probable (NMP) de coliformes fecales por cada 100 ml para el

promedio mensual (ponderado en función del caudal) y diario (media geométrica de las muestras del día), respectivamente” (Cuadro 1).

Cuadro 1. Lista de Normativas para determinar la calidad del agua de diferentes usos en México.

<i>Dependencia</i>	<i>Clave de la Norma</i>	<i>Nombre de la Norma</i>	<i>Campo de aplicación</i>	<i>Indicador. Coliformes</i>	<i>Límite máximo permisible</i>
SEMARNAT	NOM-001-SEMARNAT-1996	Los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.	Descargas de aguas residuales	Fecales	1,000 y 2,000 NMP/100ml en promedio mensual y diario, respectivamente
SEMARNAT	NOM-003-SEMARNAT-1997	Límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público	Descargas de aguas tratadas	Fecales	Servicios al público con contacto directo: 240 NMP/100ml Servicios al público con contacto indirecto u ocasional: 1,000 NMP/100ml Prom Men
CONAGUA	NOM-015-CONAGUA-2007	Infiltración artificial de agua a los acuíferos.- Características y especificaciones de las obras y del agua.	Infiltración de aguas pluviales y escurrimientos superficiales al suelo y subsuelo en obras	Fecales	No detectable NMP/100ml
Secretaría de Salud	NOM-127-SSA1-1994	Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.	Agua potable de uso y consumo humano	Totales y Fecales	Coliformes totales 2 NMP/100ml Coliformes fecales 0 NMP/100ml
Secretaría de Salud	NOM-245-SSA1-2010	Requisitos sanitarios y calidad de agua que deben cumplir las albercas	Albercas, clubes deportivos, balnearios, centros de enseñanza, hoteles, desarrollos turísticos, parques acuáticos o cualquiera de preste un servicio público	Fecales	<40 NMP/100ml
Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología	CE-CCA-001789	Criterios Ecológicos de Calidad del Agua	Actividades recreativas con contacto primario	Fecales	<200 NMP/100ml en agua dulce o marina, y no más del 10% de las muestras mensuales deberá exceder de 400 NMP/100ml

La NOM-014-CONAGUA-2003. Para la recarga artificial en acuíferos, se debe de cumplir con la remoción o inactivación de microorganismos entero-patógenos. Los límites permisibles de acuerdo a contaminantes regulados (NOM-127-SSA1-1994) son: para superficiales y sub-superficiales, Coliformes fecales 2 NMP/100 ml y para recarga Directa No detectables, cero NMP/100 ml (Cuadro 1).

La NOM-003-SEMARNAT-1997. Por ser aguas residuales tratadas de reciclaje, se considera como límite máximo permisible de organismos coliformes fecales, para servicio público con contacto indirecto u ocasional 1, 000 NMP/100 ml y para servicios públicos con contacto directo 240 NMP/100 ml como los indicadores de calidad del agua.

Los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua CE.CCA.001189, presentados por la Secretaria de Desarrollo Urbano y Ecología del Estado (SEDUE), establecen que el agua reutilizada y el agua para uso recreativo deben cumplir con normas de calidad del agua de acuerdo a su uso y tomando en cuenta la presencia de vida acuática, deben reunir condiciones que aseguren la protección de la vida de agua dulce o de agua marina (Cuadro 1).

Los criterios ecológicos de calidad del agua establecen que la calidad para uso recreativo con contacto primario que garantiza la protección de la salud humana es: “Los organismos no deben exceder de 200 como número más probable en 100 mililitros (NMP/100 ml) en agua dulce o marina, y no más del 0% de las muestras mensuales deberá exceder de 400 NMP/100 ml (Coliformes fecales en agua dulce y Enterococos en agua marina)”. La evaluación de las normas de la contaminación microbiana para la recarga o cuidado del acuífero está basada en la presencia de bacterias coliformes y de *E. coli* como el principal indicador para comprobar la calidad del agua, mientras que en el agua marina los indicadores son los Enterococos.

La norma Mexicana nom-127-ssa1-1994 modificada en 2000 establece, “los límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización para las bacterias Coliformes totales y Coliformes fecales, es ausencia o no detectable”. Su detección se hace por el mismo método del número más probable (NMP) “Colilert”, la filtración por membrana y/o técnicas en agares selectivos (<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>).

Ninguna de las normas mexicanas considera la presencia de los virus entéricos. Es importante mencionar que hoy en día se discute en todo el mundo la idoneidad del uso de las bacterias coliformes como indicadores de calidad del agua. En Europa se hacen investigaciones conjuntas con laboratorios de diferentes países para proponer el uso de los Adenovirus como indicadores de contaminación fecal humana (Bofill-mas et al., 2010)

y en Estados Unidos, la USEPA lleva a cabo la evaluación de los colifagos como posibles indicadores virales para la calidad del agua (<https://www.epa.gov/wqc/microbial-pathogenrecreational-water-quality-criteria#Review of Coliphages>).

1.3.2 Indicadores de calidad del agua

Los programas para dar seguimiento a la calidad del agua están basados en el uso de indicadores. El objetivo del uso de un indicador para evaluar la calidad del agua es identificar los indicios de contaminación fecal y cubrir la necesidad de conocer el estado de pureza del agua (Berg et al., 1978B). Las propiedades particulares que debe tener un indicador eficiente para determinar la calidad del agua son los siguientes de acuerdo a Grabow, (1996):

- a. Presente en alta densidad en las heces humanas y en animales de sangre caliente
- b. Ser fácilmente detectado por métodos simples
- c. No estar presente en aguas naturales, medio ambiente o distribución de agua
- d. Ser persistente en agua
- e. Tener una sensibilidad al tratamiento de agua comparable a los patógenos entéricos

Existen tres tipos de indicadores: 1) Indicador de proceso. Organismos que demuestran la eficacia de un proceso, tales como bacterias heterótrofas totales o coliformes totales para la desinfección con cloro; 2) Indicadoras de contaminación fecal. Organismos que indican la presencia de contaminación fecal, como los grupos de bacterias termo-tolerantes coliformes o *E. coli*, con su detección se infiere que los agentes patógenos pueden estar presentes; y 3) Índice y modelo. Un organismo con presencia y comportamiento indicativo de la presencia de patógenos, como *E. coli* siendo un indicador para la presencia de *Salmonella* o *Vibrio* y los colifagos, F-ARN como modelos de la presencia de virus entéricos humanos (Ashbolt et al., 2001).

Los enterococos son los indicadores de contaminación fecal más extendidos y más utilizados para determinar la calidad de aguas recreativas (especialmente en playas marinas), fue recomendado por la US EPA en 1980 (Murrel et al., 2013). Se ha considerado sustituirlo en aguas recreativas del interior por la presencia de otros indicadores, entre los que se encuentran los colifagos, con base a la falta de

representatividad de los indicadores con la presencia de partículas patógenas y los casos epidemiológicos ocurridos en lugares turísticos de las islas del Pacífico, como Hawaii (Fujioka et al., 2015).

1.3.2.1 Las bacterias coliformes

Las bacterias coliformes constituyen un grupo heterogéneo, son habitantes del intestino humano y de otros animales de sangre caliente, son utilizados como indicadores y con su número y diversidad se determina el grado de contaminación fecal (Kuo-Kuang, 2003; USEPA, 2015). Los coliformes se clasifican en tres grupos: los coliformes totales, los coliformes fecales y *E. coli*.

El grupo de bacterias coliformes totales lo conforman principalmente cuatro géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*, tienen forma de bastón, son organismos procariontes, anaerobios facultativos, Gram-negativos, no forman esporas, son oxidasa negativo, fermentan la lactosa en ácido y gas en 48 horas a 35°C o 37°C. Pertenecen al grupo de las Enterobacteriaceae, por lo tanto son β -Galactosidasa positivo. Como parte de las coliformes totales existe un subgrupo de bacterias llamadas "Coliformes fecales", éstos poseen las mismas propiedades, además de ser capaces de fermentar la lactosa con producción de gas en entre las 24 a 48 hrs de incubación a temperaturas de 44°C a 44.5°C y producir indol a partir del triptófano, las bacterias que presentan este crecimiento pueden considerarse como *E. coli* (APHA, 1995; Camacho et al., 2009; Fiello et al., 2014).

La bacteria *E. coli* es el indicador universal para evaluar la contaminación fecal en el agua debido a que su detección no es costosa, es sencilla y rápida. Su presencia en cuerpos de agua está relacionada con la presencia de virus entéricos patógenos de animales de sangre caliente (Naidoo y Olaniran, 2013; Jofre et al., 2011), sin embargo, no siempre es un indicador eficiente para determinar la presencia o ausencia de otros agentes patógenos que pueden encontrarse en el agua (USSEPA, 2015).

1.3.2.2 Los Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan a las bacterias. La diversidad de los bacteriófagos no ha sido identificada en su totalidad, sin embargo, los bacteriófagos que actualmente se conocen se encuentran agrupados en varias familias y poseen una amplia diversidad morfológica y genética (Hatfull y Hendrix, 2011). El genoma de los bacteriófagos puede ser ADN o ARN, mono-catenario o bi-catenario, circular o lineal, y generalmente está presente en una sola copia. Su morfología varía de simple, icosaédrica y de colas filamentosa a más complejas (Hatfull y Hendrix, 2011).

Dentro del grupo de los bacteriófagos se encuentran los colífagos, son un grupo de virus de diferentes familias que pueden infectar a las bacterias coliformes.

1.3.2.2.1 Los Colífagos

Los colífagos han sido utilizados como indicadores de contaminación fecal en el agua y se les relaciona con la presencia de virus entéricos debido a que comparten características como su composición, estructura, tamaño, morfología y el modo y sitio de replicación, su persistencia ambiental, su resistencia a tensiones ambientales, a la variación estacional y el grado de resistencia a la cloración (Kott et al., 1974; Jończyk et al., 2011; Ravva y Sarreal, 2016). De esta forma, la presencia de colífagos en el agua sugiere una alta probabilidad de que puedan estar presentes los virus entéricos (Cole et al., 2003; Jofre et al., 2011; Naidoo, 2013). La presencia de los colífagos somáticos en el agua supone un riesgo para la salud ya que generalmente están presentes en el agua contaminada con heces (Ahmed, 2016). Para la evaluación de la calidad del agua, se utilizan procedimientos rápidos y económicos como el cultivo de doble capa de colífagos F+específicos y somáticos.

Los métodos de conteo en placa, como capa doble y capa simple de agar (Bradley, 1963; Solano et al., 2012) se basan en la determinación de la concentración viral mediante conteo de unidades formadoras que placas (UFP), las cuales son zonas circulares producidas en la capa de crecimiento bacteriano debido a la lisis de la bacteria hospedera *E. coli* por los colífagos. Inicialmente una partícula de colífago infecta a la bacteria

hospedera, se replica y posteriormente se disemina, generando una zona circular donde no se observa crecimiento de la bacteria (Barquero, 2012).

La variación de la concentración de los colifagos en heces va desde 10^0 a 10^8 UFP/100 ml (Solano et al., 2012). Las Guías para la Calidad del Agua Potable de la OMS indican que se han encontrado concentraciones de colifagos somáticos de hasta 10^9 UFP/100 ml en aguas residuales y de 10^3 UFP/100 ml en aguas de ríos y lagos (Young et al., 2013; Yahya, 2015). Lo anterior indica que los colifagos pueden ser un buen indicador para detectar aguas contaminadas por fuentes de fecalismo.

Los colifagos pueden degradarse en el ambiente acuático debido a diversos factores como la temperatura, los sólidos suspendidos, la actividad biológica y la luz del sol, sin embargo, se consideran más resistentes que las bacterias a los procesos de tratamientos de agua, por lo cual algunos autores sugieren que su detección en el agua es de mayor utilidad que las bacterias fecales (Okoh et al., 2010). De esta manera la presencia de colifagos en el agua demuestra contaminación fecal tanto de humanos como de animales, lo que sugiere la posible presencia de otros patógenos (McKee y Wolf, 1963; Guzman et al., 2008).

Una de las desventajas del uso de los colifagos (somáticos) como indicadores de calidad del agua es que pueden replicarse en el ambiente acuático, por lo tanto aún no se define el mejor indicador para la futura regulación (Schaper et al., 2002) además, la falta de correlación entre la presencia de colifagos, virus humanos y los riesgos para la salud sigue siendo controversial (Wade, et al, 2010; Jofre et al, 2016).

En el cuadro 2 se muestra la diferencia entre el tiempo de supervivencia de las bacterias coliformes fecales y los virus entéricos, con el fin de mostrar que los coliformes fecales sobreviven menos días que los virus en el agua.

Cuadro 2. Supervivencia en días de patógenos e indicadores en diferentes medios ambientales, (tomado de Carr, 2001).

Organismo	Agua	Agua Salada	Suelo	Cultivos
Coliformes fecales	< 10	< 6	< 100	< 50
Virus entéricos	11 – 304	11 - 871	6 - 180	0.4 - 25
Salmonela	30	< 10	15 - 100	5 - 50
Cholera	< 10	+285	< 20	< 5
Protozoarios (quistes)	176	1 año	+75	ND
Ascaris (huevos)	1.5 año	2	1 -2 años	< 60
Tenia (huevos)	63	168	7 meses	< 60
Trematodos	30 - 180	< 2	< 1	130

1.3.2.2.1.1 Colifagos somáticos

Entre los colifagos somáticos se encuentra un grupo heterogéneo de bacteriófagos que infectan a *E. coli*. Son virus con ADN mono y bicatenarios, con cápside y cola, de 30 a 60 nm de diámetro (Armon, 2015; Jofre et al., 2016). Pueden replicarse en el medio ambiente en *E. coli* o en bacterias relacionadas, como *Klebsiella spp*, *Shigella spp*. (Jofre et al., 2016). A pesar de que éstos pueden replicarse en el ambiente acuático Ravva (2016), argumenta que la diferencia entre las concentraciones de éstos cuando el agua está contaminada con heces, es enorme en comparación con la poca concentración que es aportada por la replicación de los colifagos somáticos en el ambiente acuático.

1.3.2.2.1.2 Colifagos F + específicos

Los colifagos F+ específicos han sido propuestos ampliamente para evaluar la contaminación fecal-viral en el agua y diferenciar los que prevalecen en aguas residuales de origen humano (Subgrupos II y III) y las de origen animal (Subgrupos I y IV), sin ser ninguna de las dos absolutas (Cole et al., 2003; Hartard et al., 2015). Por otro lado, los cuatro subgrupos pertenecen a la familia Leviviridae, son virus F+ARN específico, monocatenario, envuelto en una cápside de simetría cúbica y diámetro entre 21 y 30 nm. Pertenecen a la familia cinco géneros, tres no identificados y dos géneros, Levivirus que contiene a los grupos I y II y el género Allolevirus que contiene a los grupos II y IV (Long y Sobsey 2004). La otra familia de colifagos F+ específico es la Inoviridae, son virus de ADN mono-catenario envuelto en una barra de 7 nm por 2,000 nm de longitud. Los colifagos F+ específicos se han detectado en el drenaje municipal y en aguas residuales,

además se han encontrado en aguas residuales de granjas animales, pozos, estiércol y abono (Cole et al., 2003; Schaper et al., 2002).

1.4 LOS VIRUS ENTÉRICOS EN EL AMBIENTE ACUÁTICO

Las enfermedades virales transmitidas por el agua pueden ocurrir por consumo de agua contaminada ya sea bebiéndola, por contacto a través de la piel o por inhalación. La presencia de estas partículas virales no se ha documentado en fuentes de agua potable adecuadamente (Park et al., 2010).

Los virus entéricos son los patógenos humanos que se transmiten por la vía fecal-oral (Griffin, 2003) (Figura 7A), éstos son el principal grupo de virus transmitidos por el agua causando con frecuencia infecciones asintomáticas o leves a los humanos infectados, que resultan de la gran diversidad de virus que se desprenden de las heces y que representan un peligro real para la salud pública (Estes et al., 2006; OMS, 2011; Ganesh y Lin, 2013). Los virus pueden sobrevivir en el ambiente durante largos períodos y toleran condiciones ambientales cambiantes de pH y temperatura (Skraber et al., 2004; Espinosa et al., 2009). Son importantes indicadores de la calidad del agua y son potenciales patógenos humanos. Los virus entéricos se han propuesto como indicadores de calidad de agua en sistemas contaminados (Lin y Ganesh, 2013).

La presencia de los virus entéricos se ha documentado en aguas de playas, ríos, lagos y vías urbanas y se han asociado con fuentes de contaminación fecal humana (Aslan et al., 2011). Los virus entéricos más frecuentemente estudiados presentes en agua son: Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus (Género) Hepatovirus, Norovirus, Sapovirus, Rotavirus, Poliovirus y los virus colífagos. Su presencia en el agua indica una fuente de contaminación de origen humano (Figura 7B) y refleja el riesgo de que otras personas puedan infectarse al consumir el agua contaminada o al tener contacto con ésta mediante actividades recreativas (Sinclair, 2009).

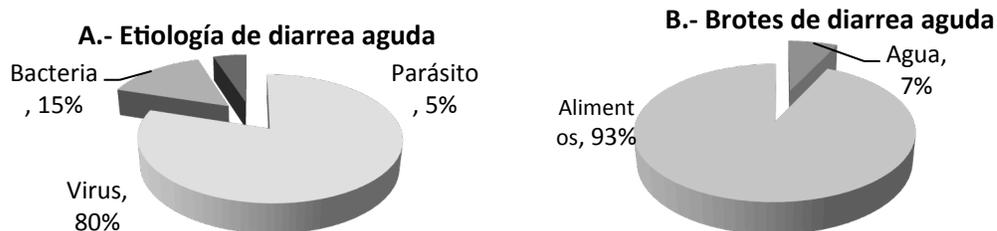


Figura 7. Intervención y brote de agentes etiológicos en gastroenteritis (en diferentes países principalmente Estados Unidos) (A) Agentes causales de la diarrea aguda, (B) Origen de los brotes de la diarrea aguda (basado en Hedberg, 1993; Goodgame, 2006).

Frecuentemente contaminan el agua subterránea debido a su tamaño tan pequeño (20-100 nm), que les permite infiltrarse muy fácilmente en el suelo y llegar rápidamente a los acuíferos (Borchardt et al., 2003) y de ahí se pueden mover de manera considerable en el ambiente (Betancourt et al., 2014), sobre todo en ambientes cársticos (Sinreich et al., 2014; Schiperski et al., 2016). Los virus entéricos han sido divididos en ocho familias. Los más relevantes son hepatitis A y E, enterovirus, rotavirus, calicivirus, astrovirus y adenovirus entéricos, que pueden causar graves enfermedades como: hepatitis, parálisis, meningitis, miocarditis y anomalías cardíacas, fiebre, gastroenteritis, conjuntivitis y enfermedades respiratorias (Armon, 2015). Los Adenovirus han sido los principales agentes causales responsables de brotes producidos por agua contaminada principalmente en agua de uso recreativo (Crabtree et al., 1997).

1.4.1 Los Adenovirus Humanos (HAdV)

Los Adenovirus humanos o HAdVs pertenecen al género Mastadenovirus que incluye 68 tipos humanos identificados hasta septiembre de 2015 (Harrach, et al., 2011), divididos en 7 especies conocidas (nombradas de la A a la G). 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; Ghebremedhin, 2014). 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 de 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).

Los HAdVs están constituidos por la cápside que es icosaédrica: las caras están compuestas por 240 hexones, cada uno compuesto de tres proteínas idénticas y 12 pentones que se encuentran en los vértices, cada uno compuesto de cinco cadenas de proteínas. Una fibra larga se extiende desde cada vértice, compuesto de tres cadenas idénticas que forman un botón en el extremo. Además, su estructura está conformada por varios tipos de proteínas "menores" en los surcos que unen los hexones y pentones, guiando el montaje de la cápside y pegando toda la estructura en conjunto (Rux y Burnett, 2004) (Figura 8).

La molécula de ADN que conforma el genoma es lineal de doble hebra de unos 36 Kb, con una proteína terminal (TP) unida covalentemente a cada uno de sus extremos 5'. En ambos extremos del genoma viral se definen unas secuencias cortas denominadas ITRs, que constituyen el promotor de la replicación del ADN. A continuación del ITR en el extremo 5' se localiza el gen de la proteína de la cápside (Narvaiza et al., 2003).

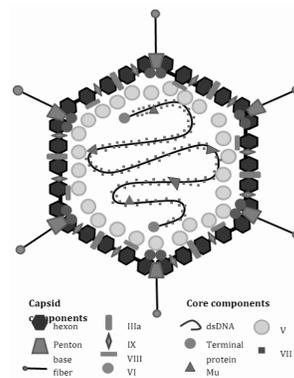


Figura 8. Características de adenovirus. Los adenovirus tienen un tamaño de aproximadamente 90 a 100 nm y su estructura consiste en una cápside icosaédrica que está formada por tres componentes principales: hexon localizado en las caras y bordes de la cápside; base de penton ubicada en los 12 vértices cinco veces; fibras finas unidas a la base del pentón. Otros componentes secundarios: IIIa, VI, VIII y IX también están asociados con la cápside. En el interior de la cápside se encuentra la proteasa del virión que desempeña un papel vital en el ensamblaje del virión y del genoma de ADN de doble hebra asociado con cinco polipéptidos (proteína terminal (TP), V, VII, Mu y IVa2) (tomado de Wayne y Sing, 2010).

Se estima que los HAdVs son responsables de entre el 2% al 5% de las enfermedades respiratorias en el mundo. Comúnmente los serotipos 3, 4 y 7 provocan infecciones en vías respiratorias; los serotipos 8, 19, y 37 provocan queratoconjuntivitis; los serotipos 4 y 7 provocan enfermedades respiratorias agudas; los serotipos 40 y 41 provocan gastroenteritis y el serotipo 14 puede causar infecciones respiratorias fatales en infantes y personas inmunodeprimidas (Cuadro 3). Los serotipos 1, 2, 3 y 5 causan intususcepción, que va acompañada de forma precedente o simultánea de una infección del tracto respiratorio. Algunos serotipos son oncogénicos en otros animales (Louie et al., 2008; Kuo et al., 2010).

Se ha reportado que los adenovirus pueden permanecer activos hasta 60 días en temperaturas de 15°C y 4°C en aguas residuales (Espigares et al., 2006; Luna et al., 2013). Los serotipos más comunes en aguas residuales son los pertenecientes a la especie F, los serotipos 40 y 41 y además son los más resistentes al tratamiento de aguas residuales (Jiang et al., 2005).

Cuadro 3. Lista de especies y serotipos de HAdVs y las enfermedades que provocan (Basado en Mitchell et al., 2000; Kojaoghlanian et al., 2003; Lewis et al., 2009; Romero et al., 2010).

Enfermedades provocadas por los serotipos de Adenovirus humanos HAdVs en el mundo.

<i>Especies y subgrupos</i>	<i>Serotipo</i>	<i>Tipo de enfermedad</i>		
<i>E</i>	4			keratoconjuntivitis,
<i>A</i>	12, 18, 31			El 12 es oncogénico
<i>B, tipo 1</i>	3, 7, 16, 21	Urinario	Respiratoria	keratoconjuntivitis
<i>B, tipo 2</i>	11, 14, 34, 35			
<i>C</i>	1, 2, 5, 6	Gastrointestinal		Incluye hepatitis,
<i>D</i>	8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49			keratoconjuntivitis, 8 común en epidemias
<i>F</i>	40, 41			
<i>G</i>	52			

1.4.1.1 Los adenovirus en ambientes acuáticos

En Estados Unidos se ha demostrado desde 1981 que la mitad de los brotes de las enfermedades transmitidas por el agua fueron asociados con aguas subterráneas contaminadas. Para el año 1997 y 1998, el 80% de los brotes transmitidos se atribuyeron al consumo de agua potable contaminada (Borchardt et al., 2003). En instalaciones de tratamiento de aguas residuales a lo largo de la costa de los Estados Unidos se colectaron 12 muestras de aguas negras sin tratar (influyente) y se demostró la presencia de Adenovirus en el 100% de las muestras (Symonds et al., 2009). Los HAdVs son específicos del ser humano y no son detectados en aguas residuales relacionadas con animales (Bofill-Mas et al., 2013). Los HAdVs están presentes en todo el mundo y durante todo el año (Symonds et al., 2009; Fong et al., 2010), su presencia en aguas residuales, o en aguas de consumo o de uso recreativo, representa una fuente probable de infecciones (Grabow, 2001).

Los Adenovirus han sido utilizados como indicadores de contaminación fecal en aguas residuales de España, Francia, Suecia, Grecia, Estados Unidos, Egipto y Sudáfrica. La herramienta utilizada para detectarlos fue el PCR en tiempo real (Bofill-Mas et al., 2013), en aguas dulces y aguas costeras por su utilización por el hombre (Puig et al., 1994; Tani et al., 1995; Jiang et al., 2001; Dongdem et al., 2009 y Jurzik et al., 2009). Estos virus se han encontrado en el 98% de las muestras en concentraciones de 10^2 - 10^3 genomas/ ml en España (Bofill-Mas et al., 2005).

Los HAdVs se excretan y llegan al agua residual en altas concentraciones, entre 10^5 y 10^{11} partículas / g de heces) (Fong y Lipp 2005; Wold y Horwitz, 2007) y pasan a los acuíferos por filtración (Schijven y Hassanizadeh, 2000). Por otro lado, los adenovirus resisten los sistemas de desinfección como la cloración y se consideran 60 veces más resistentes que las bacterias al tratamiento del agua por irradiación ultravioleta (Meng y Gerba, 1996; Gerba et al., 2002).

Los HAdVs se han propuesto como indicadores de la eficiencia del tratamiento de aguas residuales, y por su frecuente detección en aguas ambientales (Puig et al., 1994; Bofill-Mas et al., 2013), gracias a las siguientes características: 1) Su estabilidad, persistencia y amplia distribución en una serie de matrices de agua, tales como aguas residuales, ríos y

agua potable (Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2006, Haramoto et al., 2007, Katayama et al., 2008, Dong et al., 2010; Rames et al., 2016); 2) la detección continua del virus en las aguas residuales, es decir, la ausencia de estacionalidad en las aguas residuales no tratadas, aunque en algunos casos se ha señalado la presencia estacional en las aguas ambientales (Pina et al., 1998; Fong et al., 2010; Hewitt et al., 2011; Poma et al., 2012; Carducci y Verani, 2013); 3) su alta resistencia a la desinfección por irradiación ultravioleta (UV) (Thurston-Enríquez et al., 2003; Nwachuku et al., 2005; Linden et al., 2007); 4) la disponibilidad de un mayor número de métodos estándar para su detección con respecto a otros virus entéricos (Katayama et al., 2008); y 5) su especificidad del huésped humano, así como la falta de replicación fuera del huésped (Fong y Lipp, 2005; Jiang, 2006; Silva et al., 2011; Wong et al., 2012; Ogorzaly et al., 2013). Su presencia es una constante en los estudios de calidad de agua de Europa (Bofill, 2010), donde se han propuesto como indicadores virales. Los HAdV fueron incluidos en la Lista de Candidatos de Contaminantes (CCL) como parte de la Ley de Agua Potable Segura por la USEPA (1998).

Los HAdVs se han detectado en las aguas de consumo que cumplían las especificaciones aceptadas para el tratamiento y la desinfección con el uso de organismos indicadores como *E. coli* (Fongaro et al., 2012). La identificación de HAdVs se realiza aislándolos de cultivos de células seguido del uso de anticuerpos y visualizados por microscopía electrónica (Ganesh y Lin, 2013). Además los métodos moleculares como el PCR punto final y tiempo real se han convertido en los métodos más comúnmente aplicados para la detección de estos virus en el agua, ya que tienen mayor sensibilidad y especificidad (Mattison y Bidawid, 2009; Hamza et al., 2011). Estos métodos a pesar de que hoy en día son costosos, podrían en el futuro llegar a incorporarse como parte de los programas regulares de monitoreo para evaluar la presencia y concentración de los virus en el agua (Okoh et al., 2010; Costa et al., 2004).

Los Adenovirus tienen en el agua un medio de dispersión donde mantienen su estabilidad viral e infectividad y les permite persistir sin degradarse a diferentes temperaturas (Ogorzaly et al., 2010) y logran dispersarse a grandes distancias y profundidades (67 m), en plazos cortos sobretodo en acuíferos fracturados (Borchardt et al., 2011), por medio de “vías rápidas de bajo rendimiento” (Hunt et al., 2014). En acuíferos cársticos el flujo de

agua subterránea es rápido y directo, con poca oportunidad para la inactivación o la unión de los virus a la matriz del acuífero (Schiperski, 2016). Se ha demostrado que el Adenovirus 2 fue detectado después de 672 días en aguas subterráneas almacenadas en laboratorio (Seitz et al., 2011). En otro ensayo con HAdV2 y HAdV41, se colectó agua subterránea y superficial y se incubaron los virus a 10°C y 19°C y las concentraciones virales se mantuvieron estables durante 160 días y algunos hasta 301 días sin presentar diferencia entre ambos tipos de agua (Rigotto, 2011). Los adenovirus humanos del serotipo 41 pueden persistir durante 153 y 38 días a 4 °C y 23 °C, respectivamente, en aguas subterráneas con valores de T90 (Enríquez et al., 1995; Yalcin y Muhammetoglu, 2011). En un experimento de curso temporal de 728 días, el virus se detectó por PCR en Tiempo Real hasta el día 672 después de iniciado el experimento (Charles et al., 2009). El HAdV-2 cultivado en un medio artificial utilizando aguas residuales crudas puede mostrar una persistencia del 100% a 4 °C y una persistencia de T90 durante 278 días a 20 °C, lo que sugiere que el ADN del adenovirus es muy estable en el agua subterránea (Ogorzaly et al., 2010).

Cuadro 4. Concentraciones de Adenovirus encontradas en diferentes cuerpos de agua en Japón (basado en información de Haramoto et al., 2005).

	<i>Tipo de cuerpo de agua</i>	<i>Concentración UDP/ml Unidad de detección de PCR</i>	<i>Núm de muestras</i>
<i>Japón</i>	Aguas residuales crudas	85 UDP	17
	Aguas residuales tratamiento secundario, antes Cl	0.39 UDP	14/17
	Aguas de río Tamagawa	0.018 – 7.0 UDP	29/36
	Agua de mar Bahía de Tokio	0.032 – 6'1 UDP	15/18

La presencia de HAdV no se ha podido correlacionar en todos los casos con otros virus, incluyendo los colifagos (Bellou et al., 2015). Los virus son de tamaño coloidal (Bitton, 1974), tienen características químicas y de carga superficiales en la cápside que deben tomarse en cuenta para explicar su transporte en las aguas del subsuelo; el pH y la fuerza iónica del agua permiten a las virus reaccionar a la protonación y desprotonación (Taylor, 1981).

En muestras colectadas en plantas de tratamiento (efluente e influente) antes de cloración, en un río y en agua marina, se encontraron adenovirus, utilizando cebadores específicos y adenovirus serotipos 40 y 41, y cebadores universales. Los resultados

mostraron que se presentó una mayor concentración de adenovirus en el río y en el mar que en la salida de la planta de tratamiento (Cuadro 4) (Haramoto et al., 2007).

Es necesario utilizar métodos altamente sensibles, estandarizados y óptimos para la detección de los adenovirus en ambientes acuáticos, además, estos virus se pueden utilizar como indicadores de calidad del agua por sus características (Rames et al., 2016). Como puede verse en la Figura 9, desde hace más de 20 años han ido en aumento las investigaciones sobre diferentes virus incluyendo los adenovirus en el ambiente acuático, lo que resalta la importancia del monitoreo y la detección oportuna para evitar enfermedades provocadas por estos virus (Figura 9).

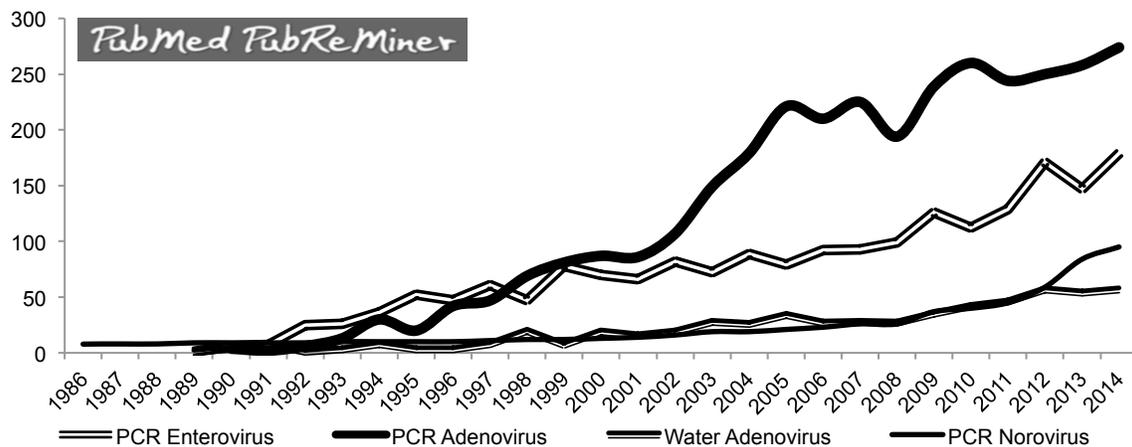


Figura 9. Gráfico del número de investigaciones sobre tres tipos de virus entéricos (PubMed PubReMiner en <http://hgserver2.amc.nl/cgi-bin/miner/miner2.cgi>). Los estudios sobre Adenovirus en el agua constituyen la quinta parte.

1.4.2 Métodos para la detección de virus en el ambiente acuático

Para conocer el tamaño de los viriones se han utilizado técnicas como la membrana de colodión de Elford (1931) (Ver et al., 1968) que ayudaron a instrumentar las técnicas de aislamiento de los virus. Los primeros HAdVs fueron aislados en 1949 a partir de aguas residuales. Las resinas de intercambio iónico (Lo y Berger, 1952), permitieron aislar los rotavirus, coxsackievirus, echovirus y adenovirus en muestras del desagüe. Con la técnica de floculación se aislaron virus de agua de un río usando grandes volúmenes de agua (Chang et al., 1958). Durante las siguientes dos décadas se propagó el campo del estudio

de los virus en el medio ambiente y en los 80`s se publicó la 15va edición de “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, que contenía los métodos de concentración y detección de virus en el agua (Greenberg y Taras 1981).

El procedimiento de Adsorción–elución de virus (VIRADEL) ha sido utilizado para concentrar virus a partir de grandes volúmenes de agua (Wallis y Melnick, 1967). La técnica VIRADEL consiste en la adsorción de partículas virales al medio filtrante mediante interacción de carga, neutralizando las fuerzas polares y la posterior elución de las partículas virales contenidas en el agua mediante una solución con pH específico. El siguiente paso es adsorber los virus utilizando soluciones polares como el PEG (polietilenglicol) para aislar y aglutinar los virus (Lee et al., 2011). Debido a que los virus en agua típicamente tienen una carga superficial negativa neta, dependiendo de la matriz de la muestra de agua y del tipo de filtro usado, éstos tienen que ser acondicionados antes de la filtración de la muestra para permitir la adsorción.

Cuadro 5. Ventajas y desventajas de los tipos de filtros para recuperación de virus en el agua (tomado de Cashdollar et al., 2013).

<i>Tipo de filtro</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<i>Electronegativo</i>	Económico. Puede filtrar grandes volúmenes incluso con aguas turbias antes de que se obstruya. Ha sido probado con una colección de virus entéricos. Gran recuperación para prueba comunes de virus entéricos	Requiere preacondicionamiento de muestras de agua o filtro primario para filtración
<i>Electropositivo MDS</i>	No requiere preacondicionamiento para pruebas de agua. Ha sido probado con una colección de virus entéricos. Puede filtrar grandes volúmenes incluso con aguas turbias antes de que se obstruya	Filtro extremadamente caro.
<i>Electropositivo NanoCeram</i>	Económico. Recuperación comparable a 1 MDS para pruebas de virus. No requiere preacondicionamiento para pruebas de agua	Se bloquea en aguas más turbias. Datos limitados respecto de su efectividad con patógenos múltiples
<i>Electropositivo Glass Wool</i>	Económico. No requiere preacondicionamiento para pruebas de agua. Fácil de usar. Campo desplegable	Requiere que cada laboratorio ponga el filtro en el cartucho lo cual puede causar variaciones entre laboratorios. Agua turbia puede causar oclusión. Datos limitados para determinar su efectividad con múltiples patógenos
<i>Electropositivo ViroCap</i>	Económico. No requiere preacondicionamiento para pruebas de agua. Fácil de usar. Campo desplegable	El agua turbia puede causra oclusión. Puede limitar el volumen filtrado debido al tamaño del filtro. Datos limitados para determinar su efectividad con múltiples patógenos
<i>Ultrafiltración con Fibra Hueca</i>	Concentración de multipatógenos. Económico. No requiere preacondicionamiento para pruebas de agua	Agua turbia puede causar oclusión. No es fácil desplegar el campo. Tasa de filtración lenta. Limitados datos disponibles en el tiempo del estudio para determinar su efectividad con múltiples patógenos virales

Existen dos tipos de filtros básicos utilizados para adsorber a los virus: filtros electronegativos (Farrah et al., 1977; Gerba et al., 1978; Haramoto et al., 2009) y filtros electropositivos (Sobsey y Glass, 1980; Dahling, 2002; Hill et al., 2009). Rose et al., (1984) compara el desempeño de ambos tipos de filtros para encontrar las mejores condiciones de filtración. Farra et al., (1977), utiliza filtros Filterita cargados negativamente y los filtros MDS usados comúnmente y que no requieren cargarse previamente.

Con el uso de filtros cargados en cartuchos inició el uso de la ultrafiltración (Farrah et al., 1977;), se facilitó la filtración de grandes volúmenes de agua. Diez años después se utilizó a la ultrafiltración con filtros huecos basados en la exclusión de corte en pasos moleculares de 30 – 100kDa para reducir los volúmenes de agua por medio de capilares o laminillas, utilizando el flujo tangencial y la concentración de los virus en el volumen residual (Cuadro 5).

El estado actual de las tecnologías de recuperación de virus en el agua muestra de acuerdo al estudio de meta-análisis que los filtros electronegativos, electropositivos y los ultrafiltrados pueden ser iguales en rendimiento y las diferencias se deben a la naturaleza del virus y no a la matriz de agua, al volumen de muestra, ni al tipo de filtro (Cashdollar et al., 2013).

En general, diversos estudios reportan la presencia de adenovirus en el medio ambiente, aún cuando los indicadores bacterianos están ausentes, utilizando para ello al PCR en tiempo real, metodología que ha sido sugerida y ampliamente utilizada para la detección de los adenovirus en muestras ambientales (Muscillo et al., 2008). Aunque existen diversas metodologías para realizar la concentración o adsorción de los virus a partir de ambientes acuáticos, así como diversos métodos para su detección y cuantificación, se he demostrado que en especial la ultrafiltración es eficiente para concentrar partículas a partir de grandes volúmenes de agua y los métodos moleculares más eficientes son los basados en el PCR cuantitativo.

1.5 HIPÓTESIS

El acuífero cárstico del noreste de Quintana Roo en la Península de Yucatán está contaminado, por lo que se detectará la presencia de bacterias coliformes, virus colifagos y adenovirus humanos.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

Detectar y cuantificar coliformes, colífagos y adenovirus en el sistema acuífero norte del estado de Quintana Roo.

1.6.2 Objetivos específicos

- Determinar la calidad del agua mediante el uso de indicadores bacterianos (coliformes totales, *E. coli*) y virales (colífagos somáticos y F+ específicos)
- Detectar e identificar los serotipos de Adenovirus presentes en el agua durante la temporada de lluvias y de secas
- Determinar la concentración de adenovirus presentes en el agua durante la temporada de lluvias y de secas
- Determinar la correlación entre la concentración de coliformes, colífagos y adenovirus con los parámetros físico-químicos del agua
- Realizar la reconstrucción filogenética de los serotipos de Adenovirus humanos encontrados en el presente trabajo

1.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental consistió en la selección de 10 sitios ubicados en la zona norte de Quintana Roo, de los cuales 5 están localizados en zonas urbanas y 5 en zonas de uso recreativo. De los 10 sitios, 8 corresponden a cenotes de agua dulce y 2 son sitios de agua salobre. Se colectaron 100 L de agua durante la temporada de lluvias (ago-oct 2015) y 100 L en secas (mzo–jun 2016) para cada uno de los sitios. Se determinó la calidad del agua mediante la medición de parámetros fisicoquímicos con una sonda multiparamétrica YSI 600 QS y se cuantificó la concentración de coliformes totales y densidades de *E. coli* con tecnología de sustrato definido [DST*], patentada por IDEXX, Colilert. Se cuantificaron los colifagos somáticos y F+ específicos con el ensayo de doble capa, Método 1601 (USEPA, 2001) utilizando *E. coli*; ATCC#1370 y ATCC#700609, sensibles a colifagos somáticos y ATCC® 15597™ y ATCC#700891 para colifagos F+ específicos. Para concentrar las partículas virales del agua se utilizó la ultrafiltración tangencial con Filtro Fresenius F80A de acuerdo a Hill et al., (2007). Para detectar a los Adenovirus se realizó la concentración de los virus con ultrafiltrado, pegilación, centrifugación con diferencia de presión hidrostática y se purificó el ADN por medio del QIAamp DNA Blood Mini Kit. Se amplificó un fragmento del gen hexón por PCR anidado con los siguientes primers (301pb) hex1deg fr 5' GCCSARTGGKWCWATACATGCACATC 3' (Primers Sigma® al 0.2µM, 0.5µl) y rev. hex2deg 5' CAGCACSCCICGRATGTCAAA 3' con las siguientes condiciones 94 °C – 5' minutos.94 °C -30'', 56 °C - 30'', 72 °C - 30''.72 °C – 5'. Para el PCR anidado se utilizaron con los siguientes primers (172pb) nehex3deg fr 5' GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC 3' y rev nehex4deg 5' CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGT 3' y con las siguientes condiciones 94 °C - 5', 94 °C - 30'', 55°C - 30'', 72 °C - 30'', 72°C - 5', (Tong et al., 2011). Las concentraciones se obtuvieron por qPCR utilizando los primers AQ1 (5'GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT 3'), AQ2 (5'GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC 3') y ADENO (5'FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA BHQ1- 3'), las condiciones del programa fueron 45 ciclos de 95°C – 3'. 55 °C – 10', 65 °C (Heim et al., 2003). Los amplicones fueron clonados y secuenciados para realizar la identificación de los serotipos de los Adenovirus (Figura 10).

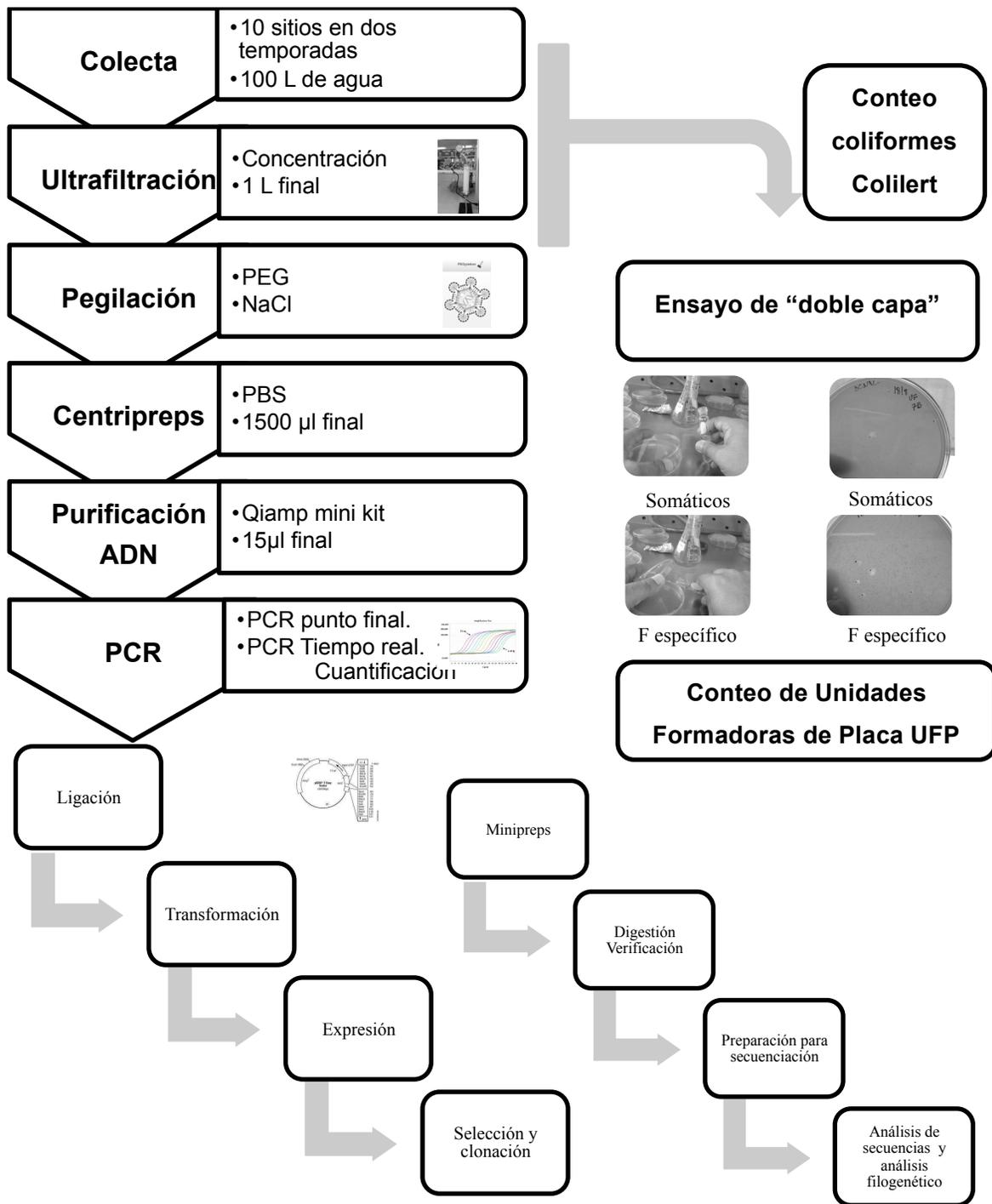


Figura 10. Diagrama de la estrategia experimental seguida para cumplir con los objetivos del presente trabajo.

CAPÍTULO II.

2.0 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, *E. coli*, COLÍFAGOS SOMÁTICOS Y COLÍFAGOS F+ ESPECÍFICOS EN CUERPOS DE AGUA DEL NORTE DE QUINTANA ROO.

2.1 INTRODUCCIÓN

A nivel global se utiliza la presencia y concentración de diferentes indicadores para establecer la calidad del agua de acuerdo a su uso. La mayoría de las normas de calidad del agua están basadas en la detección de bacterias coliformes (totales y fecales) (Armon, 2015; Plummer et al., 2014; Barrera-Escorcia et al., 2016). Un indicador idóneo para determinar los parámetros de la calidad del agua debe tener las siguientes características: 1) estar limitados al intestino de animales de sangre caliente; 2) deben poder detectarse cuando otros patógenos fecales están presentes; 3) deben poder detectarse de manera fácil y económica; 4) la concentración del indicador debe correlacionarse con los riesgos para la salud (Ashbolt et al., 2001). En los últimos años se han utilizado diferentes metodologías para determinar la calidad del agua de manera estándar, mediante la detección de coliformes totales y los coliformes fecales (densidades de *E. coli*).

Los coliformes fecales se localizan predominantemente en el tracto intestinal humano y en otros animales de sangre caliente y son capaces de fermentar la lactosa a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas (Pullés, 2014). Su presencia y concentración en el agua están relacionadas con el riesgo de contraer enfermedades gastrointestinales, ya que el grupo comprende especies de los géneros como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Citrobacter* (Camacho et al., 2009). Su presencia en cuerpos de agua es común (Camper et al., 1991), lo que tiene importantes implicaciones en la salud. La especie *E. coli* es la principal representante de los coliformes fecales, esta bacteria se encuentra presente en heces humanas y animales en porcentajes arriba del 90% (Bobbi et al., 1998). *E. coli* se encuentra en las aguas residuales, en aguas de efluentes y en aguas naturales que reciben contaminación derivada de las actividades antropogénicas y/o la vida silvestre (Smith et al., 2015). Algunas cepas de *E. coli* pueden causar enfermedades en los humanos y su presencia en el agua indica contaminación fecal reciente y un mayor riesgo de que otro tipo de patógenos para el humano puedan estar presentes (Cabral, 2010).

Los coliformes son utilizados para determinar la calidad del agua en México (Dirección General de Normas, 1987) y en muchos países, pero una de sus desventajas es que su ausencia en el agua analizada no garantiza que no existan otros patógenos que pueden infectar al humano como los protozoarios y los virus (Ashbolt et al., 2001; Pullés, 2014; Noble y Fuhrman, 2011). Por lo tanto, se han realizado diversos estudios para determinar la factibilidad del uso de otros microorganismos como indicadores de la calidad del agua, entre ellos los virus (Liang et al., 2015; Griffith et al., 2016).

Entre los virus, los bacteriófagos o fagos son virus que infectan a las bacterias. Dentro de éstos existen dos grupos que pueden infectar a la bacteria *E. coli*, que son: los colifagos somáticos y los colifagos F+ específicos. Los colifagos son un grupo diverso de virus, algunos con material genético de ARN y otros de ADN (Clokic et al., 2011; Singh y Lin, 2015). Se encuentran en altas concentraciones en aguas negras y en aguas ambientales contaminadas por origen fecal (Cuadro 6) (Jofre et al., 2016), además son muy persistentes en el ambiente acuático y son resistentes a diversos tratamientos de las aguas negras y tratamientos utilizados para eliminar a los virus (Okoh, 2010; Yahya, 2015; Jofre et al., 2016).

Cuadro 6. Concentración promedio de colifagos en Unidades formadoras de placa por 100 ml (UFP/100ml) detectados en agua superficial (tomado y modificado de Jofre et al., 2016).

Muestra	Método	Número de muestras	Localización geográfica	Colifagos somáticos	Colifagos F+ Específicos
Río	ISO	392	España Francia Colombia Argentina	6.2×10^3	
Reservorio de agua dulce	USEPA	65	Singapur	2.2×10^2	1.1×10^2
Agua dulce y marina	ISO	139	9 Ciudades europeas (13 muestras/sitio)	1.7×10^2	
Agua dulce y marina	USEPA	12	California	$2.0 - 3.3 \times 10^2$	$<0.02-30 \times 10^0$
Agua de río	USEPA	120	California	6.0×10^3	$5.0-1.1 \times 10^2$
Agua de río	ISO	96	Francia	1.7×10^3	2.0×10^2
Agua de mar	ISO	20	España	$<10-1.2 \times 10^4$	
Agua de río	ISO	75 (10 sitios)	Holanda	$8.8-4.3 \times 10^2$	$0.04-93.6 \times 10^0$
Agua de mar	USEPA	436	California	$3.1-4.9 \times 10^0$	0.3×10^0

Los colifagos provienen del tracto gastrointestinal de organismos de sangre caliente, sin embargo, el origen de su presencia en el agua es controversial, ya que se ha reportado que éstos son capaces de replicarse en el ambiente acuático y no siempre se correlacionan con la presencia de virus entéricos que pueden infectar al humano (Skraber et al., 2004). Sin embargo, de acuerdo a Jofre et al., (2016) y otros autores, la concentración de los colifagos que se replican fuera del intestino en algunos cuerpos de agua es tan baja, que no aportan al número de éstos cuando son resultado de la contaminación fecal. La ventaja del uso de los colifagos como indicadores para determinar la calidad del agua es que los métodos utilizados para cuantificarlos son sencillos y económicos, por ejemplo; el ensayo de doble capa de agar, se utiliza desde la década de los 60's para determinar la eficiencia del tratamiento de aguas negras (Adams, 1959; Kott, 1966).

Cuadro 7. Porcentaje de muestras positivas para colifagos presentes en el agua subterránea (tomado de Jofre et al., 2016).

<i>Sitios muestreados</i>	<i>Método</i>	<i>Número de muestras</i>	<i>Localización geográfica</i>	<i>Colifagos somáticos (% de muestras positivas)</i>	<i>Colifagos F+ específicos (% de muestras positivas)</i>
<i>Pozos de varias características</i>	USEPA	160	Canadá	8.7	1.8
<i>Variedad de pozos y manantiales</i>	ISO	197	Argentina Colombia Francia España	41.7	
<i>Variedad de pozos</i>	USEPA	39	Corea	12.5	7.5
<i>Pozos y manantiales</i>	ISO	125	España	53.6	
<i>Variedad de pozos</i>	F+ ISO somatic coliphages C3000	444	Estados Unidos	10.8	9.5

Los colifagos han sido detectados en diferentes países en muestras de agua subterránea (Cuadro 7). En México los colifagos F+ específicos han sido propuestos como indicadores de contaminación fecal en ecosistemas acuáticos tropicales (Arredondo-Hernández et al., 2017). Lo anterior indica que es muy probable encontrar la presencia de colifagos somáticos y F+ específicos en el acuífero de la PY. El principal objetivo de este capítulo es realizar la detección y la cuantificación de coliformes y colifagos presentes en cuerpos de agua de la zona norte del estado de Quintana Roo durante dos temporadas climáticas en un ciclo anual.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Detectar y cuantificar a los coliformes totales, *E. coli* y los colifagos somáticos y F+ específicos en cuerpos de agua del norte de Quintana Roo en un ciclo anual.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la calidad del agua mediante el uso de indicadores bacterianos (coliformes totales y densidades de *E. coli*) en 10 cuerpos de agua de la zona norte de Q. Roo, durante la temporada de lluvias y de secas.
2. Determinar la concentración de colifagos somáticos y F+ específicos utilizando diferentes cepas hospederas de *E. coli* en 10 cuerpos de agua de la zona norte de Q. Roo, durante la temporada de lluvias y de secas.
3. Comparar dos métodos de concentración de la muestra de agua para la cuantificación de colifagos somáticos y F+ específicos.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Área de estudio

Se seleccionaron 10 sitios de muestreo localizados en la zona norte del Estado de Quintana Roo, de los cuales 8 sitios son dolinas de agua dulce y 2 sitios son de agua salobre (Figura 11). La zona de colecta comprendió la ciudad de Cancún y la zona conocida como la Ruta de Cenotes de Puerto Morelos. Cancún pertenece a la Región Hidrológica Yucatán Norte, cuenca 32 A Quintana Roo. En el lado Este se encuentran las lagunas de Manatí y el Sistema Lagunar Nichupté (Lagunas Somosaya, Río Inglés, Morales, La Ciega y Caleta), las cuales son zonas inundables con problemas de eutrofización provocados por la obstrucción artificial de puntos de desfogue del cuerpo lagunar. El azolvamiento y los malos olores por estancamiento del agua son comunes en estas zonas (FONATUR, 2014). Dos de los sitios muestreados (agua salobre) pertenecen a este sistema (Figura 11).

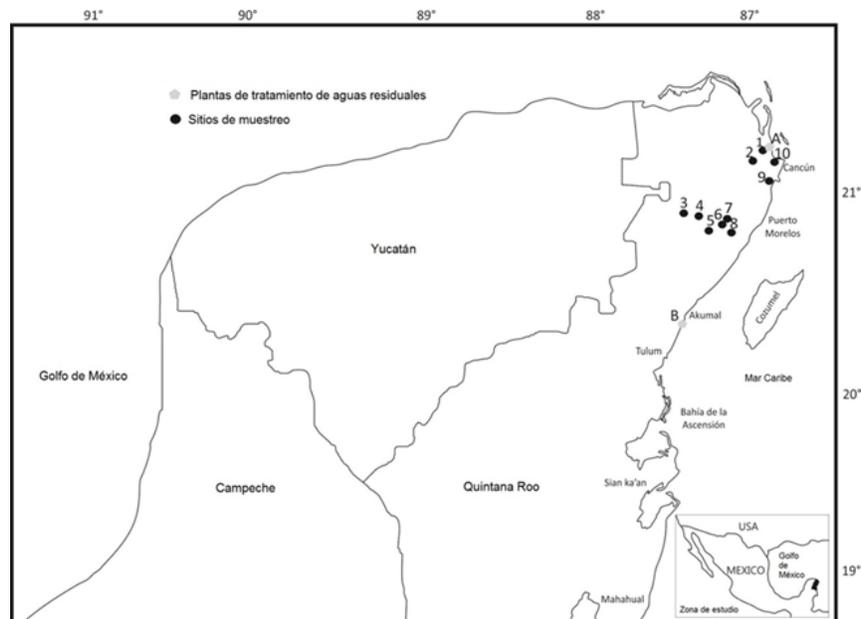


Figura 11. Mapa de la zona de muestreo señalando los sitios visitados Norte de Quintana Roo. Los números y los puntos negros corresponden a los diez sitios de muestreo (mapa elaborado por la M.C. Gabriela Rosiles González).

Los 10 sitios de muestreo presentaron las siguientes características: 1) 5 dolinas de agua dulce situados en la zona de Puerto Morelos; 2) 3 dolinas de agua dulce en la zona urbana de Cancún; 3) 2 sitios de agua salobre dentro del sistema de lagunas. A continuación se presenta la ubicación geográfica de los sitios de colecta:

<i>Sitio</i>	<i>Latitud</i>	<i>Longitud</i>	<i>Tipo de agua y sitio</i>
<u>1</u>	21° 12' 10.4"	86° 50' 27.8"	Agua dulce - urbano
<u>2</u>	21° 09' 29.0"	86° 52' 14.8"	Agua dulce - urbano
<u>3</u>	20° 57' 43.0"	87° 16' 26"	Agua dulce - urbano
<u>4</u>	20° 57' 12.7"	87° 10' 36.6"	Agua dulce - recreativo
<u>5</u>	20° 51' 35.7"	87° 7' 37.1"	Agua dulce - recreativo
<u>6</u>	21° 12' 10.4"	86° 50' 27.8"	Agua dulce - recreativo
<u>7</u>	20° 52' 34.9"	87° 02' 38.1"	Agua dulce - recreativo
<u>8</u>	20° 50' 15.0"	87° 01' 24.7"	Agua dulce - recreativo
<u>9</u>	21° 02' 14.0"	86° 47' 45.4"	Agua salobre - urbano
<u>10</u>	21° 08' 37.2"	86° 48' 50.7"	Agua salobre - urbano

2.3.2 Parámetros fisicoquímicos

Se utilizaron las sondas multi-paramétricas YSI 600 QS y Hach HQd calibradas con soluciones amortiguadoras estándar, para determinar los siguientes parámetros fisicoquímicos *in situ*: la temperatura (°C), el pH, Total de sólidos disueltos (g/L) (TSD), la salinidad y la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$). Para obtener réplicas de los parámetros, se realizaron tres mediciones por cada sitio distribuidas en el área del cuerpo de agua.

2.3.3 Cuantificación de coliformes totales y densidades de *E. coli*

Para cada sitio de colecta se utilizó un recipiente de plástico transparente de 100 ml con tapa de rosca esterilizado en autoclave a 121°C por 15 min para obtener las muestras de agua. *In situ* y utilizando guantes estériles se introdujo el recipiente dentro del cuerpo de agua, se abrió sin tocar la parte interior del recipiente. Se dejaron 2.5 cm de espacio de aire en el recipiente y se cerraron. El recipiente con la muestra se colocó en un contenedor con hielo para transportarlo al laboratorio para su posterior análisis. Todo el proceso duró menos de 4 horas y se realizó inmediatamente después de cada colecta. Para llevar a cabo el recuento basado en el modelo del número más probable (NMP) con el estándar de la USEPA para coliformes totales y *E. coli*, se utilizó y siguió el procedimiento del fabricante para el sistema semiautomático de Quanti-Tray/2000 de la marca Colilert™ de IDEXX (IDEXX laboratories, Inc., Westbrook, Me), con un límite de confianza del 95%. Este método permite realizar recuentos de NMP de hasta 2, 419 por cada muestra de 100ml. Los resultados se presentaron con base en la tabla propuesta por el fabricante en NMP (http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Quanti_Tray.pdf).

2.3.4 Detección y cuantificación de colifagos

2.3.4.1 Toma de muestras

Las muestras de agua fueron tomadas a 30 cm de la superficie y colocadas en bidones estériles que fueron enjuagados tres veces previamente con el agua de la muestra, posteriormente se colocó un volumen de 10 L en cada bote. En total se tomaron 100 litros

de agua en cada sitio (10 bidones de 10 L). Las muestras fueron transportadas (promedio de 45 min) al laboratorio y fueron procesadas el mismo día.

2.3.4.2 Método de conteo directo

Se tomaron 10 ml directamente de la muestra de agua colectada, los cuales fueron utilizados para realizar el conteo de colifagos somáticos y F+ específicos.

2.3.4.3 Método de conteo a partir del ultrafiltrado

Se tomaron 10 ml del producto de la muestra de agua después de la ultrafiltración para realizar el conteo de colifagos somáticos y F+ específicos.

2.3.5 Ultrafiltración

Se construyó el aparato de ultrafiltración con base en el diseño de Hill et al., 2005 y Hernández-Morga et al., 2009 (Figura 12). 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 m^2 . 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 no fueron reutilizados.

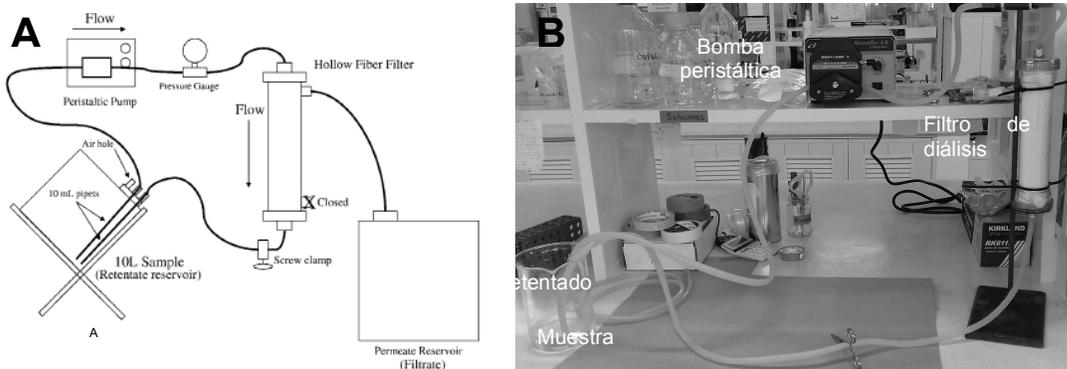


Figura 12. Aparato de ultrafiltración utilizado para concentrar las muestras de agua. (A) Esquema del aparato de ultrafiltración de 10 litros (Hill et al., 2005). (B) Fotografía del sistema de ultrafiltración utilizado en laboratorio (UCIA, 2016).

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 permeado cerrado. A las muestras de agua se les añadió una solución de NaPP 0.01% y éstas fueron agitadas manualmente para mezclar bien. Se circuló la muestra de agua en el sistema durante 8-10 min con el puerto del permeado cerrado. Se mantuvo la presión en el filtro entre los 6 y 10 psi. Se abrió el puerto de permeado para ir reduciendo el volumen del agua de la muestra y obtener el retentado con un volumen de 1 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 retro-lavado (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 retro-lavado 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 1L para cada muestra.

2.3.6 Detección de colifagos somáticos y F+ específicos, ensayo de doble capa

Se realizó el conteo de los colifagos con base al ensayo de doble capa de agar (U.S. Environmental Protection Agency method 1601) (USEPA, 2015). Se utilizaron las siguientes bacterias hospederas de *E. coli* para el conteo de colifagos somáticos: 1) ATCC 13706; y 2) ATCC 700609 CN-13 (resistente a ácido Nalidixico). Para el conteo de colifagos F+ específicos se utilizaron las cepas: 1) ATCC 700891 HS (pFAmp) (resistente a ampicilina) y 2) ATCC 15597 C-300. Todas las cepas hospederas fueron del American Type Culture Collection (ATCC), donadas por el laboratorio del Dr. Charles Gerba de la Universidad de Arizona.

Para cada ensayo se prepararon los siguientes medios: 1) TSA, Trypticase 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 tripticase 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 0.15% de ampicilina sódica + 0.15% sulfato de estreptomicina filtrada en una membrana de 0.22 µm ó 1% V/V de una solución 1% de ácido nalidíxico de sodio, filtrada en una membrana de 0.22 µm.

Se sembraron y cultivaron las bacterias en el medio TSB 24 hrs y se tomó un ml del cultivo anterior y se sembró en el medio enriquecido TSB 3 hrs para llevar las colonias a crecimiento exponencial. El tapete superior del ensayo de doble capa se preparó de acuerdo al Cuadro 8 y las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Cuadro 8. Elementos que se combinaron para crear la capa superior del ensayo de doble capa para la replicación de colifagos.

<i>Técnica de Doble capa</i>	<i>Cepas de E. coli sensibles a la infección por Colifagos Somáticos</i>		<i>Cepas de E. coli sensibles a la infección de Colifagos F+ específicos</i>		
	<i>ATCC® 13706™</i>	<i>ATCC® 700609™ CN13</i>	<i>ATCC® 15597™ C-300</i>	<i>ATCC® 700891™ (pFamp)</i>	<i>HS</i>
<i>Alícuota de muestra (10 ml)</i>	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	
<i>Tubos TSB semisólido. Baño María a 52°C</i>	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	
<i>Bacteria en cultivo de crecimiento exponencial en medio TSB 3 hrs</i>	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	
<i>Volumen total de la capa superior del ensayo doble capa</i>	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	
<i>Cajas Petri 5 cajas x bacteria x muestra</i>	5 cajas de Petri	5 cajas de Petri	5 cajas de Petri	5 cajas de Petri	

Después de 18 horas, se verificó 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 en unidades formadoras de placa o UFP/ml de la muestra original se midió tomando en cuenta los 10 ml repartidos en 5 cajas de Petri para cada

bacteria y en cada uno de los métodos. Para calcular la concentración de colifagos en la muestra directa y la muestra del ultrafiltrado, se realizó lo siguiente:

- 1) En el método directo, el valor de un mililitro es la concentración final del volumen y se calcula con la siguiente relación: P – Placas formadas, D – Dilución, PFU Unidad formadora de placa formada.

$$C_a = (P \div 10) \times D \text{ PFU/mL}$$

- 2) En el ultrafiltrado el número de colifagos en 10 ml representa el número total de colifagos contenido en los cien litros, por lo tanto, se multiplica primero por el litro concentrado y el valor de la concentración se divide entre los 100 L de la muestra.

$$C_b = \frac{C_a \times V_a}{V_b}$$

2.3.7 Comparación entre métodos directo y el ultrafiltrado

Se realizó la comparación del conteo de colifagos somáticos y F+ específicos mediante el número de UFP/100 ml (en órdenes de magnitud logarítmica) obtenido de cada método. La comparación se presentó en una tabla para comparar los resultados obtenidos de cada uno de los métodos en la lectura de la presencia de los colifagos en el ambiente.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Parámetros físico-químicos y bacteriológicos

Las temperaturas mínimas detectadas fueron de 24.4° C en el sitio 5 (dolina de agua dulce) y las más altas fueron de 30.5° C en el sitio 10 (agua salobre). Las temperaturas promedio mínimo fueron de 27.21° C y el promedio máximo de 28.08° C. Todos los sitios incluyendo las dolinas de agua dulce y los sitios salobres presentaron valores de pH arriba de 7.0 (sitios alcalinos). Los rangos de pH obtenidos fueron de 7.1 a 8.8 y de 8.1 a 8.5 en agua dulce y en agua salobre, respectivamente. El valor de pH más bajo fue de 7.1 en el sitio 6 y el valor más alto de 8.8 en el sitio 4, ambos sitios dolinas de agua dulce. El promedio de valores de pH en agua salobre fue mayor que los valores obtenidos para las dolinas de agua dulce. El rango de los valores de conductividad de las dolinas de agua dulce fue de 232 a 1272 $\mu\text{S cm}^{-1}$, mientras que el rango de conductividad para agua

salobre fue de 34235 a 49190 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Los valores de los sólidos disueltos totales de las dolinas de agua dulce variaron entre 0.14 a 0.80 g L^{-1} y los valores para el agua salobre entre 20.5- a 29.9 g L^{-1} (Cuadro 9).

Las temperaturas en la temporada de lluvias fluctuaron en las dolinas entre los 24.8 °C y 30.3 °C con promedio de 27.7 °C y para la temporada de secas, entre los 24.4°C y 29.6°C con promedio de 27.6 °C. El pH presentó entre dolinas un rango alcalino de entre pH 7.5 y pH 8.6, con promedio de pH 8.0 para la temporada de lluvias y pH 8.1 para la temporada de secas con una diferencia máxima de pH 0.4 entre temporadas. Los sitios salobres (9 y 10) mantienen la alcalinidad dentro del rango de los sitios de agua dulce. Los resultados se presentan en el cuadro 9. Los dos tipos de cuerpos de agua (agua dulce y agua salobre) presentaron rangos con valores diferenciales en la conductividad eléctrica; 232 a 1,129 $\mu\text{S/cm}$ y 34,403 a 49,071 $\mu\text{S/cm}$ en agua dulce y en agua salobre respectivamente. Los valores de los sólidos disueltos totales (SDT) disueltos en agua dulce y en agua salobre fueron entre 0.1 a 0.7 y 20.6 a 29.8 g/L .

Cuadro 9. Valores mínimos y máximos obtenidos de los diferentes parámetros fisicoquímicos en los 10 sitios de colecta que comprenden agua dulce y agua salobre.

Tipo de agua	Sitio	Temperatura	pH	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	Sólidos Disueltos Totales (g/L)
		(° C)	Min-Max	Min-Max	Min-Max
Agua dulce (cenotes)	1	27.2-29.4	7.5-7.9	232-436	0.14-0.26
	2	26.7-27.8	8.0-8.3	965-1272	0.60-0.80
	3	29.9-30.3	8.2-8.6	530-567	0.32-0.33
	4	27.1-28.6	8.2-8.8	883-901	0.55-0.55
	5	24.4-25.2	7.5-8.1	943-999	0.61-0.66
	6	25.7-25.9	7.1-8.0	961-1036	0.61-0.66
	7	24.7-24.8	7.4-7.6	1061-1131	0.69-0.74
	8	28.7-29.5	8.4-8.7	1087-1129	0.66-0.67
Agua salobre	9	28.2-28.8	8.1-8.5	42629-49190	26.1-29.9
	10	29.5-30.5	8.2-8.3	34235-45775	20.5-27.0

2.4.2 Detección y cuantificación de coliformes totales y densidades de *E. coli*

Se detectaron coliformes totales en el 100% de los sitios de muestreo durante la

temporada de lluvias y la temporada de secas. Durante la temporada de lluvias se detectaron concentraciones que van desde los 792 a más de 2,420 NMP por 100 ml con un promedio de 1,559 NMP/100ml. Durante la temporada de secas se detectaron concentraciones desde los 770 a más de 2,420 NMP por 100 ml con un promedio de 1,565 NMP/100ml. Los sitios con las mayores concentraciones de coliformes totales en la temporada de lluvias fueron el 4, 6 y 8 que corresponden a tres de las diez dolinas de agua dulce y el sitio 10 de agua salobre de tipo urbano (Figura 13A).

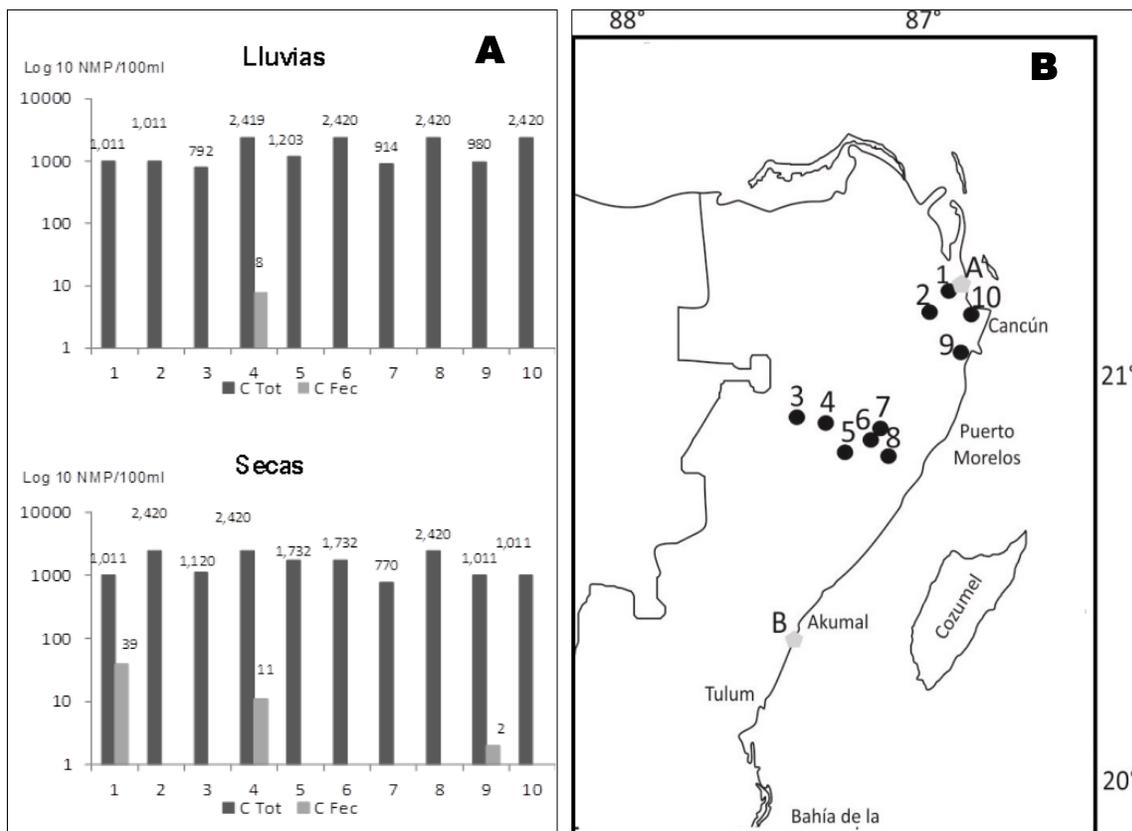


Figura 13. Concentración de coliformes totales y densidades de *E. coli*. A) Gráfica mostrando la concentración de Coliformes Totales (C Tot) y de *E. coli* (C Fec) en los 10 sitios de muestreo durante la temporada de lluvias y de secas. Los números arriba de cada barra representan la concentración absoluta en NMP/100 ml. B) Mapa mostrando la ubicación de los sitios de muestreo.

Como coliformes fecales (CF) se detectaron densidades de *E. coli* en el 10% de los sitios durante la temporada de lluvias y en el 30% de los sitios durante la temporada de secas, en concentraciones desde 2 a 39 NMP/100 ml (Figura 13A). La mayor densidad de *E. coli*

fue detectada durante la temporada de secas en el sitio 1 (Figura 13A) el cual corresponde a una dolina de agua dulce de tipo urbano (dentro de la ciudad de Cancún) (Figura 13B). Ninguno de los sitios superó densidades mayores a 40 NMP/100 ml (Figura 13A), por lo que la calidad del agua se encuentra dentro de los límites determinados para el uso del agua con contacto directo de los bañistas de acuerdo al Criterio ecológico CE.CCA.001189 *E. coli* <200 MNP/100 ml. Las densidades *E. coli* y el número de sitios positivos fueron mayores durante la temporada de secas.

2.4.3 Cuantificación directa de colifagos somáticos y F+ específicos

A continuación se presentan los resultados obtenidos con cada una de las cepas de *E. coli* obtenidos a partir del método de conteo directo (ver Figura 14):

13706. (Cepa ATCC® 13706™). Durante la temporada de lluvias se detectaron colifagos somáticos en el 80% de los sitios de muestreo con un rango de concentraciones entre 1×10^1 a 5.3×10^2 UFP/100ml. Durante la temporada de secas se detectaron colifagos somáticos en el 50% de las muestras con un rango de concentración de 1×10^1 a 2×10^2 UFP/100 ml.

CN13. (Cepa ATCC® 700609™ CN13) resistente a ácido nalidíxico (mutante de ATCC 13706). Durante la temporada de lluvias se detectaron colifagos somáticos en el 70% de los sitios de muestreo con un rango de concentraciones en los sitios positivos entre 1×10^1 a 9.2×10^2 UFP/100 ml. Durante la temporada de secas se detectaron en el 40% de las muestras con un rango de 1×10^1 a 1.9×10^2 UFP/100 ml.

15597. (Cepa ATCC® 15597™ C-300). Durante la temporada de lluvias se detectaron colifagos F+ específicos en el 50% de los sitios de muestreo, con un rango de concentraciones en los sitios positivos entre 1×10^1 a 3.3×10^2 UFP/100 ml y durante la temporada de secas con presencia en el 30% de las muestras con un rango de 1×10^1 a 1.1×10^2 UFP/100 ml.

FAMP. (Cepa ATCC® 700891™ HS pFamp) Resistente a ampicilina. Durante la temporada de lluvias no se detectaron colifagos F+ específicos mientras que en la temporada de secas se detectó su presencia en el 30% de las muestras con un rango de

1 x 10¹ a 5 x 10¹ UFP/100 ml.

En la temporada de lluvias fueron cuantificadas las concentraciones más altas de colifagos somáticos en los cultivos de la cepa CN13 y para la temporada de secas fueron cuantificadas las concentraciones más altas de colifagos somáticos en los cultivos en la cepa hospedera 13706. En ambas temporadas las concentraciones más altas de colifagos somáticos fueron detectadas en el sitio 2 que corresponde a una dolina de agua dulce del tipo urbano (Figura 14A).

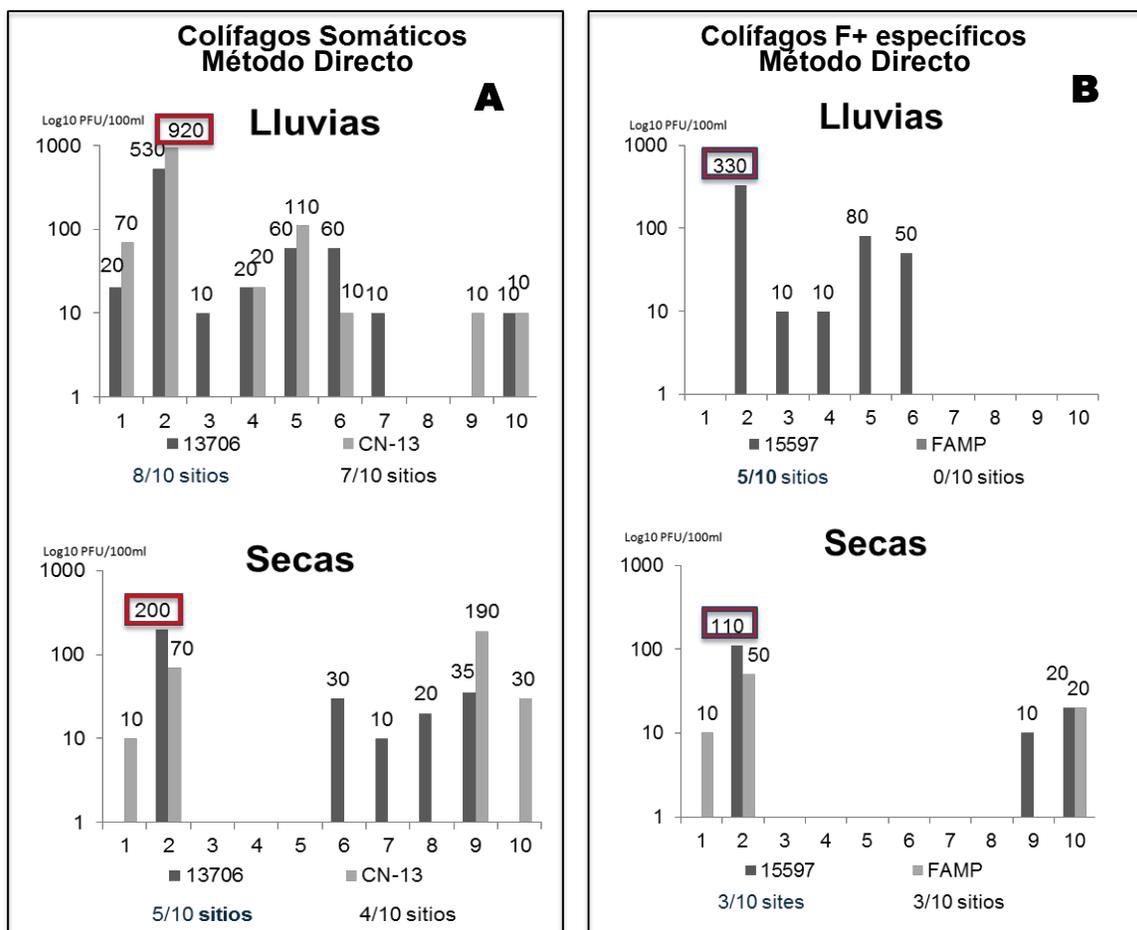


Figura 14. Gráficas de los resultados del muestreo de 10 sitios en el acuífero de Quintana Roo. A) Gráfica con las concentraciones de colifagos somáticos en log10 PFU/100 ml para temporada de lluvias y secas; B) Gráfica con las concentraciones de colifagos F+ específicos en en log10 PFU/100 ml para las temporada de lluvias y secas. En el recuadro rojo se resaltan las concentraciones más altas detectadas.

En la temporada de lluvias y de secas fueron cuantificadas concentraciones más altas de los colifagos F+ específicos en los cultivos de la cepa 15597. En ambas temporadas las concentraciones más altas fueron registradas en el sitio 2 que corresponde a una dolina de agua dulce del tipo urbano (Figura 14A y 14B).

Durante la temporada de lluvias se detectaron de manera simultánea los colifagos somáticos utilizando las dos cepas ATCC® 13706™ y ATCC® 700609™ CN13, en los sitios 1, y 2, que corresponden a dolinas de agua dulce de tipo urbano; los sitios 4, 5, 6, que corresponden a dolinas de agua dulce uso recreativo y el sitio 10 que corresponde a un sitio de agua salobre (Figura 14A). Sin embargo, durante la temporada de secas se detectaron de manera simultánea los colifagos somáticos utilizando las mismas cepas en solamente dos sitios, el sitio 2 que corresponde a una dolina de agua dulce de tipo urbano y en el sitio 9 que corresponde a un sitio de agua salobre (Figura 14A). En el caso de los colifagos F+ específicos se detectaron de manera simultánea los colifagos utilizando las dos cepas ATCC® 15597™ C-300 y ATCC® 700891™ HS (pFamp), solamente durante la temporada de secas en dos sitios, el 2 que corresponden a dolinas de agua dulce de tipo urbano y el 10 que corresponde a un sitio de agua salobre (Figura 14B).

2.4.4 Cuantificación de colifagos somáticos y F+ específicos después de la ultrafiltración

A continuación se presentan los resultados obtenidos con cada una de las cepas de *E. coli* utilizando como muestra 10 ml del volumen del concentrado después de la ultrafiltración (ver Figura 15).

13706. Cepa ATCC® 13706™. Durante la temporada de lluvias se detectaron colifagos somáticos en el 70% de los sitios de muestreo con un rango de concentraciones en los sitios positivos entre 2×10^{-1} a 6.6×10^1 UFP/100 ml. Durante la temporada de secas con presencia en el 80% de las muestras con un rango de 1×10^{-1} a 1.4×10^1 UFP/100 ml.

CN13. Cepa ATCC® 700609™ CN13: Durante la temporada de lluvias se detectaron colifagos somáticos en el 80% de los sitios de muestreo con un rango de concentraciones en los sitios positivos entre 2×10^{-1} a 9.4×10^1 UFP/100 ml. Durante la temporada de

secas con presencia de colifagos somáticos en el 70% de las muestras con un rango de 1×10^{-1} a 1.7×10^1 UFP/100ml.

15597. Cepa ATCC® 15597™ C-300. Durante la temporada de lluvias se detectaron colifagos F+ específicos en el 80% de los sitios de muestreo con un rango de concentraciones en los sitios positivos entre 3×10^{-1} a 6.1×10^1 UFP/100 ml. Durante la temporada de secas con presencia de colifagos F+ específicos en el 50% de las muestras con un valor de 1×10^{-1} a 7×10^0 UFP/100 ml.

FAMP. Cepa ATCC® 700891™ HS (pFamp): Durante la temporada de lluvias se detectaron colifagos F+ específicos en sólo un sitio (10%) con una concentración de 2×10^{-1} . Durante la temporada de secas con presencia de colifagos F+ específicos en el 20% de las muestras con valores de 1×10^{-1} a 7×10^{-1} UFP/100ml.

En la temporada de lluvias fueron cuantificadas las concentraciones más altas de colifagos somáticos en los cultivos de la cepa CN13 en el sitio 2 que corresponde a una dolina de agua dulce del tipo urbano, mientras que para la temporada de secas las concentraciones más altas fueron cuantificadas con la misma cepa hospedera pero en el sitio 9 que corresponde a agua salobre (Figura 15A).

En la temporada de lluvias y de secas fueron cuantificadas concentraciones más altas de los colifagos F+ específicos en los cultivos de la cepa de 15597 y ambas fueron registradas en el sitio 2 que corresponde a una dolina de agua dulce del tipo urbano (Figura 15B).

Durante la temporada de lluvias se detectaron de manera simultánea los colifagos somáticos utilizando las dos cepas 13706 y CN13, en los sitios 2 y 3, que corresponden a dolinas de agua dulce de tipo urbano; los sitios 4, 5, 7, que corresponden a dolinas de agua dulce uso recreativo y los sitios 9 y 10 que corresponden a sitios de agua salobre (Figura 15A). Durante la temporada de secas se detectaron de manera simultánea los colifagos somáticos utilizando las mismas cepas en en los sitios 1, 2 y 3 que corresponde a dolinas de agua dulce de tipo urbano, en el sitio 4, 6 y 7 que corresponden a dolinas de agua dulce de uso recreativo y en el sitio 9 que corresponde a un sitio de agua salobre (Figura 15A). En el caso de los colifagos F+ específicos se detectaron de manera

simultánea utilizando las dos cepas 15597 y Famp, solamente durante la temporada de lluvias en el sitio 5, que corresponde a una dolina de agua dulce de tipo recreativo y durante la temporada de secas en el sitio 2 que corresponde a un sitio de agua dulce urbano y al sitio 10 que corresponde a un sitio de agua salobre (Figura 15B).

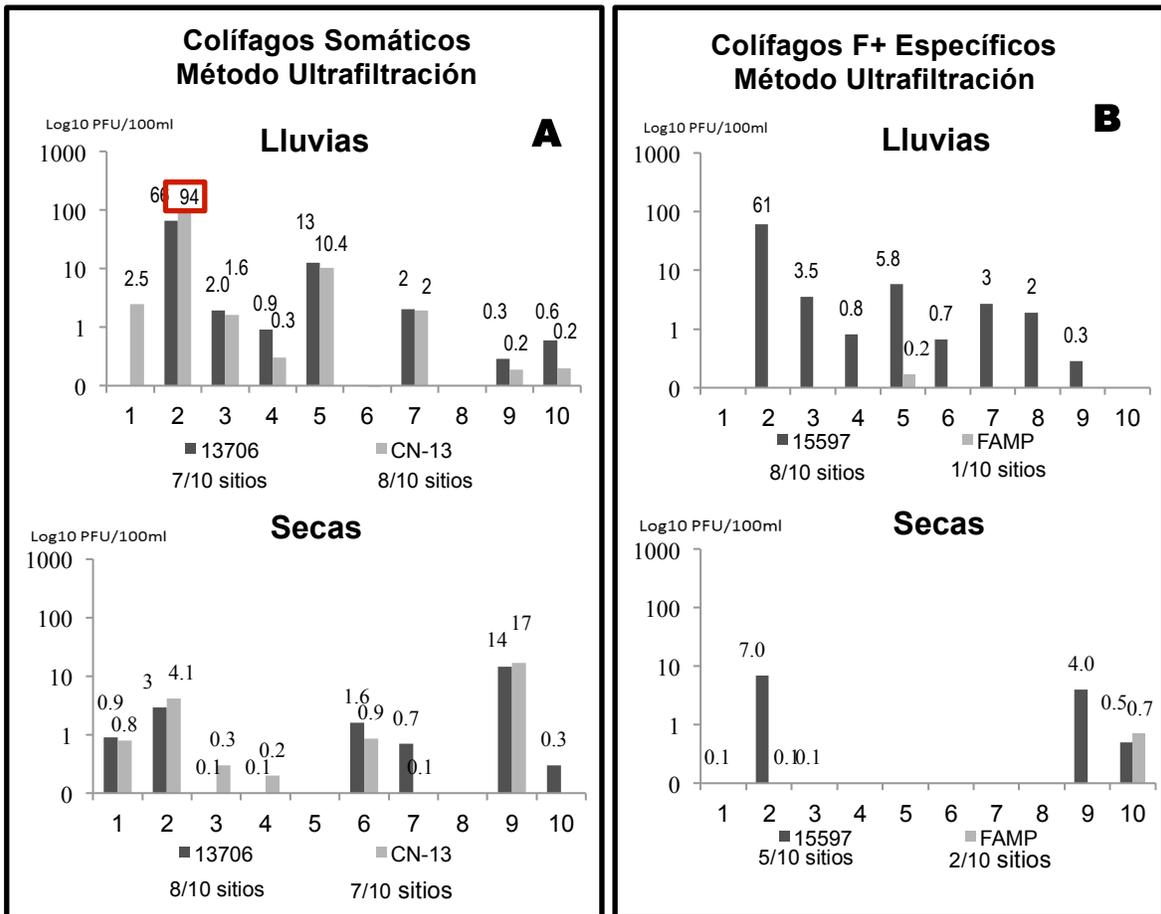


Figura 15. Gráficas de las concentraciones obtenidas por ultrafiltración del muestreo de 10 sitios en el acuífero de Quintana Roo. A) Gráfica con las concentraciones de colifagos somáticos en log para temporada de lluvias y secas; B) Gráfica con las concentraciones de colifagos F+ específicos en en log10 PFU/100 ml para las temporada de lluvias y secas. En el recuadro rojo se resaltan las concentraciones más altas detectadas.

En la temporada de lluvias se detectaron colifagos F+ específicos en todas las dolinas de agua dulce de uso recreativo (sitios del 4 al 8), mientras que en la temporada de secas no fueron detectados. Se detectaron a los colifagos F+ específicos utilizando la cepa Famp solamente en dos sitios, uno en la temporada de lluvias, en el sitio 5 que corresponde a

dolinas de agua dulce de tipo urbano y otro en la temporada de secas en el sitio 2 de agua dulce urbano y el 10, que corresponde a un sitio de agua salobre (Figura 15B).

2.4.4 Comparación de los métodos de conteo de colifagos somáticos y F+ específicos

Se realizó la comparación entre la presencia de colifagos somáticos y colifagos F+ específicos a partir de los resultados obtenidos con las cuatro cepas de *E. coli*, cuantificados a partir del método de conteo directo y de la muestra concentrada después de la ultrafiltración (Cuadro 10).

Cuadro 10. La presencia o ausencia de colifagos somáticos y colifagos F+ específicos durante la temporada de lluvias y la temporada de secas en cada uno de los diez sitios de muestro en el conteo directo y el conteo después de la ultrafiltración.

Tipo de Sitio y agua	Temporada	
	Lluvias	Secas
	Conteo directo Colifagos somáticos /colifagos F+ específicos (Conteo después de ultrafiltrado Colifagos somáticos /colifagos F+ específicos)	Conteo directo Colifagos somáticos /colifagos F+ específicos (Conteo después de ultrafiltrado Colifagos somáticos /colifagos F+ específicos)
1 Dolina de agua dulce de tipo urbano	+/- (+/-)	+/+ (+/-)
2 Dolina de agua dulce de tipo urbano	+/+ (+/+)	+/+ (+/+)
3 Dolina de agua dulce de tipo urbano	+/+ (+/+)	-/- (+/-)
4 Dolina de agua dulce de tipo recreativo	+/+ (+/+)	-/- (+/-)
5 Dolina de agua dulce de tipo recreativo	+/+ (+/+)	-/- (-/-)
6 Dolina de agua dulce de tipo recreativo	+/+ (-/+)	+/- (+/-)
7 Dolina de agua dulce de tipo recreativo	+/- (+/+)	+/- (+/-)
8 Dolina de agua dulce de tipo recreativo	-/- (-/+)	+/- (-/-)
9 Agua salobre de tipo urbano	+/- (+/+)	+/+ (+/+)
10 Agua salobre de tipo urbano	+/- (+/-)	+/+ (+/+)

Conteo directo. En la temporada de lluvias la presencia simultanea de colifagos somáticos y colifagos F+ específicos fue del 50% del total de los sitios, mientras que en temporada de secas fue del 40% (Cuadro 10).

Conteo después del ultrafiltrado. En la temporada de lluvias la presencia simultanea de colifagos somáticos y colifagos F+ específicos fue del 50% del total de los sitios, mientras que en temporada de secas fue del 30% (Cuadro 10).

Mediante el método de conteo directo, se detectaron colifagos somáticos en el 90% de los sitios durante la temporada de lluvias, mientras que con el método utilizando el ultrafiltrado, se detectaron en el 80% de los sitios (Figuras 14 y 15). La diferencia principal fue que mediante el método de conteo por ultrafiltrado no se detectaron colifagos somáticos en el sitio 6, que corresponde a una dolina de agua dulce de uso recreativo. Mediante el método de conteo directo se detectaron colifagos somáticos durante la temporada de secas en el 70% de los sitios, mientras que con el método utilizando el ultrafiltrado se detectaron en el 80% (Figuras 14 y 15). En este caso, utilizando el método de conteo directo no se detectaron colifagos somáticos en los sitios 2, y 3 que corresponden a dolinas de urbanas y en el 4 que corresponde a una dolina de uso recreativo, y mediante el conteo después del ultrafiltrado no se detectaron en los sitios 5 y 8 que corresponden a dolinas de uso recreativo.

Mediante el método de conteo directo, se detectaron colifagos F+ específicos en el 50% de los sitios durante la temporada de lluvias, mientras que con el método utilizando el ultrafiltrado, se detectaron en el 80% de los sitios (Figuras 14 y 15). La diferencia principal fue que mediante el método de conteo directo no se detectaron colifagos F específicos en los sitios 7 y 8 que corresponden a dolinas de agua dulce de uso recreativo y en el sitio 9 que corresponde a agua salobre de tipo urbano. Mediante el método de conteo directo se detectaron colifagos F+ específicos durante la temporada de secas en el 40% de los sitios, mientras que con el método utilizando el ultrafiltrado se detectaron en el 30% (Figuras 14 y 15). La única diferencia entre los métodos fue que en el método de conteo por ultrafiltrado no se detectaron colifagos F+ específicos en el sitio 1 que corresponde a una dolina de agua dulce de tipo urbano.

Con base en los resultados obtenidos, se puede determinar para la identificación de los sitios positivos para colifagos somáticos el uso del método directo y del método de ultrafiltrado dio resultados similares. Sin embargo, para la identificación de sitios positivos para colifagos F+ específicos, el método de conteo por ultrafiltrado fue más eficiente durante la temporada de lluvias, pero ambos métodos dieron resultados similares durante la temporada de secas. Como conclusión de la comparación de métodos, puede decirse que el método de conteo directo fue exitoso para determinar la concentración tanto de colifagos somáticos como de colifagos F+ específicos. Este método es eficiente y

económico ya que no requiere del procesamiento de la muestra de agua (ultrafiltración). Sin embargo, es importante resaltar que el método de conteo después de la ultrafiltración fue más eficiente para detectar colifagos F+ específicos durante la temporada de lluvias.

En el cuadro 11 se presenta la comparación entre los resultados de la concentración de colifagos por cepa hospedera y tipo de colifago. Las cepas ATCC 13706 y ATCC 700609CN-13 fueron eficientes para detectar colifagos somáticos con ambos métodos. Sin embargo, puede observarse que se obtuvieron mayores concentraciones de colifagos somáticos mediante el uso del método de conteo directo en comparación con las concentraciones obtenidas con el uso del método de conteo después del ultrafiltrado (Cuadro 11). La cepa hospedera ATCC15597C-300 fue eficiente para realizar la cuantificación de colifagos F+ específicos con ambos métodos. Además, los resultados muestran que la cepa ATCC700891HSpFAmp para detectar colifagos F+ específicos no fue eficiente o no aportó información diferente a la obtenida con la cepa ATCC15597C-300 (Cuadro 11).

En algunos casos, el método de conteo después de la ultrafiltración permitió detectar colifagos utilizando cepas hospederas diferentes en las cuales no se detectaron colifagos con el método directo (ejemplos: sitios 3, 4) dependiendo de la temporada de lluvias y secas.

De manera general se puede observar que el método directo permite la cuantificación tanto de colifagos somáticos como F+ específicos en los diferentes sitios de muestreo, en muestras de agua dulce y en muestras de agua salobre. La principal diferencia entre los métodos utilizados para el conteo de colifagos reside en la concentración que se obtiene con cada método. Esto puede ser el resultado de la eficiencia del sistema de ultrafiltración que fue utilizado en el presente trabajo. El método de conteo directo requiere menos tiempo para procesar la muestra y es menos costoso, además de ser un método eficiente para enumerar tanto colifagos somáticos como F+ específicos.

Cuadro 11. Concentración en magnitudes logarítmicas (cada cuadro representa una un orden de magnitud) de las UFP/100 ml encontradas en los grupos de colifagos reconocidos con las cepas bacterianas, para cada uno de los sitios muestreados y para cada uno de los métodos de obtención utilizados. El cuadro negro significa la temporada de lluvias y el cuadro gris la temporada de secas.

Tipo de sitio	Sitio	Método de conteo Directo				Método de conteo después de la ultrafiltración																				
		Colifagos	Somáticos	Colifagos	F+ Específicos	Colifagos	Somáticos	Colifagos	F+ Específicos																	
		ATCC 13706	ATCC 700609C N-13	ATCC155 97C-300	ATCC700891 HSpFAmp	ATCC 13706	ATCC7006 09CN13	ATCC155 97-300	ATCC700891 HSpFAmp																	
		x10 ⁽¹⁾				x10 ⁽¹⁾																				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4					
Urbanos Agua dulce	1	■	■				■	■																		
	1	■	■				■	■																		
	2	■	■	■	■		■	■	■	■		■	■				■	■								
	2	■	■	■	■		■	■	■	■		■	■				■	■				■				
	3	■	■				■	■				■	■				■	■								
Dolinas de agua dulce de tipo recreativo	4	■	■				■	■																		
	4																									
	5	■	■				■	■				■	■				■	■								
	5	■	■				■	■				■	■				■	■								
	6	■	■				■	■				■	■				■	■								
Urbano salobre	6	■	■				■	■				■	■				■	■								
	7	■	■				■	■				■	■				■	■								
	7	■	■				■	■				■	■				■	■								
	8	■	■				■	■				■	■				■	■								
	8	■	■				■	■				■	■				■	■								

2.5 DISCUSIÓN

Existen diferentes factores ambientales como el gradiente de precipitación, la influencia del agua marina en ambientes acuáticos cercanos a las costas y diferentes variables fisicoquímicas como la conductividad, el pH, el oxígeno disuelto, entre otros, que influyen en la diversidad de los ecosistemas acuáticos del sistema acuífero de la Península de Yucatán (Pérez et al., 2012). El sistema acuífero es un sistema donde cada sitio es característico y los parámetros fisicoquímicos están modulados por la porosidad del material cárstico, la iluminación, la profundidad de la tabla de agua y el tiempo de formación (Schmitter-Soto et al., 2002).

En el presente trabajo se registraron temperaturas en el agua en ambas temporadas, de entre los 24.4°C a 30.3°C, las cuales se encuentran dentro del rango reportado previamente en diferentes ecosistemas del acuífero de la PY (Alcocer et al., 1998; Schmitter-Soto et al., 2002; Pérez et al., 2012). Pueden ocurrir variaciones de temperatura en sentido horizontal y vertical en las dolinas de acuerdo a la temporada del año, sin embargo, las temperaturas promedio de 24–29°C reportadas (Schmitter-Soto et al., 2002), coinciden con las temperaturas obtenidas en el presente estudio, donde se tomaron muestras en la superficie de las dolinas y de los cuerpos de agua salobre. En cuanto a los valores de pH Hall (1936) y Schmitter-Soto et al., (2002) reportan valores básicos para el epilimnion de los cenotes y valores alcalinos de pH de hasta 8.6 en dolinas del interior. En el presente trabajo, se reportaron valores similares de entre pH 7.5 a pH 8.6. Los valores de conductividad eléctrica del agua dulce de los sitios muestreados se presentaron en un rango de entre 232 a 1, 187 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para agua dulce y 33, 403 a 49, 071 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para agua salobre. Estos valores se encuentran en los rangos reportados previamente para diferentes cenotes de agua dulce, de 42.5 a 7,390 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Schmitter-Soto et al., 2002) y para agua salobre de hasta 55,300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Pérez et al., 2012). Se ha reportado que entre más se alejan los cuerpos de agua de la costa los valores de conductividad eléctrica se reducen significativamente y la conductividad hidráulica del acuífero puede ser mucho menor (Bauer-Gottwein et al., 2011). La concentración de los sólidos disueltos totales (SDT) en las dolinas tienen una concentración uniforme típica de agua dulce (<3 g/l) (Schmitter-Soto et al., 2002); los valores obtenidos en los sitios de muestreo fueron < 1g/L para los sitios de agua dulce y >20g/L para los sitios de agua salobre. Los parámetros

fisicoquímicos encontrados fueron homogéneos en los sitios de agua dulce y agua salobre, concuerdan con lo reportado previamente para el sistema acuífero (Schmitter-Soto et al., 2002; Pérez et al., 2012).

La concentración de las bacterias coliformes totales y fecales (en especial de *E. coli*) se utilizan comúnmente para estimar eventos recientes de contaminación fecal y son utilizadas como indicadores para determinar la calidad del agua (Plummer et al., 2014). Las normas contemplan a los coliformes totales como indicadores de la calidad del agua para consumo en la norma mexicana NOM-127-SSA1-1994. Las bacterias coliformes totales son un grupo diverso y se consideran habitantes comunes de ambientes edáficos y acuáticos que no han sido afectados por la contaminación fecal y aunque su presencia no se considera un riesgo para la salud, mas bien indica que la contaminación fecal pudo haber ocurrido y que otros organismos patógenos podrían estar presentes en el medio acuático (Lin y Ganesh, 2013). Los coliformes totales son poco confiables para determinar la contaminación fecal ya que muchos de ellos son capaces de crecer tanto en el medio ambiente como en los sistemas de distribución de agua potable (LeChevallier, 1990, Camper et al., 1991; Szewzyk et al., 1994). Lo anterior explica porque coliformes totales se detectaron en todos los sitios muestreados durante las dos temporadas en concentraciones mayores de 770 NMP/100 ml, similar a lo reportado en dolinas de la región (Leal-Bautista et al., 2011). Es interesante resaltar que las densidades de *E. coli* fueron detectadas en pocos sitios, sin embargo, esto indica eventos de contaminación fecal reciente. Las concentraciones de *E. coli* encontradas (con un máximo de 39 NMP/100ml) estuvieron por debajo de los estándares del Criterio Ecológico CE.CCA-001789: *E. coli* <200 NMP/100 ml para agua de uso recreativo. En otros sitios similares en la región se ha reportado que las densidades de *E. coli* varían durante el año y en muchos casos se encuentran en concentraciones menores a <200 NMP/100 ml (Leal-Bautista et al., 2011; Hernández-Terrones et al., 2011). También es importante mencionar que Yalcin y Muhammetoglu, (2011) reportaron la inactivación de *E. coli* en pocas horas (24-36 hr) en el agua dependiendo de variables como la salinidad, la temperatura y la radiación solar. En este estudio, la cuantificación de las densidades de *E. coli* se realizó en la superficie del agua, en donde la radiación solar es un factor importante para determinar su sobrevivencia (Sinton et al., 2002), lo que puede afectar la concentración encontrada.

A pesar de que las bacterias coliformes se utilizan comúnmente para determinar la calidad del agua, éstas no siempre reflejan el riesgo de la presencia de otros patógenos en el agua como los virus (Marion et al., 2014). Los colifagos (virus que infectan bacterias coliformes) se consideran por diversos autores, como mejores indicadores de contaminación fecal (Armon et al., 2015), ya que son abundantes en el agua residual, comparten diferentes propiedades con los virus entéricos y son resistentes a factores ambientales y persistentes en el ambiente acuático, por lo tanto son mejores indicadores de la calidad del agua que las bacterias fecales (Skraber et al., 2004; Agulló-Barceló et al., 2016; Jofre et al., 2016). Hay dos grupos principales de colifagos que infectan a la bacteria *E. coli*, los somáticos y los F+ específicos, los cuales han sido utilizados como indicadores fecales y virales por años (Jofre et al., 2016). En el presente trabajo las concentraciones más altas tanto de colifagos somáticos como de colifagos F+ específicos, cuantificados con el método directo y con el método después de la ultrafiltración, fueron más altas durante la temporada de lluvias. Lo anterior puede asociarse a eventos de escorrentía, por ejemplo, el agua de lluvia puede transportar sedimentos, bacterias e incluso virus (Reed et al., 2011; Williamson et al., 2014). En Quintana Roo, la temporada de lluvias en la que se realizaron las colectas registró un volumen de 394 milímetros de pp en el mes de junio, lo anterior fue superior al volumen de agua de años anteriores (170 mm en junio) (INEGI; Anuario estadístico y geográfico de Quintana Roo, 2016), lo que sugiere que el incremento en las concentraciones encontradas fue debido a la escorrentía. Lo anterior es importante ya que en otros lugares como en el Lago Erie, de la South Bass Island, en Ohio, se reportó la presencia de contaminación de origen fecal en los pozos del acuífero, asociados a un brote epidémico que afectó a 1, 450 personas después de intensas lluvias (Fong et al., 2007).

Algunos tipos de colifagos F+ específicos (en especial los del tipo II) han sido correlacionados con virus entéricos como los adenovirus y han sido propuestos como indicadores de contaminación por drenaje (Arredondo-Hernández et al., 2017). En el presente trabajo los colifagos F+ específicos fueron detectados en altas concentraciones en una dolina de agua dulce de tipo urbano (sitio 2), tanto en la temporada de lluvias como en la temporada de secas, utilizando los métodos de conteo directo y de conteo después de la ultrafiltración. Lo anterior sugiere que este sitio, el cual está en la ciudad de Cancún y se encuentra rodeado por viviendas, puede estar recibiendo contaminación

debida a fallas en el drenaje o por filtraciones en los sistemas sépticos, como lo reportan en otros sitios similares en la región (Marín et al., 2000; Pacheco et al., 2000).

En México no existe una norma que obligue a detectar la presencia de patógenos virales en los cuerpos de agua, sin embargo, se ha demostrado que los colifagos pueden ser buenos indicadores para determinar la calidad del agua (Jofre et al., 2016), e incluso en México han sido utilizados exitosamente para determinar contaminación por agua residual en lugares como el río Magdalena, el río Cuitzmala, los canales de Xochimilco, todos estos situados en la región del centro de México (Arredondo-Hernández et al., 2017). Los resultados del presente trabajo demuestran por primera vez la presencia de colifagos somáticos y F+ específicos en el sistema acuífero cárstico de la PY, por lo que éstos podrían utilizarse como indicadores complementarios para la calidad del agua en la región.

CAPÍTULO III

3.0 DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS ADENOVIRUS HUMANOS (HADVS) PRESENTES EN CUERPOS DE AGUA EN EL SISTEMA ACUÍFERO DEL NORTE DE QUINTANA ROO.

3.1 INTRODUCCIÓN

En el sistema acuífero de la Península de Yucatán (PY) se han reportado diversos contaminantes de origen humano de todo tipo, incluyendo microorganismos patógenos. Estos contaminantes pueden ingresar al sistema acuífero por medio de la materia fecal por diversas vías como el acarreo y la filtración de heces dispuestas en el medio ambiente, la gestión del agua residual y doméstica, los servicios turísticos, las filtraciones de alcantarillas, fallas en las fosas sépticas, la insuficiencia en los tratamientos de agua residual, entre otros. Diversos estudios han reportado la presencia de contaminantes de tipo orgánico y microbiológico en el acuífero de la PY (Marín y Perry, 1994; Pacheco y Cabrera, 1997; Alcocer, 1998; Pacheco et al., 2000; Marin et al., 2000; Beddows et al., 2002; Beddows, 2003; Ávila et al., 2004; Marin et al., 2005). La mayoría de los estudios en la región reportan la presencia de bacterias fecales y patógenas (Hernández-Terrones et al., 2011; Leal-Bautista et al., 2011), sin embargo, entre los contaminantes del agua se pueden encontrar también a los virus entéricos (Mascipinto et al., 2010; Bradbury et al., 2013; Stevenson et al., 2015). La transmisión de estos virus es por la vía fecal-oral a través del contacto directo con alimentos y agua contaminados, lo anterior es un problema de salud pública en el mundo (Bofill-Mas et al 2005) y en México (Hernández et al., 2011).

La mayoría de los tratamientos de aguas residuales son eficientes para reducir las poblaciones de los organismos indicadores (*E. coli*), sin embargo, no siempre se cuenta con métodos para eliminar o reducir las concentraciones de virus (Keswick et al., 1984). Los virus son resistentes a la radiación UV y la cloración (Gerba et al., 2002, Thurston-Enriquez et al., 2003b), por lo tanto, éstos pueden llegar a contaminar los cuerpos de agua a través de la recarga del agua residual tratada (Lipp et al., 2001). Entre los virus entéricos, los Adenovirus humanos (HAdVs) han sido detectados frecuentemente en diferentes cuerpos de agua (Muscillo et al., 2008; Aslan et al., 2011), ya que éstos

sobreviven más que otros virus entéricos en el ambiente acuático y se han detectado en ríos, lagos, aguas costeras, albercas y pozos (Chapron et al., 2000; Haramoto et al., 2007; Bofill-Mas et al., 2010; Hartmann et al., 2013). Las concentraciones de HAdVs liberadas en el ambiente acuático pueden ser muy altas, por ejemplo, en las excretas en pacientes pediátricos infectados, se han detectado concentraciones entre 10^3 a 10^{10} partículas/gr (Lion, 2010). Los HAdVs pueden causar infección en el humano al inhalar o consumir agua contaminada, incluso durante actividades recreativas (van Heerden et al., 2005; Muscillo, 2008; Tong y Lu, 2011). Son responsables de la mayoría de los brotes infecciosos de albercas y aguas recreativas (Cuadro 12), provocando conjuntivitis e infección en vías respiratorias y gastrointestinales (Sinclair et al, 2009), preferentemente en niños menores de 5 años. Son estables en el medio ambiente más que cualquier otro virus (Bofill-Mas et al., 2006), incluso superan el tiempo de permanencia de otros enterovirus (Pina et al., 1998; Hartmann et al., 2013) y de bacterias que se utilizan comúnmente como indicadoras de la calidad del agua (Romero et al., 2010; Hartmann et al., 2013).

Cuadro 12. Brotes infecciosos de Adenovirus registrados en diferentes años y lugares (tomado de Sinclair et al., 2009).

<i>Año</i>	<i>Lugar</i>	<i>Fuente</i>	<i>Número de personas</i>	<i>Tipo</i>	<i>Referencia</i>
1951	Colorado	Alberca	206	APC	Cockburn (1953)
1954	Canada	Alberca	112	APC	Ormsby H.L. et al.,(1955)
1955	Suecia	Lago	125	3	Kjellen et al.,(1957)
1959	Japón	Alberca	124	3	Kaji M. et al.,(1961)(1961)
1960	Japón	Alberca	48	3	Kaji M. et al.,(1961). (1961)
1966	Washington	Alberca	26	3	Foy et al.,(1968)
1973	Kansas	Alberca	44	7	Caldwell et al. ,(1974)
1977	Georgia	Alberca	105	3	Martone et al., (1980)
1977	Georgia	Alberca	72	4	D'Angelo L.J. et al., (1979)
1982	Oklahoma	Alberca	77	7a	Turner et al. (1987)
1991	Norte de Carolina	Estanque	595	3	Moore et al. (1993)
1995	Grecia	Alberca	80		Papapetropoulou and Vantarakis (1998) Harley
2000	Australia	Alberca	34	3	Harley et al., (2001)

Se cuenta con el registro de la prevalencia de los adenovirus (anteriormente APS) desde la mitad del siglo pasado, en diversas comunidades de Washington, DC y Leesburg, Virginia, (Bell et al., 1955; McKeey Wolf, 1963). Actualmente los Adenovirus de la especie F con los serotipos 40 y 41, son la segunda causa de gastroenteritis en infantes en el mundo (Ogorzaly et al., 2010). Se ha reportado que los HAdVs tienen un perfil más estable en el agua subterránea y que pueden permanecer en este ambiente por tiempos largos incluso cuando no se detecta la presencia de indicadores fecales (Ogorzaly et al., 2010). En México se ha reportado la presencia de Adenovirus serotipos 40 y 41 en el río Magdalena y el río Eslava del área metropolitana de la Ciudad de México (Mazari-Hiriart et al., 2014), sin embargo, a pesar de que los HAdVs son frecuentemente detectados en ambientes acuáticos y a que su presencia en el agua representa un riesgo para la salud humana, en Quintana Roo aún no se cuenta con datos sobre su presencia en el ambiente acuático. Por lo tanto, el objetivo principal del presente capítulo es detectar, cuantificar e identificar a los adenovirus presente en el sistema acuífero del norte de Quintana Roo.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo general

Detectar, cuantificar e identificar a los adenovirus humanos (HAdVs) presentes en cuerpos de agua en el sistema acuífero del norte de Quintana Roo.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Detectar e identificar los serotipos de adenovirus presentes en 10 sitios durante la temporada de lluvias y de secas
2. Determinar la concentración de adenovirus en los 10 sitios de muestreo durante la temporada de lluvias y secas
3. Realizar la reconstrucción filogenética de los serotipos de adenovirus identificados

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Área de estudio y colecta de muestras de agua

El área de estudio y la colecta de las muestras de agua utilizadas para la detección de HAdVs en el presente capítulo, se detallaron en la sección de materiales y métodos del Capítulo II.

3.3.2 Extracción del ADN total

Para concentrar las partículas virales a partir del volumen obtenido del retentado resultado de la ultrafiltración (ver metodología en el Capítulo II), se le añadió una solución de PEG al 12%/NaCl-0.8 M, ésta se dejó reposar toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 7,000 rpm por 30 min a 4°C en tubos falcon de 50 ml, las veces necesarias hasta terminar de centrifugar el total del volumen. Las pastillas obtenidas se re-suspendieron en 5 ml de una solución de Buffer fosfato salino (PBS 1 ml + 4 ml H₂O) y se le agregaron 5 ml de butanol-cloroformo (1:1), se agitó por inversión y se centrifugó a 7,000 rpm 15 min a 4°C. Se obtuvo un volumen de final de 10 a 17 ml, el sobrenadante se centrifugó utilizando el dispositivo Centriprep® YM-50, 50KDa NMWL siguiendo las instrucciones del fabricante. Se centrifugó dos veces a 2,500 rpm por 10 min a 4°C y se obtuvo un volumen final de 10 a 15 ml que fue almacenado a -20°C.

Para purificar el ADN se utilizó el kit QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN obtenido se resuspendió en un volumen de 50 µl y fue almacenado a -20°C.

3.3.3 Detección de HAdVs por PCR punto final

Se utilizaron 5 µl del ADN purificado como templado para realizar la amplificación de los adenovirus por PCR punto final anidado. Para realizar el PCR anidado se utilizaron los cebadores reportados por Tong et al., (2011) para identificar HAdVs en ambientes acuáticos. Para la primera amplificación se utilizaron cebadores que amplifican un fragmento de 301 pb del gen Hexón de la cápside y son: hex1deg fr 5'GCCSARTGGKCWTACATGCACATC3' (Primers Sigma® al 0.2µM, 0.5µl) y rev. hex2deg 5' CAGCACSCCICGRATGTCAAA 3' (Primers Sigma® al 0.2µM, 0.5µl). Se

utilizó agua para los controles negativos y plásmidos con los insertos de interés como controles positivos. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C por 5 minutos; 45 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Para el PCR anidado se utilizó una alícuota de 2 µl del producto de la primera amplificación para amplificar un fragmento de 172 pb: nehex3deg fr 5' GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC 3' y rev nehex4deg 5' CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGT 3'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94 °C por 5 minutos; 45 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

Los amplicones de 172 pb fueron ligados en el vector el pGEM®-T Easy Vector System I (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. Con los productos de la ligación se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* DH5α mediante choque térmico (Sambrook y Russel, 2001). Las bacterias transformadas se sembraron en medio sólido de LB con ampicilina (100 mg/ml) y X-gal (30 µl de 20µg/ml). Las placas se incubaron durante 16 hrs a 37°C y se almacenaron a 4°C. Se seleccionaron las colonias recombinantes (blancas) para su cultivo en medio líquido de LB (Sigma® L7658) con ampicilina 1:100 (Applichem A0839 1%), las bacterias fueron incubadas durante 16 hrs a 37°C en agitación. Los plásmidos se extrajeron por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Se tomaron 3 µl plásmido extraído y para confirmar la presencia de los insertos se digirió con la enzima *EcoRI*. Una vez comprobada la presencia del inserto y del vector, se seleccionaron las muestras positivas, y estas se diluyeron 0.5 µl del plásmido en 4.5 µl de agua de calidad molecular y 5 µl del primer M13 (20 pmolar). Las muestras se mantuvieron a -4°C hasta su envío a Macrogen Inc., Corea para su secuenciación.

3.3.4 Identificación de serotipos de HAdVs

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Finch TV (<http://www.geospiza.com/ftvdlinfo.html>) para eliminar los nucleótidos correspondientes al vector de clonación y obtener la secuencia del fragmento de 172 pb del hexon de HAdVs.

Las secuencias editadas se compararon con las referencias existentes en la base de datos del GenBank NCBI mediante BLAST. Para realizar la identificación de los serotipos se obtuvieron los primeros hits obtenidos en el BLAST y como criterio para realizar la identificación se utilizó >94% de identidad de nucleótidos.

3.3.5 Cuantificación de HAdVs por qPCR

Se preparó una curva estándar mediante la dilución serial de DNA plásmidico (10^0 a 10^5 copias de ADN) conteniendo el inserto de interés de 172 pb del hexón de HAdVs. La curva estándar se generó para cada experimento. Los valores del umbral (Ct) fueron determinados por el número de ciclos en los cuales la intensidad de la fluorescencia excedía el valor del umbral, como lo describe Heim et al., 2003. Se cuantificaron cada una de las muestras por duplicado y en ocasiones por triplicado. El límite de detección fue de 10 copias.

Se utilizaron 2.5 μ l del ADN extraído para realizar la cuantificación de HAdV por PCR en tiempo real. Se utilizaron los cebadores AQ1, AQ2 y la sonda ADENO taqman probe (Cuadro 13) todos en concentración de 10 μ M (Heim et al, 2003). Se utilizó el master mix compuesto por: 10 mM dNTP's (Invitrogen), 50 mM MgCl₂ (Invitrogen), 5U/ μ L Platinum Taq DNA polymerasa y 10x buffer de platinum Taq (Invitrogen). Se adicionaron 5 μ l de cada cebador y 5 μ l de la sonda (Cuadro 13). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C 2 minutos y 45 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 10 segundos y 65°C durante 60 segundos.

Cuadro 13. Cebadores y sonda utilizados para cuantificar HadVs de acuerdo a Heim et al., (2003).

<i>Nombre</i>	<i>Concentración</i>	<i>Secuencia</i>
<i>AQ1 Reverse primer</i>	10 μ M	(5' GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT 3')
<i>AQ2 Forward primer</i>	10 μ M	(5' GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC 3')
<i>ADENO Taqman probe</i>	10 μ M	(5' FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA BHQ1- 3')

Para realizar las cuantificaciones se utilizó el equipo Step One Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

3.3.6 Reconstrucción filogenética

El árbol filogenético se construyó utilizando 128 secuencias obtenidas en el presente trabajo más 16 secuencias de referencia obtenidas del GenBank. Se utilizaron como raíz dos secuencias de HAdV de simio y un mastadenovirus (Número de acceso KP653112 y KP662705). Con las 128 secuencias se construyó una matriz la cual fue alineada por el algoritmo MUSCLE implementado en el programa Mega 7.0 (Kumar et al., 2016), la cual fue utilizada para correr el análisis filogenético por el método del vecino más cercano, utilizando 1000 repeticiones de Bootstrap (Saitou, 1987).

3.3.7 Porcentaje de identidad por pares

El análisis se efectuó con base en el alineamiento obtenido mediante el software SDT, Sequences Demarcation Tool versión 1.2, utilizando el algoritmo Muscle (Edgar, 2004).

3.3.8 Análisis estadísticos

3.3.8.1 Permanova

Se realizó un análisis PERMANOVA, basado en la medición de distancias Bray-Curtis y el uso del análisis de permutaciones (Anderson 2001). De esta forma se verificó la existencia de diferencias significativas en la concentración de colifagos obtenidos por ultrafiltración y directos (Somatic 13706, Somatic CN-13, Fspec 15597 y Fspec Famp), los Adenovirus y Coliformes (Totales y Fecales) en cuanto a la variabilidad temporal (lluvias y secas) y tipo de agua (dulce y salada). Para este análisis se aplicó un modelo con dos niveles fijos y 9999 permutaciones en el programa PRIMER V6.

3.3.8.2 Regresión múltiple

Se utilizó una regresión múltiple con la concentración de colifagos obtenidos por concentración (Somaticos 13706, Somaticos CN-13, Fspec 15597 y F+spec Famp), Adenovirus y Coliformes totales y fecales; con parámetros fisicoquímicos. Este análisis se realizó con el software R.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Detección y cuantificación de Adenovirus en cuerpos de agua de la zona norte de Quintana Roo

Los resultados de la amplificación del PCR anidado mostraron que se detectaron HAdVs en el 30% de los sitios muestreados en la temporada de lluvias, que corresponden a los sitios 7 y 8 (dolinas de agua dulce de tipo recreativo) y el sitio 10 (agua salobre de tipo urbano). Durante la temporada de secas se detectaron en el 20% de las muestras, en los sitios 6 y 7 (dolinas de agua dulce de tipo recreativo). Es interesante resaltar que el sitio 7 fue el único en el cual se detectaron HAdVs en ambas temporadas. El método de PCR anidado utilizado fue eficiente para detectar HAdVs tanto en agua dulce como en agua salobre. Los resultados obtenidos por el método de qPCR mostraron la presencia de HAdVs en los mismos sitios mencionados en cada temporada (Cuadro 14).

Cuadro 14. Detección de adenovirus por PCR y cuantificación por qPCR de 10 sitios de muestreo durante la temporada de lluvias y de secas. ND = no detectado.

Características del sitio	Sitio	Detección de HAdVs por PCR (copias/L)		Concentración promedio de Adenovirus humanos HAdVs	
		PCR Anidado		qPCR	
		Lluvias	Secas	Lluvias	Secas
Dolinas de agua dulce de tipo urbano	1	ND	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND	ND
Dolinas de agua dulce de tipo recreativo	4	ND	ND	ND	ND
	5	ND	ND	ND	ND
	6	ND	+	ND	3.8 X 10 ²
	7	+	+	3.4 x 10 ¹	9.9 X 10²
Agua salobre de tipo urbano	8	+	ND	2.4 x 10 ¹	ND
	9	ND	ND	ND	ND
	10	+	ND	5.8 x 10²	ND

Durante la temporada de lluvias, la concentración de HAdVs presentó un rango de 1.7 x 10¹ a 5.6 x 10² (Cuadro 14), la concentración más alta se detectó en el sitio 10 (agua salobre de tipo urbano). Durante la temporada de secas la concentración de HAdVs

presentó un rango de 3.8×10^2 a 9.9×10^2 , en este caso el sitio con la concentración mayor fue el 7 (dolinas de agua dulce de tipo recreativo). Las concentraciones promedio de HAdVs fueron mayores durante la temporada de secas en dolinas de agua dulce, sin embargo, se detectaron más sitios positivos durante la temporada de lluvias (Cuadro 14).

3.4.2 Identificación de serotipos de HAdVs

Durante la temporada de lluvias se obtuvieron 121 secuencias en total provenientes de los cuatro sitios positivos, mientras que durante la temporada de secas se obtuvieron 47 secuencias en total de los dos sitios positivos (Cuadro 15).

Cuadro 15. Número de clonas y porcentajes de identidad de nucleótidos de las secuencias de HAdVs obtenidas de los 10 sitios de muestreo durante la temporada de lluvias y de secas.

Características de los sitios	Sitio	Número de secuencias obtenidas		Número de clonas (Rango del porcentaje de identidad de nucleótidos)		Serotipos identificados	
		Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas
Dolinas de agua dulce de tipo urbano	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	6	ND	26	ND	26 (95-97)	ND	HAdV especie F 40
Dolinas de agua dulce de tipo recreativo	7	20	16	7 (95-97) 13 (95-98)	16 (95-99)	HAdV especie F 40 HAdV especie F 41	HAdV especie F 40
	8	23	ND	22 (95-97) 1 (96)	ND	HAdV especie F 41 HAdV especie A 31	ND
Agua salobre de tipo urbano	9	ND	ND	ND	ND		
	10	27	ND	26 (95-97) 1 (95)	ND	HAdV especie F 40 HAdV especie F 41 HAdV especie A 31	ND

Durante la temporada de lluvias se identificó la especie HAdV F serotipos 41 en los tres sitios positivos, tanto en dolinas de agua dulce de uso recreativo (sitios 7 y 8) como en agua salobre de tipo urbano (sitio 10). Se identificó a las especie HAdV F serotipos 40 una dolina de agua dulce de tipo recreativo (sitio 7). Se identificó a las especie HAdV A serotipos 31 una dolina de agua dulce de tipo recreativo (sitio 6) y en agua salobre de tipo urbano (sitio 10) (Cuadro 15).

Durante la temporada de secas se identificó solamente a la especie HAdV F serotipo 40 en los dos sitios positivos que corresponden a dolinas de agua dulce de uso recreativo (sitios 6 y 7) (Cuadro 15).

Como puede observarse en el Cuadro 15, se obtuvo una mayor diversidad de serotipos de HAdVs durante la temporada de lluvias en comparación con la temporada de secas. De manera general, del total de las secuencias obtenidas en ambas temporadas (127), el 51% correspondió a la especie HAdV F serotipo 41, el 47% a la especie HAdV F serotipo 40 y el 2% a la especie HAdV A serotipo 31 (Figura 16).

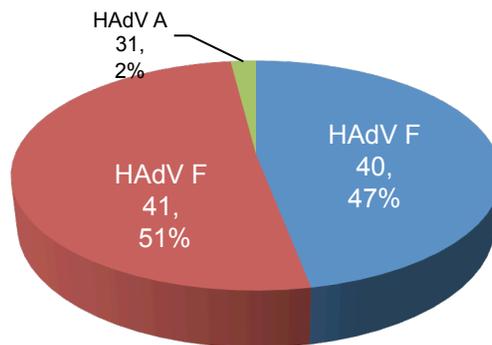


Figura 16. Porcentaje de los serotipos de HAdV encontrados en el agua de los sitios muestreados en el acuífero PY en el noreste de Quintana Roo tomando en cuenta ambas temporadas.

Los primeros hits en BLAST de las secuencias obtenidas fueron similares a secuencias previamente reportadas en otros países (Figura 17). La mayoría de las secuencias de HAdVs identificadas en el acuífero de la zona norte de Quintana Roo, compartieron porcentajes de identidad de nucleótidos con secuencias previamente reportadas en Finlandia y en Brasil, durante la temporada de secas y con secuencias reportadas en Suiza e Italia, durante la temporada de lluvias.

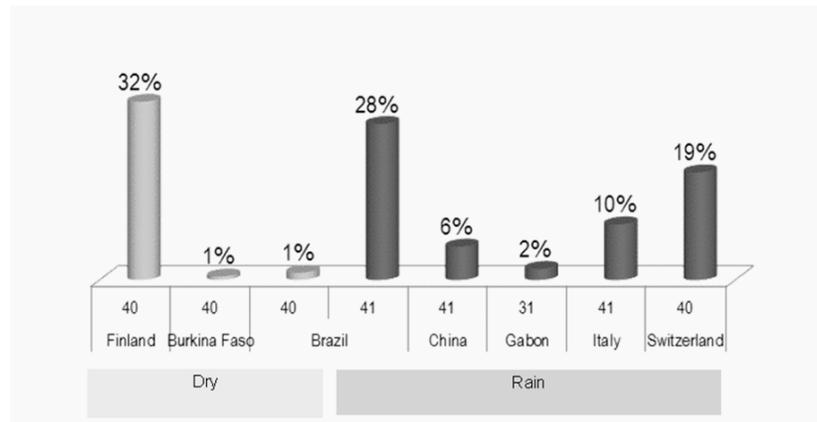


Figura 17. Porcentaje de secuencias de nucleótidos similares a las secuencias previamente reportadas en Europa, Asia, África y Latinoamérica.

Se realizó la prueba de identidad por pares para conocer la diversidad de las secuencias encontradas, que codifican el fragmento de 172 pb de la proteína de la cápside Hexón de los HAdVs encontrados.

En la figura 18 se muestra la agrupación de los tres serotipos con base en el porcentaje de identidad por pares, el cual se presenta en un rango de color. En color rojo se aprecia el grupo de secuencias que comparten mayores porcentajes de identidad entre sí y con las secuencias de referencia utilizadas en el análisis. La especie HAdV F serotipo 41 y la especie HAdVs A serotipo 31 son las que presentan menos variabilidad entre sí (Figura 18). La especie HAdVs F serotipo 40 es la que presenta mayor variabilidad en cuanto al porcentaje de identidad de nucleótidos de las secuencias obtenidas (Figura 18).

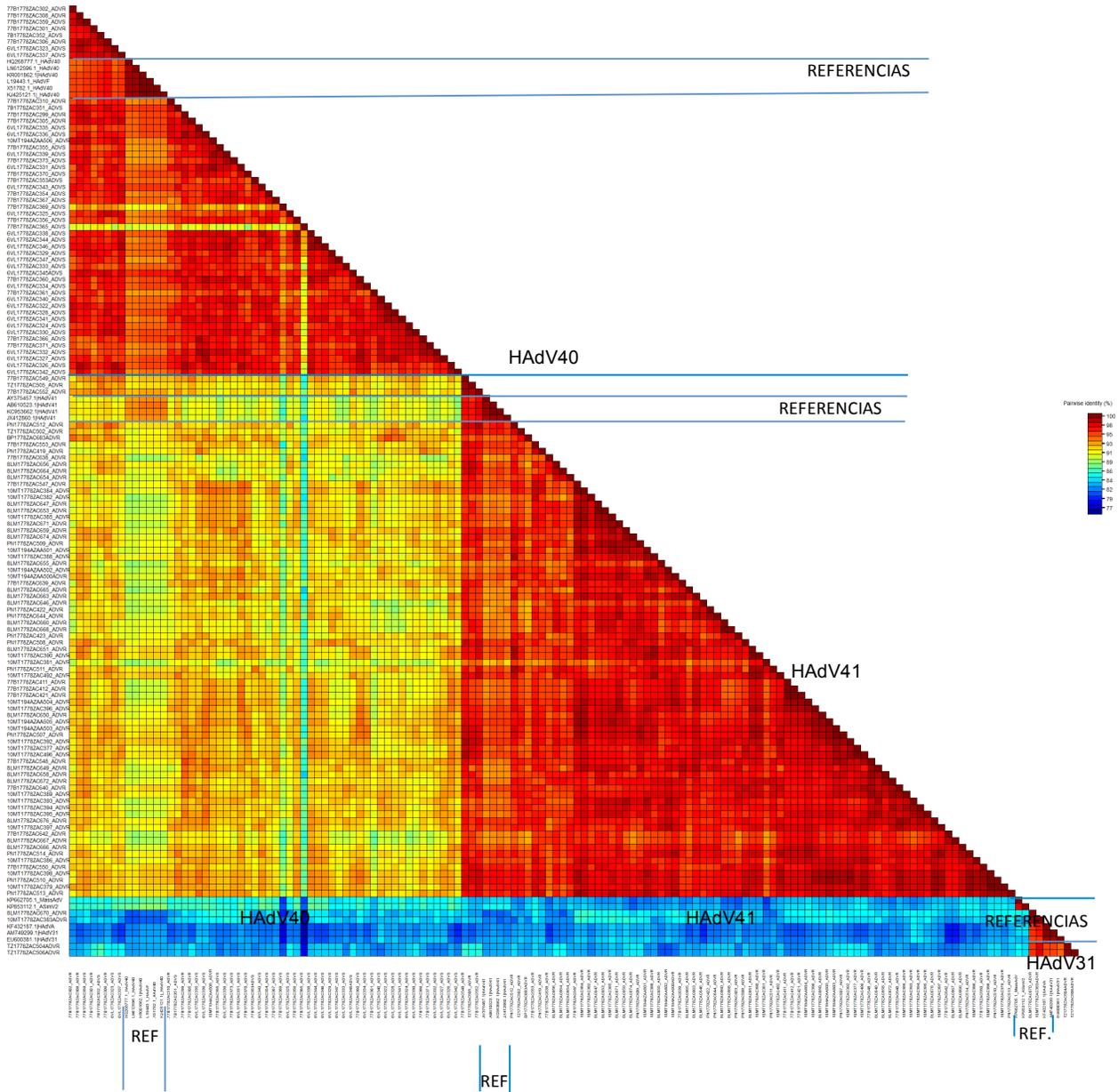


Figura 18. Esquema representando el porcentaje de identidad por pares del conjunto de secuencias encontradas en los sitios de estudio en ambas temporadas.

El porcentaje de identidad por pares con una identidad por arriba del 94%, dio como resultado la formación de tres grupos correspondientes a los serotipos 40 y 41 de la especie F de Adenovirus y el serotipo 31 de la especie A de Adenovirus.

Abreviaturas
 _ADVR Adenovirus Lluvias
 _ADVS Adenovirus Secas
 TZ Tucson
 BP Planta 1
 PNT Planta 2
 Número inicial corresponde al sitio
 6, 7, 8 y 10
 % Bootstrap
 Números de Acceso de referencias de Genbank

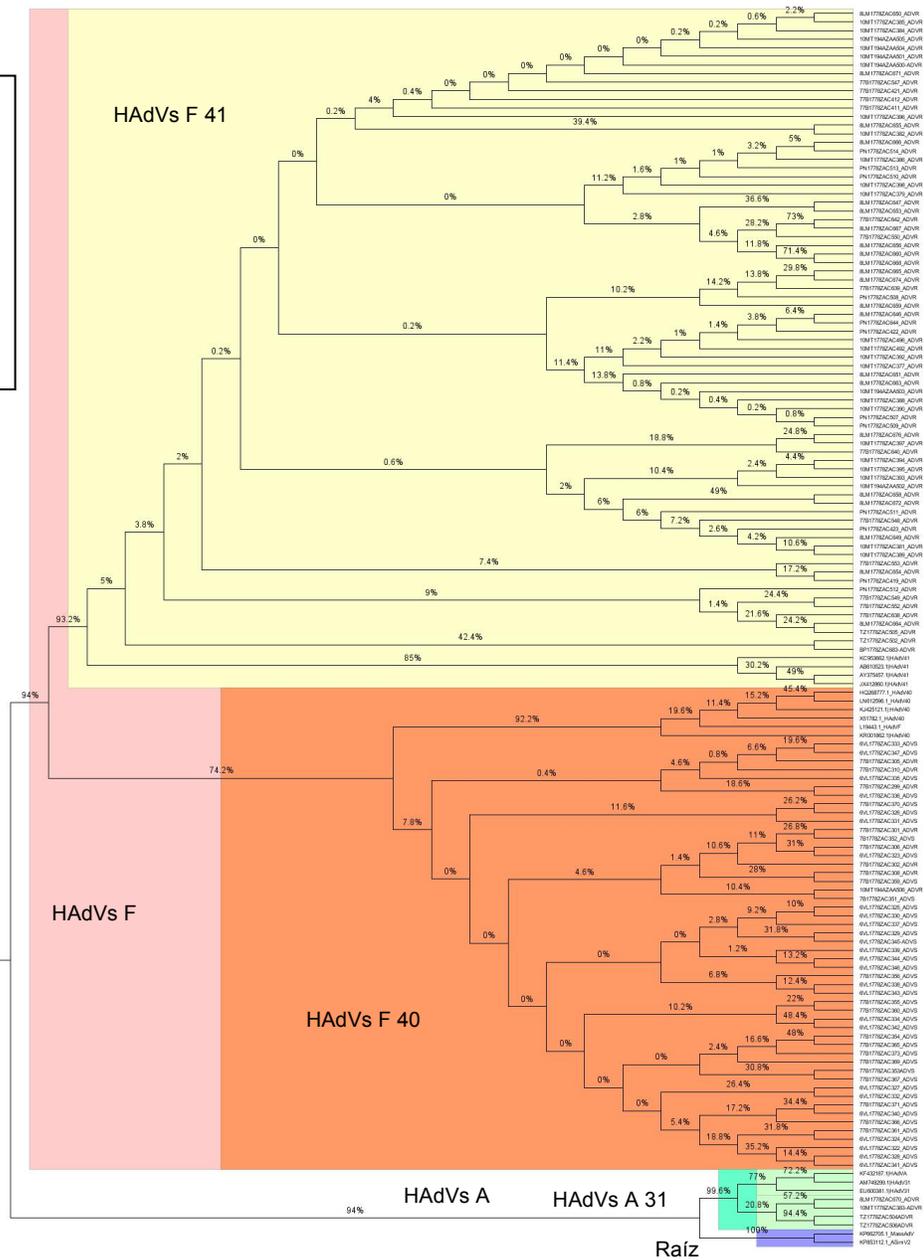


Figura 19. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias de Adenovirus obtenidas y secuencias de referencia del GenBank con sus respectivos números de accesoión. Los porcentajes representan los valores de Bootstrap. En el árbol: 7B = 7, LM = 8, VL= 6, MT= 10, PN= Planta Norte, TZ = Tucson, ADVR= temporada de lluvias y ADVS= temporada de secas. Los números corresponden a los números de accesoión del GenBank en las secuencias de referencia y a las etiquetas de identificación de cada muestra en el presente trabajo.

3.4.3 Análisis filogenético

Para realizar la reconstrucción filogenética se eligieron secuencias representativas de cada serotipo identificado por sitio y por temporada. Se incluyeron secuencias de referencia del GenBank para cada serotipo con su respectivo número de accesoión (Figura 19). La historia evolutiva se dedujo utilizando el método del vecino más cercano. Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de rama = 0.998. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima probabilidad compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. El análisis involucró 105 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + No codificante. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos. Hubo un total de 120 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron con MEGA7.

Para la reconstrucción filogenética se utilizaron como raíz dos secuencias nucleotídicas de dos cepas representantes del género Mastadenovirus, patógenos de un grupo de mamíferos cercanos filogenéticamente del hombre, los Simios. Para el análisis se utilizó además una secuencia nucleotídica de un Mastadenovirus (No de accesoión KP662705). Se eligieron también para segregar las especies, tres grupos de secuencias conformados por las accesiones identificadas como primeros hits en el Genbank, para cada una de las secuencias obtenidas en el presente trabajo (HAdVsF40, HAdVsF41 y HAdVsA31), con base en los resultados del BLASTn. Al segregarse en el árbol filogenético se dividieron en dos clados, uno conteniendo la especie HAdVsA con un soporte de bootstrap de 92.2% (Figura 19) conteniendo el serotipo 31; y otro conteniendo la especie HAdVsF con un soporte de bootstrap de 92.2% (color rosa Figura 19). Este último clado se encuentra subdividido con los serotipos 40 con un soporte de bootstrap del 73% (Figura 19) y el 41 con un soporte de bootstrap alto del 93% (Figura 19). En el árbol filogenético se observa que no se formaron clados con base en los sitios de muestreo ni con base en la temporada de lluvias y de secas.

3.4.4 Análisis estadísticos

3.4.4.1 Diferencias de las concentraciones de colifagos en los tipos de agua y las temporadas climáticas

La prueba de PERMANOVA utilizando matrices de distancia de Bray-Curtis entre las concentraciones de los colifagos en la cepas de *E. coli* ATCC® 13706™, ATCC® 700609™ CN-13 y ATCC® 15597™ C-300 no mostró influencia con los tipos de muestra de agua, el tipo de sitio y la temporada climática.

Cuadro 16. Resultados del análisis bidireccional de PERMANOVA para determinar si existe o no influencia de la temporada climática (lluviosa y seca), el tipo de agua (agua dulce y salobre) en los cuatro tipos de colifagos obtenidos por el conteo del Método Directo. En color rojo se resaltan los valores significativos (<p 0.05).

Cepas hospederas / colifago	Factor	gl	SC	CM	Pseudo-F	P(perm)	perms
ATCC® 13706™ / Colifagos somáticos	Tipo de sitio	1	2136.8	2136.8	0.73131	0.4945	9908
	Temporada	1	2730.5	2730.5	0.93449	0.4289	9935
	Tipo de agua	1	1378.8	1378.8	0.47187	0.6741	9909
	Tipo de agua, sitio y temporada	0	0		No test		
	Res	14	40907	2921.9			
	Total	19	50670				
ATCC® 700609™ CN-13/ Colifagos somáticos	Tipo de sitio	1	3818.1	3818.1	1.7146	0.186	9787
	Temporada	1	2703.7	2703.7	1.2142	0.306	9876
	Tipo de agua	1	2651.3	2651.3	1.1906	0.3021	9753
	Tipo de agua, sitio y temporada	0	0		No test		
	Res	14	31175	2226.8			
	Total	19	53422				
ATCC® 15597™ C-300 /Colifagos F+ específicos	Tipo de sitio	1	1374.2	1374.2	0.6915	0.4907	7625
	Temporada	1	1358.5	1358.5	0.68358	0.5171	9129
	Tipo de agua	1	1542.3	1542.3	0.77606	0.4485	7634
	Tipo de agua, sitio y temporada	0	0		No test		
	Res	14	27822	1987.3			
	Total	19	45956				
ATCC® 700891™ HS (pFamp)/Colifagos F+ específicos	Tipo de sitio	1	2939.3	2939.3	3.7696	0.0399	51
	Temporada	1	3324.4	3324.4	4.2635	0.0277	107
	Tipo de agua	1	120.22	120.22	0.15418	0.8514	50
	Tipo de agua, sitio y temporada	0	0		No test		
	Res	14	10916	779.74			
	Total	19	21130				

En el caso de los colifagos F+ específicos enumerados con la cepa ATCC® 700891™ HS (pFamp) de *E. coli*, se identificó una diferencia significativa con el tipo de sitio (urbano y recreativo) y con la temporada (secas y lluvias) (Cuadro 16).

El PERMANOVA con valores de p por debajo de valores de 0.05 indica que no hay influencia en un factor con las variables y/o los factores de las observaciones. Se realizaron los análisis con base en la concentración de colifagos obtenidos por el método de conteo por ultrafiltración. Los resultados de las diferencias de las concentraciones de los colifagos en los tipos de muestra de agua, tipo de sitio y temporada climática, demuestran que en ninguno de los casos de los colifagos F+ específicos y somáticos enumerados con la cepas de *E. coli* presentan variaciones significativas con el tipo de sitio (urbano y recreativo) y con la temporada (secas y lluvias) (Cuadro 17).

Cuadro 17. Resultados del análisis bidireccional de PERMANOVA para determinar la influencia de la época climática (lluviosa y seca) y el tipo de agua (agua dulce y salobre) en los cuatro tipos de colifagos obtenidos por ultrafiltración.

Cepa hospedera / tipo de colifago	Factor	gl	SC	CM	Pseudo F	P (perm)	perms
ATCC® 13706™ / Colifagos somáticos	Temporada	1	390.8	390.8	0.29015	0.9038	9901
	Tipo de agua	1	191.75	191.75	0.14237	0.9876	9894
	Tipo de agua y temporada	1	2828.4	2828.4	20.999	0.1302	9921
	Res	16	21550	1346.9			
	Total	19	24961				
ATCC® 700609™ CN-13/ Colifagos somáticos	Temporada	1	632.95	632.95	0.46235	0.6724	9910
	Tipo de agua	1	511.64	511.64	0.37374	0.77	9932
	Tipo de agua y temporada	1	3333.2	3333.2	24.348	0.0934	9939
	Res	16	21903	1369			
	Total	19	26381				
ATCC® 15597™ C-300 /Colifagos F+ específicos	Temporada	1	1797.6	1797.6	15.691	0.1914	9830
	Tipo de agua	1	187.02	187.02	0.16324	0.874	9849
	Tipo de agua y temporada	1	3743.6	3743.6	32.676	0.0571	9893
	Res	16	18331	1145.7			
	Total	19	24059				
ATCC® 700891™ HS (pFamp)/Colifagos F+ específicos	Temporada	1	26.048	26.048	10.146	0.5294	31
	Tipo de agua	1	104.81	104.81	40.824	0.2008	19
	Tipo de agua y temporada	1	142.62	142.62	55.549	0.0932	31
	Res	16	410.79	25.674			
	Total	19	684.27				

3.4.4.2 Correlación entre la concentración de coliformes, adenovirus y colifagos.

Se asociaron los datos de los diferentes factores biológicos con los indicadores coliformes totales y fecales para calcular el valor de R^2 y en ninguno de los cuatro tipos de colifagos del Método directo y los HAdVs presentaron correlación y los valores de PERMANOVA no exhibieron una variación significativa en el comportamiento, distribución y permanencia en el acuífero (Cuadro 18).

Cuadro 18. Resultados del análisis bidireccional de PERMANOVA (p value) y Modelo de Regresión Múltiple (R^2) para determinar la diferencia y la correlación de los dos tipos de coliformes con los cuatro colifagos obtenidos por el método directo y los adenovirus.

	<i>Virus</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Std.</i>	<i>Value t</i>	<i>Pr(> t)</i>	<i>R²</i>	<i>p-value</i>	<i>Residual Std (RMS)</i>
Coliformes Totales	HAdVs	-4.206	6.779	-0.62	0.545	0.2388	0.5205	718.5
	13706	2.615	9.183	0.285	0.78	-0.03312		
	CN-13	-2.917	3.26	-0.895	0.386			
	15597	1.308	12.643	0.103	0.919			
Coliformes Fecales	Famp	10.94	20.234	0.541	0.597			
	HAdVs	-0.04106	0.0938	-0.438	0.668	0.09114	0.916	9.943
	13706	-0.04872	0.12707	-0.383	0.707	-0.2335		
	CN-13	0.03531	0.04511	0.783	0.447			
	15597	-0.037	0.17496	-0.211	0.836			
	Famp	0.21977	0.28	0.785	0.446			

La variabilidad de los parámetros fisicoquímicos; Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), el pH, la conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) y los TDS (g/L), no fueron factores determinantes para establecer variaciones significativas en los resultados de las concentraciones de los virus HAdVs y colifagos (ni por el método directo ni los obtenidos por medio de ultrafiltración). Para las bacterias coliformes totales los resultados reflejan una influencia de las concentraciones de NMP con los parámetros de Conductividad y Sólidos disueltos totales. Para los coliformes fecales no se presentó ningún tipo de dominio sobre sus valores de concentración (Cuadro 19).

Cuadro 19. Modelo de Regresión Múltiple para la concentración de colifagos por el método directo, coliformes y Adenovirus. Se muestra el valor de T para cada variable.

Anfitrión de colifagos	Valor	Temp °C	pH	Conduct. (μS/cm)	TDS (g/L)	R2	valor-p	Error Est. Res(RMS)
<i>Coliformes Totales</i>	T	-0.774	1.589	2.177	-2.187	0.1532	0.1702	650.5
	Pr(> t)	0.451	0.133	0.0459	0.045			
<i>Coliformes Fecales</i>	T	1.625	-1.131	-0.793	0.775	0.1705	0.56	9.177
	Pr(> t)	0.125	0.276	0.44	0.45			
<i>ATCC® 13706™ / Colifagos somáticos</i>	T	-0.763	0.833	0.223	-0.229	0.0723 2	0.8784	131.7
	Pr(> t)	0.457	0.418	0.827	0.822			
<i>ATCC® 700609™ CN-13/ Colifagos somáticos</i>	T	-0.885	0.923	0.34	-0.346	0.0481 7	0.94	225.4
	Pr(> t)	0.39	0.371	0.739	0.734			
<i>ATCC® 15597™ C-300 /Colifagos F+ específicos</i>	T	-0.554	0.734	-0.136	0.136	0.0822 7	0.8493	82.55
	Pr(> t)	0.587	0.475	0.894	0.894			
<i>ATCC® 700891™ HS (pFamp)/Colifagos F+ específicos</i>	T	0.029	-0.021	0.222	-0.223	0.0048 8	0.9993	13.33
	Pr(> t)	0.977	0.983	0.827	0.827			
<i>HAdVs</i>	T	-1.014	-0.189	1.808	-1.794	0.283	0.2575	24.66
	Pr(> t)	0.3266	0.8527	0.0907	0.093			

En el Cuadro 20 se observa lo siguiente: 1) la presencia de HAdVs no coincidió con la presencia de colifagos F+específicos y coliformes fecales; 2) los coliformes fecales no superaron los parámetros medioambientales de calidad del agua (200 NMP/100ml); 3) la mayor concentración de HAdVs fue en la temporada de secas con sólo un serotipo presente 9.9x10² copias/l, HAdVs-F40 y F41; 4) los sitios urbanos presentaron siempre uno u otro colífago presentes en ambas temporadas y los recreativos no presentaron coliformes fecales en la temporada de secas y en lluvias sólo tres fueron positivos para colifagos F+específicos.

Cuadro 20. Comparación de presencia de Coliformes, colifagos y Adenovirus en las temporadas de lluvias y secas para cada uno de los sitios muestreados.

Tipo de agua y sitio		Concentración promedio de HAdV (copias/L)		Serotipos humanos	Adenovirus	Colifagos Temporadas		Coliformes Temporadas	
		qPCR copias / L		PCRn / Secuencia		Som /F+	Som /F+	Total/Fecal	Total/Fecal
Temporada		Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas	Lluvias	Secas
Urbano y agua dulce	1	ND	ND	ND	ND	+/+	+/+	+/-	+/-
	2	ND	ND	ND	ND	+/+	-/-	+/-	+/-
	3	ND	ND	ND	ND	+/+	-/-	+/+	+/+
Recreativo y agua dulce	4	ND	ND	ND	ND	+/+	-/-	+/-	+/-
	5	ND	ND	ND	ND	+/+	-/-	+/-	+/-
	6	ND	3.8X10 ²	ND	HAdVs 40	+/+	+/-	+/-	+/-
	7	3.4 x 10 ¹	9.9X10 ²	HAdVs 41, 40	HAdVs 40	+/-	+/-	+/-	+/-
	8	2.4X10 ¹	ND	HAdVs 41, 31, 40	ND	-/-	+/-	+/-	+/-
Urbano y salobre	9	ND	ND	ND	ND	+/-	+/+	+/-	+/+
	10	5.6x10 ²	ND	HAdVs 41, 31 40	ND	+/-	+/+	+/-	+/-

3.5 DISCUSIÓN

Los adenovirus humanos HAdVs han tomado importancia en los últimos años como los agentes etiológicos más importantes causantes de gastroenteritis viral en infantes, después de los Rotavirus y otros frecuentemente implicados como Norovirus, Astrovirus y Sapovirus (Luna et al., 2013). La presencia de HAdVs en ambientes acuáticos está directamente relacionada con contaminación fecal de origen humano (Tong y Lu, 2011), ya que éstos no se encuentran en aguas residuales de origen animal (Bofill-Mas et al., 2013; Noble et al., 2003). Esta característica ha apoyado la propuesta para el uso de los HAdVs como indicadores de fecalismo humano (Wyer et al., 2012), sin embargo, se ha demostrado que su presencia en el agua no siempre se correlaciona con otros indicadores para la calidad del agua como los coliformes fecales o los colifagos humanos (Choi y Jiang, 2005; Rajal et al., 2007; Wyer et al., 2012). Los HAdVs son virus con gran estabilidad en el medio ambiente (Crabtree et al., 1997; Bofill-Mas et al. 2006) y resisten la acción de los rayos UV y la práctica de cloración de las plantas de tratamiento (Enríquez et al., 1995). El presente trabajo reporta por primera vez la presencia de HAdV en el sistema acuífero de la PY, durante dos temporadas climáticas y en diferentes tipos de cuerpos de agua.

Las concentraciones de HAdVs en los ambientes acuáticos no siempre son las mismas. Por ejemplo, en una cuenca en California en donde se vierten efluentes de agua tratada, se detectaron concentraciones de 1.2×10^0 a 1.5×10^1 copias del genoma/L, mientras que en los efluentes de recarga se reportaron concentraciones de 1.07 a 3.22×10^5 copias del genoma/L (Betancourt et al., 2014). Las concentraciones de HAdVs encontradas en las muestras de los sitios del acuífero, fueron mayores (de hasta 9.9×10^2 copias/L) a las concentraciones reportadas para otros ambientes acuáticos donde se vierten efluentes de agua residual tratada (Betancourt et al., 2014) y a las concentraciones reportadas en aguas superficiales de Sudáfrica en donde se determinaron concentraciones de entre 4.24×10^{-5} a 4.16×10^{-2} copias/L (Heerden et al., 2005). Sin embargo, las concentraciones detectadas en este estudio, fueron menores a las concentraciones reportadas tanto en muestras tomadas durante el proceso de tratamiento de aguas residuales, en plantas que vierten sus aguas a los Grandes Lagos en Michigan, donde se reportaron concentraciones de hasta 1.15×10^6 virus/L (Fong et al., 2010), como en las aguas recreativas donde se vierte dicho efluente (promedio de 7.8×10^3 virus/litro) (Fong et al., 2010). Las concentraciones de HAdVs detectadas en este estudio estuvieron dentro del rango de las concentraciones para agua dulce de uso recreativo reportadas en 6 países de Europa (de entre 4.2×100^{-1} y 1×10^2 GC/100 ml) (Bofill-Mas et al., 2010).

La detección de HAdVs en ambientes acuáticos en México se limita a tres estudios: un estudio en el litoral de Baja California (en las playas de Malibú Baja) Tijuana, donde se detectaron concentraciones promedio de 3.5×10^5 y 1.5×10^5 copias/100 mL de HAdVs (Sassoubre et al., el 2012) y dos estudios en aguas superficiales del centro de México donde se detectaron los serotipos HAdVs 40 y 41 en concentraciones de entre 1×10^1 a 9.8×10^4 copias/ml (Mazari-Hiriart et al., 2014; Arredondo-Hernández et al., 2017). El rango de concentración de HAdVs detectado en el presente trabajo fue de 1.7×10^1 y 9.9×10^2 copias/100 ml, durante la temporada de lluvias y de secas, respectivamente. Estas concentraciones pueden considerarse dentro del rango reportado previamente en ambientes acuáticos, sin embargo, es importante resaltar que el sistema acuífero cárstico de la PY además de ser uno de los más grandes del mundo (Bauer - Gottwein et al., 2011), posee características muy particulares que puede permitir el transporte y la distribución de las partículas a grandes distancias debido a la dinámica del flujo del agua a nivel regional (Mahler et al., 2000; Bauer - Gottwein et al., 2011; Borchardt et al., 2011).

En el presente trabajo se detectó por primera vez la presencia de los Adenovirus HAdVs de la especie F en sus serotipos 40 y 41 en dolinas de agua dulce y sitios de agua salobre en Quintana Roo, ambos serotipos ya habían sido reportados en México en ambientes acuáticos (Mazari-Hiriart et al., 2014). Estos serotipos se han reportado ya en cuerpos de agua de todo el mundo (Ikner et al., 2012) y en aguas negras (Hunt et al., 2014). La presencia del serotipo 40 se relaciona con aguas subterráneas, mientras que, el serotipo 41 con aguas residuales tratadas, ambos serotipos son muy frecuentes en aguas residuales y aguas naturales contaminadas (Xagorarakí, 2007). La especie A con el serotipo 31 fue reportada en este trabajo, en sitios de agua dulce y sitios de agua salobre. Esto es interesante ya que este serotipo no se había reportado en México en ambientes acuáticos. El HAdV A serotipo 31 se ha reportado con otros virus entéricos en pozos profundos de 200 a 300 m en un acuífero de arenisca (Bradbury et al., 2013), en muestras de aguas residuales en dos ciudades de Ontario (Vidovic et al., 2011) y se detectó también en el río Wu de Taiwan donde fue relacionado con contaminación por aguas residuales domésticas (Huang et al., 2015). En la región, principalmente en la ciudad de Mérida (ubicada dentro de la PY) se ha reportado la presencia de Adenovirus en pacientes que presentan diarrea aguda (Puerto et al., 1989; Flores-Abuxapqui et al., 1994); sin embargo, se cuenta con poca información sobre la identificación de los serotipos de adenovirus asociados ya que el método principal de detección utilizado en México es el inmunoensayo (Martina-Luna et al., 2013), el cual no siempre permite identificar especies o serotipos. Con base en estos análisis se ha reportado una prevalencia de entre el 9.9% y el 12% de HAdVs en pacientes enfermos con diarrea (Puerto et al., 1989; Martina-Luna et al., 2013). El haber detectado la presencia de HAdVs F serotipos 40 y 41 y HAdVs A serotipo 31 en el ambiente acuático, sugiere que estos virus se encuentran circulando y replicándose en la población en el estado de Quintana Roo. Lo anterior se debe a que la presencia de este virus en el agua se debe exclusivamente a contaminación por heces humanas, ya que una vez que las partículas virales han sido excretadas al ambiente, éstas no pueden replicarse e incrementar su concentración (Fong y Lipp, 2005; Jiang, 2006; Silva et al., 2011; Wong et al., 2012; Ogorzaly et al., 2013). Los datos obtenidos en el presente trabajo indican que se debe considerar un posible riesgo en los sitios donde se detectó la presencia de HAdVs, ya que éstos pueden causar infecciones gastrointestinales en individuos susceptibles (Sinclair, 2009). No se detectó ninguna correlación entre la concentración de HAdVs con las

bacterias como *E. coli* y los colifagos F+ específicos, esto concuerda con lo reportado previamente (Choi y Jiang, 2005; Osuolale y Okoh, 2015), donde la presencia de HAdVs no coincide en ninguno de los casos con la presencia de bacterias coliformes fecales, *E. coli* y tampoco con los F+ específicos. El uso de los HAdVs para la evaluación de la calidad del agua de forma complementaria a los indicadores existentes es una opción que valdría estudiar para tener un espectro más realista sobre la situación de las dolinas en el acuífero de Quintana Roo.

CAPÍTULO IV

4.0 DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo se utilizó el método de ultrafiltración para concentrar partículas virales a partir de muestras de agua y posteriormente detectar los HAdVs en el acuífero cárstico de Quintana Roo. Se han reportado otros métodos para la concentración de partículas virales, los cuales han obtenido diferentes eficiencias de recuperación, de acuerdo a las propiedades del método (Albinana-Gimenez et al., 2009). Por ejemplo, en un estudio que utilizó un método con membrana de microfiltración de fibra hueca para la concentración de HAdVs, reportaron que este no fue eficiente por el incremento del bloqueo debido a la acumulación de partículas en la membrana (Lu et al., 2016). En otro estudio donde se utilizó membranas suplementadas con 0.05 M de $MgCl_2$, para la concentración de colifagos F+ específicos, la eficiencia de recuperación fue de 43% con 2 L y 34% con 5 L, lo que muestra que la eficiencia disminuyó con el incremento del volumen de agua (Sobsey et al., 1990). Para lograr una recuperación eficiente el sistema utilizado en el presente estudio se basó en la ultrafiltración con base en el diseño de Hill et al., 2005 y Hernández-Morga et al., 2009, quienes reportaron eficiencias del 59 % \pm 10 % y 95.8% \pm 22.36%, respectivamente. El sistema utilizado para las muestras del acuífero permitió la filtración de grandes volúmenes de agua (100 L) dulce con 0.8 gr por litro de SDT y conductividad de 1, 272 μ s/cm y para agua salobre de 29.9 g/L de SDT y de 49, 190 μ s/cm, en ambos casos se pudieron detectar posteriormente a los HAdVs.

Para la detección HAdVs se llevó a cabo el PCR punto final anidado utilizando los cebadores reportados por Tong et al., (2011) para ambientes acuáticos. Lo anterior indica que el sistema de concentración y el método de detección de HAdVs utilizados por primera vez para el sistema cárstico de la PY fueron eficientes. La cuantificación se llevó a cabo con los cebadores y sondas reportados por Heim et al., (2003) para todos los serotipo de HAdVs. En el presente trabajo se reportaron por primera vez virus de la familia los Adenoviridae del género Mastadenovirus, presentes en el sistema acuífero cárstico de la PY. Se identificaron tres HAdVs: la especie A con el serotipo 31 y la especie F con los

serotipo 40 y 41. Otro trabajo llevado a cabo en el río Magdalena de la Ciudad de México afectado por escorrentías agrícolas y aguas residuales domésticas, se detectaron los serotipos de HAdVs 40 y 41 (Mazari-Hiriart et al., 2014). También por primera vez en la PY identificaron concentraciones de HAdVs de hasta 9.9×10^2 copias/L en agua dulce y hasta 5.6×10^2 copias/L en agua salobre, valores similares a los reportados para aguas superficiales que reciben aguas residuales tratadas (Betancourt et al., 2014). Las concentraciones virales reportadas en este trabajo para los lugares muestreados, se encuentran dentro de los rangos de concentración reportados en otros sistemas acuáticos, sin embargo, en otros estudios como el de la Ciudad de México fueron detectadas concentraciones de HAdVs de hasta 9.8×10^4 (Mazari-Hiriart et al., 2014). Debido a lo anterior, es importante tomar en cuenta el tamaño, la complejidad del acuífero y sus características hidrogeológicas, así como los flujos a escala regional que pueden transportar los contaminantes e infiltrarse al acuífero debido a la alta permeabilidad del sistema cárstico (Bauer-Gottwein et al., 2011). En estos sistemas los patógenos pueden viajar grandes distancias a través de las fisuras, conductos y poros, por lo tanto, hay un alta probabilidad de que los microorganismos y partículas representen en estos sistemas riesgos para la salud en lugares no definidos a lo largo del sistema acuífero (Schiperski et al., 2016).

Los Adenovirus han sido utilizados como indicadores de contaminación fecal en aguas residuales de España, Francia, Suecia, Grecia, Estados Unidos, Egipto y Sudáfrica (Bofill-Mas et al., 2005). Su presencia se ha comprobado en el 98% de las muestras en concentraciones máximas de 10^3 genomas/100 ml. En Europa los HAdVs se han propuesto como indicadores y en Estados Unidos, la Ley de Agua Potable Segura de la USEPA los ha incluido en la Lista de Candidatos de Contaminantes (CCL) (1998). Los criterios que destacan el uso de los HAdVs como indicadores son su estabilidad, persistencia, su amplia distribución en diferentes matrices de agua (Pina et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2006, Haramoto et al., 2007, Katayama et al., 2008, Dong et al., 2010; Rames et al., 2016), su resistencia a la desinfección por irradiación UV (Thurston-Enríquez et al., 2003; Nwachuku et al., 2005; Linden et al., 2007), la existencia de métodos estándar para su detección (Katayama et al., 2008) y uno de los más importantes la especificidad del huésped humano y su replicación exclusiva dentro del huésped (Fong y Lipp, 2005; Jiang, 2006; Silva et al., 2011; Wong et al., 2012; Ogorzaly

et al., 2013). Es importante mencionar los métodos moleculares para la detección (PCR anidado) y cuantificación (qPCR) de HAdVs utilizados en el presente trabajo, dieron los mismos resultados en cuanto a la identificación de los sitios positivos para HAdVs durante la temporada de lluvias y de secas.

La presencia de colifagos F+ específicos no siempre se correlacionan con las concentraciones o la presencia de HAdVs en ambientes acuáticos (Choi y Jiang, 2005; Osoolale y Okoh, 2015). El análisis estadístico realizado en el presente estudio tampoco detectó una correlación entre ambos grupos de virus. Bellou et al., (2015) comparó la adsorción de los colifagos y los HAdVs en condiciones de laboratorio y demostró que los colifagos presentaron mayor adsorción durante condiciones de agitación; en tanto que los HAdVs presentaron mayor adsorción en ambientes estáticos con dos arcillas, estos factores son los que permiten a los virus entéricos penetrar en los suelos, las aguas subterráneas y viajar largas distancias dentro de los acuíferos. Las condiciones particulares del acuífero con dolomitas podrían por lo tanto, explicar la diferencia entre las concentraciones detectadas y la correlación de ambos grupos de virus (Bellou et al., 2015).

Es frecuente que se reporte la presencia de HAdV en sitios donde el indicador de calidad de agua como *E. coli* no es detectado, lo que en ocasiones valida erróneamente la calidad del agua para uso recreativo (Estes et al., 2006; OMS, 2011; Ganesh y Lin, 2013). Basándose en los resultados obtenidos en el presente estudio, se propone que se utilicen los HAdVs como un indicador alternativo o complementario de la calidad del agua del acuífero (Sidhu et al., 2013) y que se continúe con el desarrollo de un método de seguimiento de fuentes microbianas (Microbial Source Tracking o MST) para poder discriminar entre fuentes de contaminación fecal humana y no humana (Goumelon et al., 2010). En general, los resultados obtenidos en el presente trabajo sirven como base para proponer el uso de dos tipos de colifagos: los colifagos somáticos con replicación en la cepa de *E. coli* ATCC® 13706™ y el colifago F+ específico con replicación en la cepa de *E. coli* ATCC 15597 C-300 como indicadores virales complementarios para determinar la calidad del agua. Además se propone el uso de métodos moleculares para detectar la prevalencia de los HAdVs en diferentes cuerpos de agua e identificar los posibles riesgos para la salud que éstos representan, especialmente en sitios de uso recreativo.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

1. El método de ultrafiltración utilizado fue eficiente para realizar la detección y cuantificación de colifagos y de adenovirus en cuerpos de agua dulce y salobre del norte de Quintana Roo.
2. La presencia de *E. coli* no se correlacionó con la presencia de colifagos ni de adenovirus en los cuerpos de agua muestreados en el sistema acuífero del norte de Quintana Roo.
3. La bacteria indicadora *E. coli* se detectó en todos los sitios muestreados por debajo de los límites de concentración para las aguas de contacto directo de acuerdo a la NOMX 001 Semarnat 1996-2010 (<240 NMP / 100 ml), durante la temporada de lluvias y de secas.
4. Las concentraciones más altas de colifagos somáticos y colifagos F+ específicos (920 UFP/100ml y 330 UFP/100ml, respectivamente) fueron detectadas durante la temporada de lluvias.
5. El mayor número de sitios positivos para HAdVs se detectó durante la temporada de lluvias.
6. Se detectó por primera vez en el sistema acuífero cárstico de la PY la presencia de adenovirus humanos (HAdVs) de las especies F con los serotipos 40 y 41 y la especie A con el serotipo 31.
7. El rango de concentración de adenovirus humanos presentes en cuerpos de agua del sistema acuífero del norte de Quintana Roo fue de 1.7×10^1 a 5.6×10^2 durante la temporada de lluvias y de 3.8×10^2 a 9.9×10^2 durante la temporada de secas.
8. No se encontraron correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos con la concentración de bacterias coliformes, colifagos y adenovirus. Se encontró una correlación significativa entre colifagos F + específicos con el tipo de agua (dulce o salobre) y el uso del agua (urbano y de uso recreativo).

4.3 PERSPECTIVAS

- Continuar con el monitoreo en más sitios del acuífero de la PY, en temporadas de lluvias secas y nortes durante ciclos anuales, para determinar su presencia, concentración y correlación con indicadores de calidad del agua.
- Utilizar a los colifagos somáticos y F + específicos para determinar la eficiencia en cuanto a la reducción de la carga viral (agua negra y efluentes), en diferentes plantas de tratamiento de la región.
- Ampliar el estudio sobre la detección y concentración de otros grupos de virus entéricos para determinar su correlación con los adenovirus en el ambiente acuático de la PY.
- Determinar la permanencia y el transporte de los adenovirus en el ambiente acuático del sistema cárstico de la PY.
- Determinar las concentraciones y el comportamiento de los adenovirus en la columna de agua de diferentes dolinas en la región.
- Compartir los datos obtenidos con las autoridades responsables de la toma de decisiones en cuanto al uso de indicadores para determinar la calidad del agua.

REFERENCIAS

- Adams M., (1959). Bacteriophages, (D. HA, ed.). Londres: Interscience Publishers.
<http://www.cabdirect.org/abstracts/19602204111.html>.
- Aguilar-Duarte, Y., F. Bautista, M. E. Mendoza, O. Frausto, T. Ihl, y C. Delgado, (2016). IVAKY: Índice De La Vulnerabilidad Del Acuífero Kárstico Yucateco a la Contaminación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 913-933.
- Ahmed W, J. P. S Sidhu, K. Smith, D.J. Beale; P. Gyawali, S. Tozea (2016). Distributions of fecal markers in wastewater from different climatic zones for human fecal pollution tracking in Australian surface waters. *Appl Environ Microbiol.*; 82(4):1316-1323. doi:10.1128/AEM.03765-15.
- Albinana-Gimenez, N., P. Clemente-Casares, B. Calgua, J. M. Huguet, Courtois, S., y Girones, R. (2009). Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *Journal of virological methods*, 158(1), 104-109.
- Alcocer, J., L.E. Marín y E. Escobar, (1998). Geochemical evaluation of five cenotes for use as potential drinking water supplies in northeastern Yucatan, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 6, pp. 293-301.
- Allard A., BO. Albinsson y G. Wadell (2001). Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis; 39(2):498-505. doi:10.1128/JCM.39.2.498.
- Anderson M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.*; 26(1):32-46. doi:10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
- Anderson M.J. y D. C. I. Walsh (2013). Permanova, Anosim, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? *Ecological Monographs*, 83(4), 2013, pp. 557 –574 Ó 2013 by the Ecological Society of America

- APHA, A. WEF (American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation) (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater, 19.
- Arcega-Cabrera, F., N. Velázquez-Tavera, L. Fargher, M. Derrien, y E. Noreña-Barroso, (2014). Fecal sterols, seasonal variability, and probable sources along the ring of cenotes, Yucatan, Mexico. *Journal of contaminant hydrology*, 168, 41-49.
- Armon R. H. (2015). Indicators of Waterborne Viruses. In: R.H. Armon, O. Hönninen (eds.), *Environmental Indicators*. 1ra ed. Haifa: Springer Science+Business Media Dordrecht; 2015:613-631. doi: 10.1007/978-94-017-9499-2_35.
- Arredondo-Hernandez, L. J. R., C. Diaz-Avalos, Y. Lopez-Vidal, G. Castillo-Rojas, y M. Mazari-Hiriart, (2017). FRNA Bacteriophages as Viral Indicators of Faecal Contamination in Mexican Tropical Aquatic Systems. *PloS one*, 12(1), e0170399.
- Ashbolt N. J., WOK Grabow y M. Snozzi (2001). *Indicators of Microbial Water Quality*. Vol Cap 13. Edited by. (Fewtrell L and J Bartram, ed.). London: IWA Publishing, 2001. www.who.int/water_sanitation_health/dwq/whoiwa/en/
- Ashbolt N.J. (2015). Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. *Curr Environ Heal reports*. 2015; 2(1):95-106. doi:10.1007/s40572-014-0037-5.
- Aslan A, I. Xagorarakis, F. J. Simmons, J. B. Rose y S. Dorevitch (2011). Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *J Appl Microbiol*; 111 (5):1250-1261. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05130.x.
- Ávila, J. P., C. A. Sansores, P. R. Ceballos. (2004). Diagnóstico 2000 de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el Estado de Yucatán, México *Ingeniería [en línea]*, 8 (mayo-agosto) [Fecha de consulta: 20 de enero de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46780214>> ISSN 1665-529X

- Bain, R., R. Cronk, J. Wright, H. Yang, T. Slaymaker, y J. Bartram (2014A). Fecal contamination of drinking-water in low-and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*, 11(5), e1001644.
- Bain, R., R. Cronk, R. Hossain, S. Bonjour, K Onda, J. Wright, H. Yang, T. Slaymaker, P Hunter, A. Prüss-Ustün y Bartram, J. (2014B). Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. *Tropical Medicine & International Health*, 19(8), 917-927.
- Banerjee, A., P De, B. Manna y M Chawla-Sarkar, (2016). Molecular characterization of enteric adenovirus genotypes 40 and 41 identified in children with acute gastroenteritis in Kolkata, India during 2013–2014. *Journal of medical virology*.
- Barquero, M. S., C L. M. Jiménez, B K. Jiménez y A R. Araya, (2012). Implementación de dos métodos de recuento en placa para la detección de colifagos somáticos, aportes a las metodologías estándar. *Revista Peruana de Biología*, 19(3), 335-340.
- Barrera E. G., Ch. I. Wong, R. C. L. Fernández, A. V. Botello, G. B. Gómez, y P. M. L. Lizárraga (2016). Quantification of *Vibrio* species in oysters from the Gulf of Mexico with two procedures based on MPN and PCR. *Environmental monitoring and assessment*, 188(11), 602.
- Basu, S., T. Banerjee, P. Manna, B Bhattacharyya, y B. Guha, (2013). Influence of physicochemical parameters on the abundance of Coliform bacteria in an Industrial Site of the Hooghly River, India. In *Proceedings of the zoological society* (Vol. 66, No. 1, pp. 20-26). Springer-Verlag.
- Bauer-Gottwein P., B. R. N. Gondwe, G Charvet, L. E. Marín, M. Rebolledo-Vieyra y G. Merediz-Alonso (2011). Review: The Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 19(3), 507–524. <http://doi.org/10.1007/s10040-010-0699-5>
- Basulto Solis, Y. Y. (2015). Sustainable Integrated Water Management Model with Public Health Strategies (Doctoral dissertation, University of Leeds).
- Bautista F., Y. D. Aguilar y E. Batllori (2011). Amenazas, vulnerabilidad y riesgo de contaminación de las aguas subterráneas de la Península De Yucatán. *Teoría y Praxis* 9

9:31

file:///C:/Users/veronica/Downloads/Dialnet-

AmenazasVulnerabilidadYRiesgoDeContaminacionDeLasA-3674780.pdf

Beddows, P.A. (2002). Where does the sewage go?. The Karst Groundwater System of the Municipalidad de Solidaridad, Quintana Roo, 47–52.

Beddows, P. A., P. Blanchon, E. Escobar y O. Torres-Talamante, (2002). Los cenotes de la Península de Yucatán. *Arqueología Mexicana*, 83, 32–35. Taylor & Francis Group, New York: 794–796

Beddows, P. A. (2003). Yucatan Phreas, Mexico. In Gunn, J. (ed.), *Encyclopaedia of Cave and Karst Science*. Routledge

Beddows, P. A., P. L. Smart, S. L. Smith, y F. F. Whitaker (2005). Potential for inland dispersal of injection well effluent in coastal carbonate aquifers: Evidence from Caribbean Yucatan coast. In *Proceedings of the National Cave and Karst Management Symposium* (pp. 05-11).

Beddows P A., P. L. Smart, F. F. Whitaker, S. L. Smith (2007). Decoupled fresh-saline groundwater circulation of a coastal carbonate aquifer: Spatial patterns of temperature and specific electrical conductivity. *J Hydrol.* 2007;346 (1-2): 18-32. doi: 10.1016/j.jhydrol.2007.08.013.

Bell, J. A., W. P. Rowe, J. I. Engler, R. H. Parrott, y Huebner, R. J. (1955). Pharyngoconjunctival fever: epidemiological studies of a recently recognized disease entity. *Journal of the American Medical Association*, 157(13), 1083-1092.

Bellou, M. I., V. I. Syngouna, M. A. Tselepi, P. A. Kokkinos, S. C. Paparrodopoulos, A. Vantarakis, y C. V. Chrysikopoulos, (2015). Interaction of human adenoviruses and coliphages with kaolinite and bentonite. *Science of the Total Environment*, 517, 86-95.

Berg G. (1978A). *Indicators of Viruses in Water and Food*. VIII.; (Editor), Ann Arbor, Michigan Ann Arbor Science Publish.

- Berg, G., D. R Dahling, G. A. Brown y D. Berman (1978B). Validity of fecal coliforms, total coliforms, and fecal streptococci as indicators of viruses in chlorinated primary sewage effluents. *Applied and environmental microbiology*, 36(6), 880-884.
- Betancourt, W. Q., M. Kitajima, A. D. Wing, J. Regnery, J. E. Drewes, I. L. Pepper y C. P. Gerba, (2014). Assessment of virus removal by managed aquifer recharge at three full-scale operations. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 49(14), 1685-1692.
- Birnboim H.C., J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-1523
- Bitton, G., y R. Mitchell, (1974). Effect of colloids on the survival of bacteriophages in seawater. *Water Research*, 8(4), 227-229.
- Bobbi, C. (1998). Water quality of rivers in the Huon catchment. Department of Primary Industry and Fisheries.
- Bofill-Mas S., P. Clemente-Casares, N. Albiñana-Giménez, C.M.P. Maluquer, A.G. Hundesa, y R. Ll. Girones (2005). Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos. *Rev Esp Salud Pública*; 79:253-269. doi:10.1590/S1135-57272005000200012.
- Bofill-Mas, S., N. Albinana-Gimenez, P. Clemente-Casares, A. Hundesa, J. Rodriguez-Manzano, A. Allard y R. Girones, (2006). Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7894-7896.
- Bofill-Mas, S., B. Calgua, P. Clemente-Casares, G. La Rosa, M. Iaconelli, M. Muscillo y M. Verani (2010), Quantification of human adenoviruses in European recreational waters. *Food and Environmental Virology*, 2(2), 101-109.
- Bofill-Mas S., M. Rusiñol, X. Fernandez-Casi, A. Carratalà, A. Hundesa, R. Girones (2013), Quantification of Human and Animal Viruses to Differentiate the Origin of the Fecal Contamination Present in Environmental Samples. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 192089, Published online 15. doi: 10.1155/2013/192089.

- Borchardt, M. A., P. D. Bertz, S. K. Spencer y D. A. Battigelli (2003), Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1172-1180.
- Bradbury, K.R. †, * A. Mark, Borchardt, ‡, M. Gotkowitz, † K. S. Spencer, ‡ J. Zhu, y R. J. H, (2013), Source and transport of human enteric viruses in deep municipal water supply wells, *Environmental Science & Technology*, 47(9), 4096–103. <http://doi.org/10.1021/es400509b>
- Bradley D. E. (1963), The structure of coliphages. *J Gen Microbiol.*; 31:435-445. doi:10.1099/00221287-31-3-435.
- Borges, E. V., Villagómez, G. F., Pereda, P. M., Pietra, A. M., & Novelo, R. M. (1997). Eficiencias de dos componentes de un reactor anaerobio. *Tecnología del agua*, (165), 30-36.
- Brandt, C. D., H. W. Kim, W. J. Rodriguez, J. O. Arrobio, B. C. Jeffries, E. P. Stallings, y R. H. Parrott (1985), Adenoviruses and pediatric gastroenteritis. *Journal of Infectious diseases*, 151(3), 437-443.
- Brezina, S. S., M. D. Baldini, (2008). Detección de colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal en aguas estuarinas. *Revista argentina de microbiología*, 40(1), 72-74.
- Buras, N., y Y. Kott (1969). A simple test for differentiation between *E. coli* and *A. aerogenes*. *Water Research*, 3(12), 973IN1977-976978.
- Cabral, J. P. S. (2010). Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. <http://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Camacho A., M. A. Giles, M. Ortégón, M. Palao y O. Velázquez (2009). Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP). *Técnicas Para El Análisis Microbiológico de Alimentos*, 2, 1–17.

- Camper, A. K., G. A. McFeters, W. G. Characklis, y W. L. Jones, (1991). Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2233-2239.
- Campos C. (2001). Comportamiento de los Indicadores de contaminación fecal en los diferentes sistemas de infección. In: Fernández A.C., ed. *Agua Potable Para Comunidades Rurales, Reuso Y Tratamientos Avanzados de Aguas Residuales Directas*. CYATEC. Buenos Aires: Red Iberoamericana de potabilización y depuración del agua; 2001:221-230.
- Carducci, A. y M. Verani (2013). Effects of bacterial, chemical, physical and meteorological variables on virus removal by a wastewater treatment plant. *Food and environmental virology*, 5(1), 69-76.
- Carpenter P.J. F. M.L. Ryan y M.L. Adams, (2013), Ground-Penetrating Radar, Resistivity and Spontaneous Potential Investigations of a Contaminated Aquifer Near Cancun, Mexico. *Sinkhole Conference*, 6. Retrieved from
- Carr, R. (2001). Excreta-related infections and the role of sanitation in the control of transmission. In: J. FL y B, ed. *Water Quality*. 1ra ed. Genova: WHO Press, IWA Publishing, Alliance House; 2001:89-114. www.iwapublishing.com. Accessed January 22, 2017.
- Cashdollar J.L. (2009). *Water Sample Filtration Methods Using VIRADEL Procedures*. Cincinnati. file:///C:/Users/veronica/Downloads/WQTC NOV.14 JCASHDOLLAR.PDF. [Accessed January 9, 2017].
- Cashdollar, J. L. y L. Wymer (2013). Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. *Journal of applied microbiology*, 115(1),
- Cashdollar, J. L., N. E. Brinkman, S. M. Griffin, B. R. McMinn, E. R. Rhodes, E. A. Varughese, y G. S. Fout, (2013). Development and evaluation of EPA method 1615 for detection of enterovirus and norovirus in water. *Applied and environmental microbiology*, 79(1), 215-223.

- Chao K-K, C-C Chao y W-L Chao (2003). Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *J Microbiol Immunol Infect* ;36(4):288-293.
- Chang, S.L., R. E. Stevenson, A. R. Bryant, R. L. Woodward y P. W. Kabler, (1958) Removal of Coxsackie and bacterial viruses in water by flocculation. II. Removal of Coxsackie and bacterial viruses and the native bacteria in raw Ohio River water by flocculation with aluminum sulfate and ferric chloride. *Am J Public Health Nations Health* 48, 159–169.
- Chapron C., D. Nicola, A. Ballester, J. H. Fontaine, C. N. Frades, y A. B. Margolin (2000). Detection of Astroviruses, Enteroviruses, and Adenovirus Types 40 and 41 in Surface Waters Collected and Evaluated by the Information Collection Rule and an Integrated Cell Culture-Nested PCR Procedure *Appl. Environ. Microbiol.* June 2000 vol. 66 no. 6 2520-2525 <http://aem.asm.org/content/66/6/2520.short>
- Charles, K.J., J. Shore, J. Sellwood, M. Laverick, A. Hart, y S. Pedley (2009). Assessment of the stability of human viruses and coliphage in ground- water by PCR and infectivity methods. *J. Appl. Microbiol.* 106:1827–1837
- Chauhan, J., y J. P. N. Rai, (2010). Monitoring of Impact of Ferti-irrigation by Post-methanated Distillery Effluent on Groundwater Quality. *Clean–Soil, Air, Water*, 38(7), 630-638.
- Choi, S., y S. C. Jiang, (2005). Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7426-7433.
- Ciruela, P., C. Izquierdo y M. Oviedo (2004). Rotavirus y adenovirus 40–41 como causantes de gastroenteritis infantil. *Vacunas*, 5(1), 16-23.
- Clokie M.R.J., A.D. Millard, A. V. Letarov y S. Heaphy (2011). Phages in Nature. *Bacteriophage*. 2011;1(1):31-45.
- Cole D, S. C. Long, M.D. Sobsey (2003). Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters. *Appl Environ Microbiol.* ; 69(11):6507-6514. doi:10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003.

- Collado, J. (2008). Interrelaciones Agua Y Salud Pública En México. CONAGUA OMM México.Doc Player <http://docplayer.es/5600760-Interrelaciones-agua-y-salud-publica-en-mexico.html> CONACED. INDICADORES Y NOTICIAS DE SALUD. Cuernavaca; 1994.
- CONAGUA (2008) Programa Nacional Hídrico 2007-2012, SEMARNAT, México
- CONAGUA (2012). Programa Hídrico Regional Visión 2030 Región Hidrológico-Administrativa XII Península de Yucatán. SEMARNAT México.
- CONAGUA. (2015). Situación del Subsector Agua Potable, Drenaje y Saneamiento. México D.F. Retrieved from file:///C:/Users/veronica/Downloads/DSAPAS 2015.pdf
- Corrales B. J., A. Davison, D. Deere, D. Drury, B. Gordon, G. Howard, A. Rinehold y M Stevens. (2003). Water safety plan manual: step-by-step risk management dor drinking-water suppliers, WHO Geneva.
- Crabtree K. D., C. P. Gerba, J. B. Rose, C. N. Haas (1997). Waterborne adenovirus: A risk assessment. *Water Science and Technology* 35(11-12),1-6. doi:10.1016/S0273-1223(97)00225-4.
http://scholarcommons.usf.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1131&context=sinkhole_2013
- Costa, G., J. Leamon, J. Rothberg, y M. Weiner, (2004). U.S. Patent Application No. 10/767,894.
- Danovaro, R., C. Corinaldesi, A. Dell'Anno, J. Fuhrman, J. J. Middelburg, R. T. Noble y C. Suttle (2011). Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(6), 993–1034. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00258.x>
- Dahling, D. R. (2002). An improved filter elution and cell culture assay procedure for evaluating public groundwater systems for culturable enteroviruses. *Water environment research*, 74(6), 564-568.
- Derrien, M., F. A. Cabrera, N. L. V. Tavera, C. A. K. Manzano, y S. C. Vizcaino, (2015). Sources and distribution of organic matter along the Ring of Cenotes, Yucatan, Mexico: Sterol markers and statistical approaches. *Science of the Total Environment*, 511, 223-229.

- Dirección General de Normas de calidad (1987), Calidad del agua determinación del número más probable (nmp) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva. Diario oficial de la federación 1998. Disponible en: <http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3297/1/nom-003-semarnat-1997.pdf> [Acceso el [5 de enero 2017]
- Díaz C.D. (2003). Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas. [México D.F.]: RIPDA-CYTED. Retrieved from http://catalog.ub.edu/record=b1612726~S1*cat
- Dong Y, J. Kim, y G. D. Lewis (2010). Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. *J Appl Microbiol*; 108(3):800-809. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04477.x.
- Dongdem J, I. Soyiri, A. Ocloo (2009). Public health significance of viral contamination of drinking water. *African J. Microbiol Res*; 3 (12): 856-861. <http://www.diseasepreventionusa.com/documents/Public Health Significance of Viral Contamination of Drinking Water.pdf>.
- Duckworth D.H. (1976). "Who Discovered Bacteriophage?" *bacteriological reviews*, p. Vol. Vol. 40, No. 4-802
- Ebner, K., W. Pinsker, y T. Lion (2005). Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *Journal of virology*, 79(20), 12635-12642.
- Edmonds, R. L. (1976). Survival of coliform bacteria in sewage sludge applied to a forest clearcut and potential movement into groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(4), 537-546.
- Ejecutivo Federal, (2004). Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios, I Diario Oficial de la Federación el 18 de enero de 1988 Última reforma publicada DOF 28 de diciembre de 2004 12 (2004). Retrieved from <http://www.cgajdh.salud.gob.mx/descargas/LV/15-RLGSCS.pdf>

- Elizondo C.A., E.C. Macías; M. A. S. Castillo, H. A. H. Hernández, D. V. Hoil, H. A. López, D. M. López, H. Q. Medina, J. V. Mendoza, J. L. Novelo, H. C. Tovilla, G. S. Velázquez (2011). Estudio para la caracterización y diagnóstico de humedales en Puerto Morelos.
- Enríquez, C. E, C. J. Hurst y C. P. Gerba (1995). Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Res.* 29:2548– 2553
- Espigares, M. G. (2006). Virus en aguas de consumo. *Hig Sanid Ambient* 6 173-189.
- Espinosa-García, A. C., C. F. Arias-Ortíz, y M. Mazari-Hiriart, (2004). Virus en sistemas acuáticos e implicaciones en salud pública. *Hidrobiológica*, 14(2), 166-178.
- Espinosa A. C., C. F. Arias, S. Sánchez-Colón y M. Mazari-Hiriart (2009). Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. *Environ Health*; 8:49. doi:10.1186/1476-069X-8-49.
- Espinosa M.B. (2011). Plan para la recuperación ambiental de la Laguna el informe final y de Bojórquez. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Comisión otros resultados: Nacional del Agua. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. HL001. México D.F.
- Estes M.K., B. V. Prasad, R. L. Atmar (2006). Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis* 19(5):467–474
- Farrah, S. R., S. M. Goyal, C. P. Gerba, C. R. A. I. G. Wallis, y J. L. Melnick, (1977). Concentration of enteroviruses from estuarine water. *Applied and environmental microbiology*, 33(5), 1192-1196.
- Favier, A. L., G. Schoehn, M. Jaquinod, Ch. Harsi y J. Chroboczek. (2002). Structural studies of human enteric adenovirus type 41. *Virology* 293: 75-85.
- Flores-Abuxapqui J. J., G. J. Suárez-Hoil¹, M. A. Puc-Franco, M. R. Heredia-Navarrete, F. I. Puerto-Manzano, M. R. González-Losa, M. Puerto-Solís, G.G. Polanco-Marín, B. Puerto-Cortés (1994). Etiology of acute diarrhea in hospital in-patient Mexican children. *Rev Biomed.* 1994;5(3):117-125.

- Fiello M., Jr. A. T. Mikell, M. T. Moore y C. M. Cooper, (2014). Variability in the characterization of total coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli* in recreational water supplies of north Mississippi, USA. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 93(2), 133-137.
- FONATUR, (2014). Programa de Desarrollo Urbano Del Centro de Población Cancún, Municipio Benito Juárez, Quintana Roo (2014 – 2030). Disponible en <http://www.fonatur.gob.mx/es/transparencia/focalizada/tajamar/03.html>
- Fong T-T y E. K. Lipp (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(2):357-371. doi:10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005.
- Fong TT, L. S. Mansfield, D. L. Wilson, D. J. Schwab, S. L. Molloy y J. B. Rose (2007). Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environ Health Perspect.* 115(6):856-864. doi:10.1289/ehp.9430.
- Fong, T. T. (2009). Occurrence and transport of waterborne viruses in surface water in Michigan and associated public health risks. MICHIGAN STATE UNIVERSITY.
- Fong T-T., S. M. Phanikumar, I. Xagorarakis y J. B. Rose (2010). Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(3):715-723. doi:10.1128/AEM.01316-09.
- Fongaro, G., M. A. Nascimento, A. Viancelli, D. Tonetta, M. M. Petrucio, y C. R. M. Barardi, (2012). Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon. *Water Science and Technology*, 66(12), 2682-2687.
- Foster, S., R. Hirata, D. Gomes, M. Delia, M. Paris, y B. M. Washington, (2002). Evaluación y Control de los Peligros de Contaminación del Agua Subterránea. In *Protección De La Calidad del agua subterránea guía para empresas de agua, autoridades municipales y agencias ambientales.* (pp. 87–108).
- Foster S., H. Garduño, A. Tuinhof, K. Kemper, M. Nanni (2006). *Groundwater Management: Gestión Sustentable Del Agua and Tools Conceptos Y Herramientas Recarga Del Agua*

Subterránea Con Aguas Residuales Urbanas Evaluación Y Manejo de Los Riesgos Y Beneficios.

Friedman, S.D.; E. M. Cooper, L. Casanova, M. D. Sobsey, F. J. Genthner, (2009). A reverse transcription-PCR assay to distinguish the four genogroups of male-specific (F+) RNA coliphages. *J. Virol. Methods*, 159, 47–52.

Foy, H. M., Y J. T. Grayston, J. T. (1982). Adenoviruses. In *Viral infections of humans* (pp. 67-84). Springer US.

Fujioka R.S., H. M. Solo-Gabriele, M. N. Byappanahalli y M. Kirs (2015). U.S. Recreational Water Quality Criteria: A Vision for the Future. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(7):7752-7776. doi:10.3390/ijerph120707752.

García, E. (2004). Modificaciones al sistema climático de Köppen para la República Mexicana. 5ta Edición. Instituto de Geografía.

Ganesh A, J. Lin, (2013). Waterborne human pathogenic viruses of public health concern. *Int J Environ Health Res*. 2013; 23(6):544-564. doi:10.1080/09603123.2013.769205.

Gasca, V. M. C., R. B. Medina, y C. C. Novelo (2011). Los plaguicidas y su impacto sobre la fauna silvestre de la Península de Yucatán.

Gerba, C. P., Farrah, S. R., Goyal, S. M., Wallis, C. R. A. I. G., & Melnick, J. L. (1978). Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater. *Applied and environmental microbiology*, 35(3), 540-548.

Gerba, C. P., D. M. Gramos y N. Nwachuku (2002). Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5167-5169.

Ghebremedhin, B. (2014). Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 4(1), 26-33.

Gleick, P. H. (1998). *Water in Crisis: Paths to Sustainable Water Use* Author. In *Ecological Applications*, (Vol. 8, pp. 571–579).

- Gobmex (1997). Norma Oficial Mexicana NM-001-1996 Límites Permisibles de Contaminantes En Las Descargas de Aguas Residuales En Aguas Y Bienes Nacionales. 1-15.
- Gobmex (2016). Ley de Aguas Nacionales, Diario Oficial de la Federación, Disp. http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/16_240316.pdf [Acceso 3 feb 2017].
- GobQroo (2011) Programa Institucional de Infraestructura hidráulica 2012-2016 Quintana Roo Solidario. <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=7f71639d-98c0-56b5-1985-24ad4125d4c9&documentId=aa5ea34e-dab8-387f-ab27-6d377931199e>
- GobYuc. (2012). Muestreo de Parámetros Físico-Químicos y Bacteriológicos En 50 Cenotes En Diferentes Municipios Del Estado de Yucatán. Mérida Yucatán; 2012.
- Gondwea B. R.N., S. Lerer, S. Stisen, L. Marín, M. Rebolledo.-Vieyra, G. Merediz-Alonso y P. Bauer.-Gottwein. (2010). Hydrogeology of the south-eastern Yucatan Peninsula: New insights from water level measurements, geochemistry, geophysics and remote sensing. *Journal of Hydrology*, 389(1–2), 1–17. <http://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.04.044>
- González-Herrera R. A., I. Sánchez-Pinto, J. Gamboa-Vargas (2002). Groundwater-flow modeling in the Yucatan karstic aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal* 10: 539-552.
- González Herrera, R., R. Rodríguez Castillo, y V. Coronado Peraza, (2007). Atenuación natural en el acuífero yucateco. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(1), 5-15.
- Gooch-Moore J., D. K. D. Goodwin, C. Dorsey, R. D. Eilender, B. M. Joanna, M. Órnelas, C. Sinigalliano, B. Vincent, D. Whiting y S. H. Wolfe (2011). New USEPA water quality criteria by 2012: GOMA concerns and recommendations. *J Water Health*. 2011;9(4):718-733. doi:10.2166/wh.2011.156.
- Goodgame, R. (2006). A Bayesian approach to acute infectious diarrhea in adults. *Gastroenterology Clinics Of North America*, 35(2), 249-273.
- Gourmelon, M., M. P. Caprais, S. Mieszkin, R. Marti, N. Wery, E. Jardé, y A. M. Pourcher, (2010). Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water research*, 44(16), 4812-4824.

- Grabow, W. O. K. (1996). Waterborne diseases: Update on water quality assessment and control. *Water S. A.*, 22(2), 193-202. Grabow WOK. (2001). Bacteriophages Update on application as models for viruses in water. *WATER SA.* ;27(2):251-268. doi:10.4314/wsa.v27i2.4999.
- Grabow W O K (2001). Bacteriophages Update on application as models for viruses in water. *WATER SA.* 2001;27(2):251-268. doi:10.4314/wsa.v27i2.4999.
- Griffin D., K. A. Donaldson, J. H. Paul, J. B. Rose, (2003). Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters;16(1):129-143. doi:10.1128/CMR.16.1.129.
- Griffith, J. F., S. B Weisberg, B. F. Arnold, Y. Cao, K. C. Schiff, J.M.Jr. Colford (2016). Epidemiologic evaluation of multiple alternate microbial water quality monitoring indicators at three California beaches. *Water Research.* May 2016, Vol. 94, p371-381. 11p. DOI: 10.1016/j.watres.2016.02.036.
- Guzmán, C., L. Mocé-Llivina, F. Lucena, y J. Jofre, (2008). Evaluation of *Escherichia coli* host strain CB390 for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages. *Applied and environmental microbiology*, 74(2), 531-534.
- Haas C. N., J. B. Rose, C. Gerba y S. Regli (1993). Risk Assessment of Virus in Drinking Water, *Risk Analysis* Volume 13, Issue 5 October 1993 Pages 545–552
- Hall FG. Physical and chemical survey of cenotes of Yucatan. *Carnegie InstWash Publ.* 1936; 457:5-16.
- Hamza, I. A., L. Jurzik, K. Überla, y M. Wilhelm, (2011). Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), 424-436.
- Hanshaw, B. B., y W. Back, (1980). Chemical mass-wasting of the northern Yucatan Peninsula by groundwater dissolution. *Geology*, 8(5), 222. [http://doi.org/10.1130/0091-7613\(1980\)8<222:CMOTNY>2.0.CO;2](http://doi.org/10.1130/0091-7613(1980)8<222:CMOTNY>2.0.CO;2)

- Haramoto E, H. Katayama, K. Oguma, S. Ohgaki (2007), Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. *J Appl Microbiol.* 2007;103(6):2153-2159. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03453.x.
- Haramoto, H. Katayama, E. Utagawa, S. Ohgaki (2008). Development of sample storage methods for detecting enteric viruses in environmental water. *J Virol Methods.* 2008;151(1):1-6. doi:10.1016/j.jviromet.2008.04.006.
- Haramoto, E., Katayama, H., Utagawa, E., & Ohgaki, S. (2009). Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *Journal of virological methods*, 160(1), 206-209.
- Haramoto, E., M. Kitajima, H. Katayama, y S. Ohgaki, (2010). Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Research*, 44(6), 1747-1752.
- Harrach, B., M. Benko, G. Both, M. Brown, A. Davison, M. Echavarría, ... y V. Mautner, (2011). Family adenoviridae. *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*, 95-111.
- Hartard, C., R. Rivet, S. Banas y C. Gantzer (2015). Occurrence of and sequence variation among F-specific RNA bacteriophage subgroups in feces and wastewater of urban and animal origins. *Appl Environ Microbiol.* 2015. doi:10.1128/AEM.01905-15.
- Hartmann N. M., M. Dartscht, R. Szewzyk, H. Selinka, (2013). Monitoring of adenovirus serotypes in environmental samples by combined PCR and melting point analyses. *Virol J.* 2013; 10(190):1-10.
- Hatfull G.F. y R.W. Hendrix (2011) Bacteriophages and their genomes. *Curr Opin Virol.* 2011;1(4):298-303. doi:10.1016/j.coviro.2011.06.009.
- Hedberg, C. W., y M. T. Osterholm, (1993). Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clinical microbiology reviews*, 6(3), 199-210.

- Heerden, J., M. M. Ehlers, A. Heim, A., y W. O. K. Grabow, (2005). Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 234-242.
- Heim A., C. Ebnet, G. Harste y P. Pring-Akerblom (2003). Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol.* 2003;70(2):228-239. doi:10.1002/jmv.10382.
- Hernández C. C., M. G. A. Aguilera, G. E. Castro (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecc y Microbiol*; 31(4):137-151.
- Hernández-Morga. J., F.J. León, G. F. Peraza, S.B. Gil-Salas y C. Chaidez (2009). Detection and characterization of hepatitis a virus and norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration - RT-PCR integrated methods. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1579–1590. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04125.x>
- Hernández-Terrones L, M. Rebolledo-Vieyra, M. Merino-Ibarra, M. Soto, A Le-Cossec y E. Monroy-Ríos (2011). Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): Baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution*, 218(1–4), 517–528. <http://doi.org/10.1007/s11270-010-0664-x>
- Hernández-Terrones, L. M., K. A. Null, D. Ortega-Camacho, y A. Paytan, (2015). Water quality assessment in the Mexican Caribbean: impacts on the coastal ecosystem. *Continental Shelf Research*, 102, 62-72.
- Herrador, B. R. G., B. F. De Blasio, E. MacDonald, G. Nichols, B. Sudre, L. Vold., y k: Nygård, (2015). Analytical studies assessing the association between extreme precipitation or temperature and drinking water-related waterborne infections: a review. *Environmental Health*, 14(1), 29.
- Herrera-Silveira, J. A. (2006). Lagunas costeras de Yucatán (SE, México): investigación, diagnóstico y manejo. *Ecotrópicos*, 19(2), 94-108.
- Hewitt J., L. Margaret, G. E. Greening, G. D. Lewisc (2011). Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. *Water Research* Volume 45, Issue 18, 15 November 2011, Pages 6267–6276

- Hewitt J., G. E. Greening, M Leonard, G.D. Lewis (2013), Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Water Res.* 47(17):6750-6761. doi:10.1016/j.watres.2013.09.001.
- Hill, V. R., A. L. Polaczyk, D. Hahn, J. Narayanan, T. L. Cromeans, J. M. Roberts, y J. E. Amburgey, (2005). Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6878–6884. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6878-6884.2005>
- Hill V. R., A. M. Kahler, N. Jothikumar, T. B. Johnson, D. Hahn, y T. L. Cromeans, (2007). Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Applied and environmental microbiology*, 73(13), 4218-4225.
- Hill, V. R., A. L. Polaczyk, A. M. Kahler, T. L. Cromeans, D. Hahn, y J. E. Amburgey, (2009). Comparison of hollow-fiber ultrafiltration to the USEPA VIRADEL technique and USEPA method 1623. *Journal of environmental quality*, 38(2), 822-825.
- Hofmayer, S., I. Madisch, S. Darr, F. Rehren, y A. Heim (2009). Unique sequence features of the Human Adenovirus 31 complete genomic sequence are conserved in clinical isolates. *BMC genomics*, 10(1), 557.
- Huang, Z. M., B. M. Hsu, P. M. Kao, T. Y. Chang, T. K. Hsu, Y. N. Ho, ... y Y. L. Huang, (2015). Prevalence, quantification, and typing of human adenoviruses detected in river water in Taiwan. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8359-8366.
- Hundesda. A. de M., C. M., Bofill-Mas, S., N. Albinana-Gimenez y R. Girones (2006). Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Applied and environmental microbiology*, 72(12), 7886-7893.
- Hunt R. J., M. A. Borchardt y K. R. Bradbury (2014). Viruses as Groundwater Tracers: Using Ecohydrology to Characterize Short Travel Times in Aquifers. *Groundwater*. 2014;52(2):187-193. doi:10.1111/gwat.12158.

- INEGI (2011). Territorio, Cuéntame, Sobreexplotación y contaminación Agua contaminada con <http://cuentame.inegi.org.mx/territorio/agua/sobreexplota.aspx?tema=T#>. [Acceso 8 enero 2017]
- INEGI (2014). Minimonografía, Quintana Roo, Censos económicos. Censos económicos. http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/ce/ce2014/doc/minimonografias/mqroo_ce2014.pdf.
- INEGI. (2015a). “Estadísticas a propósito del... día mundial del turismo (27 de septiembre)” datos nacionales. México. <http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/turismo0.pdf>.
- INEGI. (2015b). Anuario Estadístico Y Geográfico de Quintana Roo 2015 - Datatur. Aguascalientes. http://www.datatur.sectur.gob.mx/ITxEF_Docs/QROO_ANUARIO_PDF15.pdf. Accessed January 21, 2017.
- Ikner L a., C. P. Gerba, K. R. Bright (2012). Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review. *Food Environ Virol.*; 4(2):41-67. doi:10.1007/s12560-012-9080-2.
- Jiang, S., Dezfulian, H., & Chu, W. (2005). Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. *Canadian journal of microbiology*, 51(5), 393-398.
- Jiang, S., R. Noble & W. Chu. (2001). Human adenovirus and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of southern California. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1):179-184.
- Jiang, S. C. (2006). Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environmental science & technology*, 40(23), 7132-7140.
- Jofre J., J. R. Stewart, WOK Grabow, (2011). Phage methods. In *Microbial Source Tacking: Methods, Applications, and Case Studies*; Hagedorn, C., Blanch, A.R., Harwood, V.J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2011; pp. 137–156.

- Jofre J, F. Lucena, AR Blanch, M Muniesa (2016). Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water (Switzerland)*. 2016;8(5):1-21. doi:10.3390/w8050199.
- Johnson T. B., D. M. Larry, C.L. Alice, C. Layton, W. J. Sidney, G. C. Johnson, J. L. Cashdollar, D. R. Dahling, L. F. Villegas, G. S. Fout, D. E. Williams y Gary Saylor (2011). Viruses and Bacteria in Karst and Fractured Rock Aquifers in East Tennessee, USA. *Ground Water*. 2011;49(1):98-110. doi:10.1111/j.1745-6584.2010.00698.x.
- Jończyk E, M. Kłak, R. Międzybrodzki, A. Górski (2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol.*; 56:191-200. doi:10.1007/s12223-011-0039-8.
- Jurzik L., I. A. Hamzaa, W. Puchertb, K. Überlac, I. Wilhelma (2009). Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* Volume 213, Issue 3, June 2010, Pages 210–216.
- Katayama H., E. Haramotoa, K. Ogumaa, H. Yamashitab, A. Tajimab, H. Nakajimab y S. Ohgaki (2008). One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research* Volume 42, Issues 6–7, March 2008, Pages 1441–1448
- Kauffer E.F.M y C.L.A. Villanueva (2011). Retos de la gestión de una cuenca construida: la península de Yucatán en México. *Aqua-LAC*, 3(52), 81–91.
- Keswick B. H. y C. P. Gerba. (1980). Viruses in groundwater. *Environ Sci Technol*. 1980;14(11):1290-1297. doi:10.1021/es60171a602.
- Keswick, B. H., C. P. Gerba, H. L. DuPont, y J. B. Rose, (1984). Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Applied and environmental microbiology*, 47(6), 1290-1294.
- Kim, J. Y., H. Lee, J. E. Lee, M. S. Chung, y G. P. Ko, (2013). Identification of human and animal fecal contamination after rainfall in the Han River, Korea. *Microbes and Environments*, 28(2), 187-194.

- Kirs, M y D. C. Smith (2007). Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase PCR for F+ specific RNA coliphages: A method for use in microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 808–814.
- Kojaoghlanian, T., P. Flomenberg, y M. S. Horwitz (2003). The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Reviews in medical virology*, 13(3), 155-171.
- Kornacki J.L., J.L.Johnson (2001). Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downs F, editor. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): APHA; p. 69–82.
- Kotwal, G., y J. L. Cannon, (2014). Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Current opinion in virology*, 4, 37-43.
- Kott, Y. (1966). Estimation of low numbers of *Escherichia coli* bacteriophage by use of the most probable number method. *Applied microbiology*, 14(2), 141-144.
- Kott, Y., N. Roze, S. Sperber, y N. Betzer, N. (1974). Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water research*, 8(3), 165-171.
- Kornacki JL y J. L. Johnson (2001). Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downs F, editor. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): APHA; p. 69–82.
- Krekeler, M. P. S., P. Probst, M. Samsonov, C.M. Tselepis, W. Bates, L.E.Kearns y J.B. Maynard, (2007). Investigations of subsurface flow constructed wetlands and associated geomaterial resources in the Akumal and Reforma regions, Quintana Roo, Mexico. *Environmental Geology*. <http://doi.org/10.1007/s00254-007-0684-z>
- Kumar S., G. Stecher, K. Tamura (2016) MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874
- Kuo, D. H. W., F. J. Simmons, S. Blair, E. Hart, J. B. Rose, y I Xagorarakis (2010). Assessment of human adenovirus removal in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water research*, 44(5), 1520-1530.

- Kuo-Kuang Ch., Ch. Chen-Ching, Ch Wei-Liang, (2003). Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. *Journal of microbiology, immunology, and infection= Wei mian yu gan ran za zhi*, 36(4), 288-293.
- Lagunas-Puls, S., B B. J. Vázquez, B., Bautista, y R. B. Guillén. (2016). Turismo en Cancún, México: Consideraciones sobre la derrama económica. *Estudios y perspectivas en turismo*, 25(3), 375-393.
- Lambertini, E., S. K. Spencer, P. D. Bertz, F. J. Loge, B. A. Kieke, y M. A. Borchardt (2008). Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 2990-2996.
- Leberman, R. (1966). The isolation of plant viruses by means of "simple" coacervates. *Virology*, 30(3), 341-347.
- Lee, J.E.; M. Y. Lim, S. Y. Kim, S. Lee, H. Lee, H. M. Oh, H. G. Hur, G. Ko (2009). Molecular characterization of bacteriophages for microbial source tracking in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 7107–7114.
- Le Maillot Ch. (2001). Quintana Roo's newest giant © G.E.O. Grupo de Exploración Ox Bel Ha Actualizado 2001 Disponible en: <http://www.mexicocavediving.com/obel.html> [Acceso 8 enero 2017]
- Leal-Bautista R.M., G. Hernández-Zárate, N. A. M. Jaime, R. Germán Cuevas, G. V. O. (2011). Pathogens and pharmaceuticals pollutants as indicators of contamination at the northeastern aquifer of quintana roo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(2), 211–219.
- Leal-Bautista, R. M., M. Lenczewski, Ch. Morgan, A. Gahala, J. E. McLain (2013), Assessing Fecal Contamination in Groundwater from the. *J Environ Prot (Irvine, Calif)*. (November):1272-1279.
- Leal R B., M. Lenczewski, J. E. T. McLain, y S. Bellis S. (2011). In: Coloquio Evaluación de Peligro, Vulnerabilidad Y Riesgos Para La Reducción de Desastres de La VIII Convención

Internacional Sobre Medio Ambiente Y Desarrollo Pags: 207-217, ISBN 978-959-300-018-5.; 2011:207-217.

LeChevallier, M. W. (1990). Coliform regrowth in drinking water: a review. *Journal-American Water Works Association*, 82(11), 74-86.

Lee, H., M. Kim, S Y. Paik, C. H. Lee, W. H. Jheong, J. Kim, y G. Ko (2011), Evaluation of electropositive filtration for recovering norovirus in water, *Journal of water and health*, 9(1), 27-36.

Lee C. S., C. Lee, J. Marion, Q. Wang, L. Saif, y J. Lee, (2014), Occurrence of human enteric viruses at freshwater beaches during swimming season and its link to water inflow. *Science of the Total Environment*, 472, 757-766.

Lewis, P. F., M. A. Schmidt, X. Lu, D. D. Erdman, M. Campbell, A. Thomas, y B. Kendall, (2009), A community-based outbreak of severe respiratory illness caused by human adenovirus serotype 14. *Journal of Infectious Diseases*, 199(10), 1427-1434.

Li Z, Y. Xu, Q. Wang, C. Xie, Y. Liu, Z. Tu, (2016). Tissue factor pathway inhibitor-2 induced hepatocellular carcinoma cell differentiation. *Saudi J Biol Sci*. 24(1):95-102. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.09.003.

Liang, L., S. G. Goh, G. G. R. V. Vergara, H. M. Fang, S. Rezaeinejad, S. Y. Chang, y K. Y. H. Gin (2015), Alternative fecal indicators and their empirical relationships with enteric viruses, *Salmonella enterica* and *Pseudomonas aeruginosa* in surface waters of a tropical urban catchment, *Applied and environmental microbiology* 81(3), 850-860.

Lion T, K. Kosulin, C. Landlinger, M. Rauch, S. Preuner, D. Jugovic, U.P. ¨tschger, A. Lawitschka, C. Peters, G. F. M. Matthes Y SM-M (2010). Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK.*; 24(September 2005):706-714. doi:10.1038/leu.2010.4.

Lin J. y A. Ganesh (2013). Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses. *Int J Environ Health Res*; 23(6):484-506. doi:10.1080/09603123.2013.769201.

- Linden K. G., J. Thurston, R. Schaefer y J. P. Malley (2007). Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Appl Environ Microbiol*; 73(23). doi:10.1128/AEM.01587-07.
- Lipp, E. K., S. A. Farrah, y J. B. Rose, (2001). Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Marine pollution bulletin*, 42(4), 286-293.
- Liu, P., V. R. Hill, D. Hahn, T.B. Johnson, Y. Pan, N. Jothikumar, y C. L. Moe (2012). Hollow-fiber ultrafiltration for simultaneous recovery of viruses, bacteria and parasites from reclaimed water. *Journal of microbiological methods*, 88(1), 155-161.
- Livingstone D. A. (1963). *Chemical composition of rivers and lakes*: Free Download & Streaming: Internet Archive. <https://archive.org/details/chemicalcomposit00livi>. Published 1963. Accessed May 26, 2016.
- Lo, G.G. y B. Berger, (1952) Use of ion exchange resins in partial purification and concentration of poliomyelitis virus. *J Lab Clin Med* 39, 970–973.
- Long, S. C., y M. D. Sobsey, (2004). A comparison of the survival of F+ RNA and F+ DNA coliphages in lake water microcosms. *Journal of water and health*, 2(1), 15-22.
- Lopman B, M. H. Reacher, Van Duijnhoven y FX Hanon, D Brown y M Koopmans (2003). *Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995 – 2000*. 2003 ;9(1):1995-2000.
- Louie, J. K., A. E. Karon, A. E., M. Holodniy, M., L. Guardia-LaBar, L., B. Lee, B., A. M. Petru, J. K. Hacker y D. P. Schnurr (2008). Severe pneumonia due to adenovirus serotype 14: a new respiratory threat?. *Clinical infectious diseases*, 46(3), 421-425. doi:10.3201/eid0901.020184.
- Lu, R., Q. Li, Yin, I. Xagorarakis, V. V. Tarabara, y T. H. Nguyen (2016). Effect of virus influent concentration on its removal by microfiltration: The case of human adenovirus 2. *Journal of Membrane Science*, 497, 120-127.

- Luna, M. M., J. I. Leboreiro, I. B. Zapata y M. E. Rendón-Macias (2013). Los adenovirus como causa de gastroenteritis aguda en los niños. *Revista Mexicana de Pediatría*, 80(3), 98-104.
- Lutz, W., Prieto, L., Sanderson, W (2000). *Population, Development, and Environment on the Yucatan Peninsula: From Ancient Maya to 2030: International Institute for Applied Systems Analysis, Laxenburg, Austria*
- Mahler, B. J., J. C. Personné, G. F. Lods, y C. Drogue, (2000). Transport of free and particulate-associated bacteria in karst. *Journal of Hydrology*, 238(3), 179-193.
- Marín L. E. y E. C. Perry (1994). Hidrogeología contaminación PY. *Geofísica Internacional*, 33(4), 619-623.
- Marín, L. E., B. Steinich, J. Pacheco, O. A. Escolero (2000). Hydrogeology of a contaminated sole-source karst aquifer. *Hydrogeology of a contaminated sole-source karst aquifer, Mérida, Yucatán, Mexico*. ;39(4):359-365. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=56839406>. Accessed January 20, 2017.
- Marín, L. S., O. F. Escolero, M. Rebolledo, M. Balcazar, P. S. y V. M. (2005). Programa de Monitoreo de Aguas Subterráneas del Parque Xcaret y sus alrededores, Estado de Quintana Roo
- Marín L.E.S., J.G.A. Pacheco y R. R. Méndez (2008). Hidrogeología de la península de Yucatán. In *Península de Yucatán* (pp. 159–176). <http://doi.org/10.1023/A:1014923217206>
- Marion, J. W., C. Lee, C. S. Lee, Q. Wang, S. Lemeshow, T. J. Buckley, ...y J. Lee, (2014). Integrating bacterial and viral water quality assessment to predict swimming-associated illness at a freshwater Beach: a cohort study. *PloS one*, 9(11), e112029.
- Masciopinto, C., La Mantia, R., Levantesi, C., Tandoi, V., Divizia, M., Donia, D., ... & A. R. Petrinca, (2010). Analytical solution for the modeling of the natural time-dependent reduction of waterborne viruses injected into fractured aquifers. *Environmental science & technology*, 45(2), 636-642.

- Mattison, K., y S. Bidawid, (2009). Analytical methods for food and environmental viruses. *Food and Environmental Virology*, 1(3-4), 107-122.
- Mazari-Hiriart, M., G. Pérez-Ortiz, M. T. Orta-Ledesma, F. Armas-Vargas, M. A. Tapia, R. Solano-Ortiz M. A. Silva, I. Yañez-Noguez, Y. López-Vidal y C. Díaz-Ávalos, (2014). Final opportunity to rehabilitate an urban river as a water source for Mexico City. *PloS one*, 9(7), e102081.
- McKee J.E., H. W. Wolf (1963). *Water Quality Criteria*. 2da ed. (McKee JE y Wolf HW, ed.). Pasadena Cal.: State water resources agency of California. http://www.waterboards.ca.gov/publications_forms/publications/general/docs/waterquality_criteria1963.pdf. Accessed November 2, 2015.
- Medina-Moreno, S. A., Jiménez-González, A., Gutiérrez-Rojas, M., Lizardi-Jiménez, M. A., & de Zempoala Hidalgo, M. (2014). Hydrocarbon pollution studies of underwater sinkholes along Quintana Roo as a function of tourism development in the Mexican Caribbean. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(2), 509-516. Medina-Moreno, S. A., Jiménez-González, A., Gutiérrez-Rojas, M., Lizardi-Jiménez, M. A., & de Zempoala Hidalgo, M. (2014). Hydrocarbon pollution studies of underwater sinkholes along Quintana Roo as a function of tourism development in the Mexican Caribbean. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(2), 509-516.
- Meng, Q. S., y C. P. Gerba (1996). Comparative inactivation of enteric adenoviruses, poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation. *Water Research*, 30(11), 2665-2668.
- Metcalf Ch. (2009). *Assessment, Monitoring & Management of Persistent Organic Pollutants (POPs) & Persistent Toxic Substances (PTS) in the Coastal Ecosystems of the Wider Caribbean Region*. Caribbean Coastal Pollution Project (CCPP)
- Metcalf, C. D., P. A. Beddows, G. G. Bouchot, T. L. Metcalfe, H. Li, y H. Van Lavieren, (2011). Contaminants in the coastal karst aquifer system along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Environmental pollution*, 159(4), 991-997.
- Michael, H. A., A. E. Mulligan, y C. F. Harvey (2005). Seasonal oscillations in water exchange between aquifers and the coastal ocean. *Nature*, 436(7054), 1145-1148.

- Mitchell, L. S., B. Taylor, W. Reimels, F. F. Barrett, y J. P. Devincenzo (2000). Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital. *The Pediatric infectious disease journal*, 19(10), 996-1000.
- Moncada P.J. (2011). Turismo, población y territorio en Quintana Roo: relación y proyecciones. (Miguel Ángel Porrúa, Ed.) (1a ed.). México D.F.
- Mota-Hernández F. (2000). Disminución de la mortalidad por diarrea en niños. *Biol Med Hosp Infant Mex* 57(1) 32-40. 57(1):32-40.
- Murrell, J., B. M. Rojas, R. B. Álvarez, H. N Rojas y M. Pérez, (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(3), 24-34.
- Muscillo M, M., M. Pourshaban, S. Iaconelli, A. Fontana, S. Di Grazia, G. Manzara, R. Fadda, Santangelo y G. La Rosa (2008). Detection and quantification of human adenoviruses in surface waters by nested PCR, TaqMan real-time PCR and cell culture assays. *Water Air Soil Pollut.* 2008;191 (1-4):83-93. doi:10.1007/s11270-007-9608-5.
- Naidoo S. y A.O. Olaniran (2013) Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;11(1). doi:10.3390/ijerph110100249.
- Narvaiza, I., G. Mazzolini, C. Qian, J. Prieto, y I Melero (2003). Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer. *Inmunología Vol 22 / Num 2 / 225-242*
- Ng, C., T. H. Le, S. G. Goh, L. Liang, Y. Kim, J. B. Rose y K. G. H. Yew (2015). A Comparison of Microbial Water Quality and Diversity for Ballast and Tropical Harbor Waters. *PloS one*, 10(11), e0143123.
- Noble, R. T., & J. A. Fuhrman (2001). Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. In *The Ecology and Etiology of Newly Emerging Marine Diseases* (pp. 175-184). Springer Netherlands.

- Noble R. T., S. M. Allen, A. D. Blackwood, W. Chu, S. C. Jiang, G. L. Lovelace, ... y D. A. Wait, (2003). Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. *Journal of water and health*, 1(4), 195-207.
- Novelo R. I. M., J. G. P. Ávila, E. R. C., Borges, A. C., Sansores, E. D. R. V. Borges, y D. D. C Vargas,. (2016). Calidad microbiológica de pozos de abastecimiento de agua potable en Yucatán, México. *Ingeniería Revista Académica de la Facultad de Ingeniería Universidad Autónoma de Yucatán*, 19(1), 51-61.
- Nwachuku, N., C. P. Gerba, A. Oswald y F. D. Mashadi (2005). Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5633-5636.
- Ogorzaly L, I Bertrand, M. Paris, A. Maul y C. Gantzer (2010) Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Appl Environ Microbiol*. V 10 No 24 8019-8025. doi:10.1128/AEM.00917-10.
- Ogorzaly L, H. Cauchie, C. Penny, A. Perrin, C. Gantzer (2013). Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR 2013: 4159-4166. doi:10.1007/s00253-013-4782-4.
- Olszewski J., L. Winona y K. H. Oshima (2005) Comparison of 2 ultrafiltration systems for the concentration of seeded viruses from environmental waters. *Can J Microbiol* 51, 295–303.
- Okoh A.I., T. Sibanda y S. S. Gusha (2010). Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7(6):2620-2637. doi:10.3390/ijerph7062620.
- OMS (2017) Agua saneamiento y salud, Hojas informativas sobre enfermedades relacionadas con el agua. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diseasefact/es/ [Acceso 8 enero 2017] http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_11.pdf?ua=1
- OPS. (1988) Guías para la calidad del agua potable. *Publicación Científica* 508; 3:141. <file:///C:/Users/veronica/Downloads/9275315086.pdf>.

- Osuolale, O., y A. Okoh, (2015). Incidence of human adenoviruses and Hepatitis A virus in the final effluent of selected wastewater treatment plants in Eastern Cape Province, South Africa. *Virology journal*, 12(1), 98.
- Pacheco A, J., S. A. Cabrera, y L. E. Marín (2000). Bacteriological contamination in the karstic aquifer of Yucatán, Mexico. *Geofísica Internacional-Mexico*, 39(3), 285-291.
- Pacheco, J., y A. Cabrera (1997). Groundwater contamination by nitrates in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 5(2), 47-53.
- Park S. H. E. J. Kim, T. H. Yun, J. H. Lee, C. K. Kim, Y. H. Seo, S. A. Oh, S. S. Choi, S. J. Cho, M. S. Kim, G. Y. Han, M. Y. Kim, H. S. Jeong; D. S. Cheon y H. S. Kim (2010) Human enteric viruses in groundwater. *Food Environ Virol.* 2010; 2(2):69-73. doi:10.1007/s12560-010-9029-2.
- Pérez-Ceballos R, J. Pacheco-Ávila, J. Euán-Ávila, H. Hernández-Arana, (2012) Regionalization based on water chemistry and physicochemical traits in the ring of Cenotes, Yucatan, Mexico, *Journal of Cave and Karst Studies* 2012 vol: 74 (1) pp: 90-102
- Perry E.J, J. Swift, J. Gamboa, G. A. Reeve, R. Sanborn, L. Marín, y M. Villasuso (1989). Geologic and environmental aspects of surface cementation, north coast Yucatán, México. *Geology*.;17(9):818.
- Perry, E., G. Velazquez-Oliman y L. Marin, (2002). The hydrogeochemistry of the karst aquifer system of the northern Yucatan Peninsula, Mexico. *International Geology Review*, 44(3), 191-221.
- Perry E., A. Paytan, B. Pedersen y G.O. Velazquez (2009). Groundwater geochemistry of the Yucatan Peninsula, Mexico: Constraints on stratigraphy and hydrogeology. *Journal of Hydrology*, 367(1–2), 27–40. <http://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.12.026>
- Petric M., (1995). Caliciviruses, astroviruses and other diarrheic viruses. In: Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover & R. H. Tenover (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. Washington, DC. pp 1017-1024

- Pina, S., M. Puig, F. Lucena, J. Jofre & R. Girones, (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenoviruses detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology* 64(9): 3376-3382.
- Plummer, J. D., S. C. Long, A. J., Charest, y D. O. Roop, (2014), Bacterial and viral indicators of fecal contamination in drinking water (PDF). *Journal-American Water Works Association*, 106(4), E200-E211.
- Polanco R. A. G., J. A. Alberto, J. S. Sánchez, G. J. Rejón, J. M. Gómez, y T. A. C. Del Valls, (2015). Contamination by organochlorine pesticides in the aquifer of the Ring of Cenotes in Yucatán, México. *Water and Environment Journal*, 29(1), 140-150.
- Poma, H.R., D. G Cacciabue, B. Garcé, E. E. Gonzo, y V. B. Rajal (2012) Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters. *Science of the Total Environment*, 433, 98-109.
- Prüss-Üstün A, R. Bos, F. Gore, J. Bartram (2008) Safer water, better health. *World Heal Organ*. 2008:53. doi:ISBN 9789241596435.
- Puerto, F. I., G. G. Polanco, M. R. González, J. E. Zavala y G. Ortega (1989). Role of rotavirus and enteric adenovirus in acute paediatric diarrhoea at an urban hospital in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(3), 396-398.
- Puig M, J Jofre, F Lucena, A. Allard, G Wadell y R Girones (1994) Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification, *Appl. Environ. Microbiol.* August 1994 vol. 60 no. 8 2963-2970.
- Pullés M. R. (2014) Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Cuba. *CENIC Ciencias Biológicas.*; 45 (1): 25—36. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181230079005>.
- Rajal, V. B., B. S. McSwain, D. E. Thompson, C. M. Leutenegger, y S. Wuertz, (2007). Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. *Water Research*, 41(19), 4287-4298.

- Rames E, A. Roiko, H. Stratton, J. Macdonald (2016) Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Res.*; 96. doi:10.1016/j.watres.2016.03.042
- Ravva S V., C.Z. Sarreal (2016), Persistence of F-Specific RNA Coliphages in Surface Waters from a Produce Production Region along the Central Coast of California. Balcazar JL, ed. *PLoS One*; 11(1): e0146623. doi:10.1371/journal.pone.0146623.
- Rhodes, E. R., E.M. Huff, D. W. Hamilton, y J. L. Jones (2016), The evaluation of hollow-fiber ultrafiltration and celite concentration of enteroviruses, adenoviruses and bacteriophage from different water matrices, *Journal of virological methods*, 228, 31-38.
- Rigotto, C., K. Hanley, K., P.A. Rochelle, P. A., R. De Leon, R., C. R. M. Barardi, C. R. M., & M.V. Yates, M. V. (2011). Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. *Environmental science & technology*, 45(9), 4145-4150.
- Rodríguez-Martínez, R. E. (2008). Community involvement in marine protected areas: The case of Puerto Morelos reef, México. *Journal of Environmental Management*, 88(4), 1151-1160.
- Romero S., J. García, B. Valdez y M. Vega (2009). Calidad del Agua para Actividades Recreativas del Río Hardy en la Región Fronteriza México-Estados Unidos, *Información Tecnológica* Vol. 21(5), 69-78 (2010) doi:0.1612/inf.tecnol.4357it.09
- Romero, P., M. Vogel, F. Solanes, y V. Luchsinger (2010). Queratoconjuntivitis por adenovirus generadas a partir de una consulta oftalmológica. *Revista chilena de infectología*, 27(2), 148-152.
- Rosario, K., E. M. Symonds, C. Sinigalliano, J. Stewart, y M. Breitbart, (2009). Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. *Applied and environmental microbiology*, 75(22), 7261-7267.
- Rose, J. B., S. N. Singh, C. P. Gerba, y L. M. Kelley, (1984). Comparison of microporous filters for concentration of viruses from wastewater. *Applied and environmental microbiology*, 47(5), 989-992.

- Rux, J. J., y R. M. Burnett, R. M. (2004) Adenovirus structure. *Human gene therapy*, 15(12), 1167-1176.
- Rubio E. M., M.R. Murad, J.S. Rovira, (2010). Crisis ambiental en la costa de Quintana Roo como consecuencia de una visión limitada de lo que representa el desarrollo sustentable, *Argumentos*. vol, 23(63), 161–185. UAM
- Sambrook J., D. W. Russel (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saitou N. y M. Nei (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sassoubre L. M., D. C. Love, Silverman, A. I., Nelson, K. L., & Boehm, A. B. (2012). Comparison of enterovirus and adenovirus concentration and enumeration methods in seawater from Southern California, USA and Baja Malibu, Mexico. *Journal of water and health*, 10(3), 419-430.
- Schaper M, J. Jofre, M. Uys, W.O.K. Grabow (2002). Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J Appl Microbiol*. 2002;92(4):657-667. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01600.x.
- Schijven, J. F., y S. M. Hassanizadeh, S. M. (2000). Removal of viruses by soil passage: Overview of modeling, processes, and parameters. *Critical reviews in environmental science and technology*, 30(1), 49-127.
- Schiperski, F., J. Zirlwagen y T. Scheytt (2016). Transport and Attenuation of Particles of Different Density and Surface Charge: A Karst Aquifer Field Study. *Environmental Science & Technology*, 50(15), 8028-8035.
- Schmitter-Soto J. J., F. A. Comín, E. Escobar-Briones, J. Herrera-Silveira, J. Alcocer, E. Suárez-Morales, M. Elías-Gutiérrez, V. Díaz-Arce, L. E. Marín y B. Steinich (2002). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia*, 467(1–3), 215–228.

- Schmitter-Soto, J. J., E. Escobar-Briones, J. Alcocer, E. Suárez-Morales, M. Elías-Gutiérrez, y L. M. Marín, (2002). Los cenotes de la Península de Yucatán. De la Lanza-Espino, G. y J. L. García-Calderón (Comps.). Lagos y Presas de México. AGT. México, 337-381.
- Schwarzenbach R. P., T. Egli, T. B. Hofstetter, U. von Gunten y B. Wehrli (2010). Global Water Pollution and Human Health. *Annu Rev Environ Resour.* 2010; 35(1):109-136. doi:10.1146/annurev-environ-100809-125342.
- Scott, C. A., L. D. Geohring, y M. F. Walter (1998). Water quality impacts of tile drains in shallow, sloping, structured soils as affected by manure application. *Applied Engineering in Agriculture*, 14(6), 599-603.
- SEDATU. (2014). Programa de Desarrollo Urbano Del Centro de Población Cancún, Municipio Benito Juárez, Quintana Roo (2014 - 2030. Cancun; 2014:262. <http://www.fonatur.gob.mx/es/transparencia/focalizada/tajamar/03.html>.
- Seitz, S. R., Leon, J. S., Schwab, K. J., Lyon, G. M., Dowd, M., McDaniels, M., ... & Moe, C. L. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Applied and environmental microbiology*, 77(19), 6884-6888.
- SEMARNAT (1997). NORMA Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Diario Oficial de la Nación, http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4863829&fecha=06/01/1997 [Acceso 8 enero 2017]
- Silva, H. D., M. T. García-Zapata y C. E. Anunciação (2011). Why the use of adenoviruses as water quality virologic marker. *Food and Environmental Virology*, 3(3-4), 138-140.
- Sinclair RG, E. L. Jones y C. P. Gerba (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol*; 107(Cdc):1769-1780. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x.
- SINAVE/DGE/SALUD (2013). Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad por Causas Sujetas a Vigilancia Epidemiológica en México 2013. En: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/mortalidad/PEEMortalidad_VE2013.pdf [Acceso noviembre 2015]

- Singh, A., y J. Lin (2015). Microbiological, coliphages and physico-chemical assessments of the Umgeni River, South Africa. *International journal of environmental health research*, 25(1), 33-51.
- Sinreich, M., M Pronk y R. Kozel (2014). Microbiological monitoring and classification of karst springs. *Environmental earth sciences*, 71(2), 563-572.
- Sinton L. W., C. H. Hall, Lynch, P. A., y R. J. Davies-Colley, (2002). Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Applied and environmental microbiology*, 68(3), 1122-1131.
- Skraber S, B. Gassilloud, L. Schwartzbrod, C. Gantzer (2004). Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Res.* 2004;38(12). doi:10.1016/j.watres.2004.03.041.
- Skraber S., J. Schijven, C. Gantzer y A. M. de Roda Husman (2005). Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk? *Biofilms*, 2(2), 105. <http://doi.org/10.1017/S1479050505001833> doi:10.1128/AEM.01899-08.
- Smith, R. J., J. S. Paterson, C. A. Sibley, J. L. Hutson, y J. G. Mitchell, (2015). Putative effect of aquifer recharge on the abundance and taxonomic composition of endemic microbial communities. *PloS one*, 10(6), e0129004.
- Sobsey, M. D., & J. S. Glass, (1980). Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(2), 201-210.
- Sobsey, M. D., J. J. Schwab, y T. R. Handzel, T. R. (1990). A simple membrane filter method to concentrate and enumerate male-specific RNA coliphages. *Journal (American Water Works Association)*, 52-59.
- Solano M. B., L. M. Chacón, K.B.J. Jiménez y R. A. Achí (2012). Implementación de Dos Métodos de Recuento En Placa Para La Detección de Colifagos Somáticos , Aportes a Las Metodologías Estándar Implementation of Two Plate Count Methods for Detection of Somatic Coliphages and Contributions to the Standard Methodologies. Vol 19.

- Stevenson, M. E., R. Sommer, G. Lindner A. H. Farnleitner, S. Toze, A. K. Kirschner, y J. P. Sidhu, (2015). Attachment and detachment behavior of human Adenovirus and surrogates in fine granular limestone aquifer material. *Journal of environmental quality*, 44(5), 1392-1401.
- Symonds E. M., D. W.Griffin y M. Breitbart. (2009). Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2009 ;75(5):1402-1409. doi:10.1128/AEM.01899-08.
- Szewzyk U., W. Manz, R Amann. R., K H. Schleifer, K. H., y T. A. Stenström, (1994). Growth and in situ detection of a pathogenic *Escherichia coli* in biofilms of a heterotrophic water-bacterium by use of 16S-and 23S-rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *FEMS microbiology ecology*, 13(3), 169-175.
- Tamura K., M. Nei, y Kumar S., (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., y Kumar S., (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*30: 2725-2729.
- Tani N., Y. Dohi, N. Kurumatani, K. Yonemasu (1995). Seasonal Distribution of Adenoviruses, Enteroviruses and Reoviruses in Urban River Water *Microbiology and Immunology* Vol. 39 No. 8 P 577-580.
- Taylor, D. H., H B. Bosmann, (1981). The electrokinetic properties of reovirus type 3: electrophoretic mobility and zeta potential in dilute electrolytes. *Journal of Colloid And Interface Science*, 83(1), 153-162.
- Thurston-Enriquez, J. A., C. N. Haas, J. Jacangelo, K. Riley y C. P. Gerba (2003a). Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 577-582.

- Thurston-Enriquez, J. A., C. N. Haas, J. Jacangelo y C. P. Gerba (2003b). Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 3979-3985.
- Tong, H. I., & Lu, Y. (2011). Effective detection of human adenovirus in Hawaiian waters using enhanced PCR methods. *Virology journal*, 8(1), 57.
- U.S. Environmental Protection Agency, (2008), Report on the Environment (ROE) Final Report). Washington, D.C., EPA/600/R-07/045F (NTIS PB2008-112484), 2008.
- USEPA (2015), Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality 820-R-15-098. Washington.
- <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/coliphages-literature-review-report-2015.pdf>. Accessed August 22, 2016.
- Van Heerden J., M. M. Ehlers, W. B. Van Zyl, W O.K. Grabow (2003). Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Research*; 37; 15, 3704–3708
- Van Heerden, M.M. Ehlers, W.B. van Zyl, W.O.K. Grabow (2004). Prevalence of human adenoviruses in raw and treated water. *Water Science and Technology*; 50 (1) 39-43;
- Van Heerden¹ J., M.M. Ehlers, y W.O.K. Grabow (2005). Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. *J Appl Microbiol*; 99:1256–1264. https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&ik=a1ec178689&view=att&th=1506d54adc5f9d07&attid=0.1&disp=inline&safe=1&zw&sadbat=ANGjdJ_vbW1QzHqHgnLU06ehpn6PlwCRDwTu3hq44bkHWOOPHCMc2cyXbTYaV9Q_d9caJSsISb6YeMjpatT0CPc9x-Vlo4FQ7jmBVFcso. Accessed October 18, 2015.
- Vantarakis, A. C. y M. Papapetropoulou. (1998). Detection of enteroviruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. *Water Research* 32(8): 2365-2372
- Ver, B.A., Melnick, J.L. and Wallis, C. (1968). Efficient ultrafiltration and sizing of viruses with membrane filters. *J Virol* 2, 21–25.

- Vidovic, S., Aly, M., Flemming, C., Springthorpe, S., & Sattar, S. A. (2011). Genetic analysis of infectious human adenoviruses from wastewaters of two urban communities in Canada shows first evidence of genotypes Ad3a16 and Ad3a18 in North America. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-02795.
- Villasuso PM, P. I. Sánchez y, M. C. Canul, S. R. Casares, E. G. Baldazo, C. J. Souza (2011). Hydrogeology and conceptual model of the karstic coastal aquifer in northern Yucatan State Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13: 243-260.
- Vinjé, J., S. J. Oudejans, J. R. Stewart, M. D. Sobsey, S. C. Long (2004). Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 5996–6004.
- Wade T.J., E Sams, K. P. Brenner, R. Haugland, E. Chern, M. Beach, L. Wymer, C. C. Rankin, D. Love, Q. Li, R. Noble, A. P Dufour (2010). Rapidly measured indicators of recreational water quality and swimming-associated illness at marine beaches: a prospective cohort study. *Environ Health*; 9(1):66. doi:10.1186/1476-069X-9-66.
- Wallis, C. and Melnick, J.L. (1967). Concentration of enteroviruses on membrane filters. *J Virol* 1, 472–477.
- Waltham, A. C., y P.G. Fookes (2003). Speleogenesis and Evolution of Karst Aquifers Engineering classification of karst ground conditions. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, 36, 101–118. Retrieved from www.speleogenesis.info
- Waye, M. M. Y., y C. W.Sing, C. W. (2010). Anti-viral drugs for human adenoviruses. *Pharmaceuticals*, 3(10), 3343-3354.
- Wyer, M. D., A. P. Wyn-Jones, D. Kay, H. K. C. Gironés, R., J. López-Pila, ... y O. Schneider, (2012). Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters. *Water research*, 46(13), 4130-4141.
- WHO (2003). State of the Art Report Health Risks in Aquifer Recharge Using Reclaimed Water. R. Aertgeerts and A. Angelakis, Ed. Who. Ginebra: World Health Organization. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/83800/1/WHO_SDE_WSH_03.08.pdf

- WHO (2011). Guidelines for Drinking-water Quality Library Cataloguing-in-Publication Data. In: World Health Organization. WHO. Génova: WHO Press; 2011:302. 4th ed <http://www.who.int>. Accessed October 22, 2016.
- Wold, W. S. M., & Horwitz, M. S. (2007). Adenoviruses. *Fields virology*, 2, 2395-2436.
- Wong K, TT Fong, K Bibby y M Molina (2012). Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ Int*;45(1):151-164. doi:10.1016/j.envint.2012.02.009.
- Xagorarakis, I., C. F.Kuo, K. Wong, M. Wong, y J. B. Rose, (2007). Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the great lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(24), 7874-7881.
- Yahya, M. (2015). Bacteriophages as indicators of human and animal faecal contamination in raw and treated wastewaters from Tunisia. Retrieved October 12, 2015, from <https://mail-attachment.googleusercontent.c>. *Journal of Applied Microbiology* 118, 1217--1225, 118, 1217–1225.
- Yalcin, O. B., y A. Muhammetoglu, (2011). Modeling inactivation rates of indicator microorganisms based on laboratory determinations of T 90 for different temperature and salinity levels. *Desalination and Water Treatment*, 26(1-3), 45-52.
- Yamaguchi, N., T. Ichijo y M. Nasu, (2011). Environmental disease: environmental alteration and infectious disease. *Ecological research*, 26(5), 893-896.
- Young J. K., L. Heetae, J. L. Eun, Ch. Myung-Sub, G. K. Pyo (2013). Identification of human and animal fecal contamination after rainfall in the Han River, Korea. *Microbes and Environments*, 28(2), 187-194.
- Yuanan Lu, S. Suna, Y. Shia, H.-I Tonga, W. Kanga, Z. Wang, E. Allmanna (2016). Effective concentration recovery and detection of infectious adenoviruses from environmentalwaters. *J Virol Methods*; 229:78-85. doi:10.1016/j.jviromet.2016.01.002.