

Trazabilidad de la contaminación fecal humana en Bahía Coronel (Chile) y humedales adyacentes

Human fecal pollution source tracking in Coronel Bay (Chile) and adjacent wetlands

Rodrigo González-Saldía^{1*}, Ivonne Rueda Seguel², Brian Bustamante Ramos³, Verónica Fredes Fierro¹ & Jacqueline Muñoz Hernández¹

¹Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Organismos Marinos, Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

²Universidad de Concepción, Facultad de Arquitectura, Urbanismo y Geografía, Centro de Desarrollo Urbano Sustentable (CEDEUS), Concepción, Chile.

³Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Concepción, Chile.

*Corresponding author: rogonzal@udec.cl

RESUMEN

La contaminación fecal humana del océano costero y de los ecosistemas acuáticos, constituye una preocupación a nivel global, no solo por el riesgo sobre la salud humana, sino que también por sus efectos sobre el ecosistema. En el presente trabajo se trazó la contaminación fecal humana durante la temporada estival de 2019 en Bahía de Coronel y en dos de los cuerpos de agua dulce aledaños que desaguan en el Golfo de Arauco. Se determinó la colimetría total y fecal, el ADN mitocondrial humano (HmtDNA), la biomasa microbiana viva (ATP), el índice de multiresistencia antibióticos (MARi) y los parámetros físico-químicos del agua. Se observó un grado de contaminación fecal de entre uno a dos órdenes de magnitud por sobre la Norma Chilena (NCh.) 1333, así como una correlación positiva y fuertemente significativa ($p << 0,05$), entre la colimetría fecal y la biomasa microbiana viva. En Bahía Coronel, se observó una correlación Log-log significativa ($p < 0,05$), entre la colimetría fecal y el HmtDNA, que indica un origen humano de un 43 %. En los cuerpos de agua dulce, se observa contaminación fecal distinta a la humana. No obstante, la correlación significativa ($p < 0,05$), entre la colimetría fecal y el índice MARi en agua dulce también sugiere un efecto antropogénico. Finalmente, estos resultados indican que, para la fecha del muestreo, el área presentaba riesgo de contaminación microbiológica para la salud humana, lo que eventualmente podría limitar su uso como aguas recreacionales o reservas estratégicas de agua dulce en el futuro.

Palabras clave: ADN mitocondrial humano, ATP, coliformes fecales, contaminación antropogénica, índice de multiresistencia antibióticos.

ABSTRACT

Human fecal pollution in the coastal ocean and fresh water is a global concern, not only regarding the risk to human health, but also due to its effects on the ecosystem. In the present work, human fecal contamination was traced during the 2019 austral summer season in Bahía de Coronel and in two of the adjacent freshwater bodies that drain into the Gulf of Arauco. Total and fecal coliforms, human mitochondrial DNA (HmtDNA), live microbial biomass (ATP), the multiresistance antibiotic index (MARi) and the physical-chemical parameters of the water were determined. In the study area, fecal contamination was observed between one to two orders of magnitude above the Chilean Norm (NCh.) 1333 and a positive and strongly significant correlation ($p << 0,05$), between fecal coliforms and live microbial biomass was determined. In Bahía Coronel a significant Log-log correlation ($p < 0,05$) was observed between fecal coliforms and

HmtDNA, which indicates that at least 43% of the fecal contamination in the bay was from human origin. In the upper part of the adjacent freshwater bodies, fecal contamination is also observed, but from a different origin than human. However, the significant correlation ($p < 0,05$) between fecal coliforms and the MARi index observed for freshwater also suggests an anthropogenic effect in that area. Finally, at the sampling date the results indicate that the study area was risky for human health by microbiological pollution, which could eventually limit its use as recreational ocean waters or strategic reserves of fresh water in the future.

Keywords: anthropogenic pollution, ATP, fecal coliforms, human mitochondrial DNA, multiresistance antibiotic index.

INTRODUCCIÓN

La contaminación fecal es una de las principales preocupaciones en el cuidado de la salud humana. Fundamentalmente tiene relación con los cuerpos de agua que son utilizados para consumo humano, actividades recreacionales y aguas para cultivo de recursos marinos y agropecuarios. Los patógenos asociados a la contaminación fecal pueden dar lugar a enfermedades tanto en humanos, animales de cría y fauna nativa. Así también, produce pérdidas económicas en las industrias que dependen de las aguas costeras e interiores, debido al detrimento de la calidad de agua, lo que disminuye a su vez el interés como área de atractivo turístico y aguas recreacionales.

Los problemas de la contaminación fecal son comunes en todas las naciones, independientemente de la posición económica, aunque el grado de contaminación y el tipo varían de un país a otro (Stewart *et al.* 2007). Sin embargo, en todos los países la contaminación fecal humana produce enfermedades gastrointestinales, como, por ejemplo: diarrea, cólera, Hepatitis A, entre otras (Díaz-Delgado 2003; González-Saldíá *et al.* 2019), las que pueden estar asociadas a actividades recreativas en las aguas marinas costeras y continentales, así como por la ingesta de mariscos contaminados con microorganismos patógenos contenidos en la materia fecal humana (Fattal *et al.* 1987; OMS 1998; Pruss 1998). A nivel mundial la natación en aguas contaminadas con materia fecal y la ingesta de mariscos filtradores extraídos de este tipo de aguas provocan 17 millones de casos de enfermedades infecciosas cada año (Shuval 2003) que se traducen en pérdidas de cientos de millones de dólares anuales.

Las fuentes de contaminación fecal se pueden clasificar en dos grupos: fuentes puntuales que son fácilmente identificables (e.g., derrames ilegales de aguas negras, fugas y

drenajes desde sistemas de alcantarillado de aguas servidas) y las fuentes no puntuales que son más bien difusas en el ambiente y pueden ser difíciles de identificar, como por ejemplo, la agricultura, la vida silvestre, y la escorrentía urbana (Stritholt *et al.* 1998; Dombek *et al.* 2000; Okabe *et al.* 2007; Santo Domingo *et al.* 2007). Es por esto, que conocer el origen de la contaminación fecal es de suma importancia en la evaluación de riesgos asociados a la salud humana, así como para identificar las acciones necesarias para remediar el problema (Scott *et al.* 2002).

Toda contaminación fecal es riesgosa, no obstante, la contaminación fecal de origen humano es potencialmente más peligrosa respecto a los desechos fecales de animales silvestres y/o de granja, puesto que la materia fecal humana está acompañada por diversos patógenos de carácter peligrosos entre los cuales se encuentran *Escherichia coli* (Buchan *et al.* 2001), *Enterococcus faecalis* (Buchan *et al.* 2001), *Salmonella* spp. (Lemarchand & Lebaron 2003), *Campylobacter* spp. (Lemarchand & Lebaron 2003; Horman *et al.* 2004), *Cryptosporidium* y *Giardia* spp. (Horman *et al.* 2004; Harwood *et al.* 2005) y especie específicos como los enterovirus humanos (Horman *et al.* 2004; Harwood *et al.* 2005), adenovirus (Noble & Fuhrman 2001), además de los colifagos (Jiang *et al.* 2001). Desde el punto de vista de la salud pública, los enterovirus humanos, como el virus de la Hepatitis A, son el grupo de organismos patógenos más críticos, debido a que la dosis mínima infecciosa es muy baja, son muy resistentes a los sistemas de desinfección y el control a nivel de laboratorio es costoso (Ayres & Wescot 1987; Wescot & Ayres 1990). Así también, la contaminación fecal de origen no humano es igualmente riesgosa, ya que los animales de granja también pueden hospedar patógenos humanos, incluyendo *E. coli* O157:H7 (cepa potencialmente mortal), *Salmonella* spp. presente en las aves de corral y *Shigella* spp. presente en los

porcinos (Craun *et al.* 2004).

Para trazar la contaminación fecal humana en el ambiente acuático ha sido utilizado, entre otros (ver Hardwood *et al.* 2014, Sabar *et al.* 2022), el gen del citocromo b, presente en el ADN mitocondrial humano. (Caldwell *et al.* 2007; Schill & Mathes 2008; Baker-Austin *et al.* 2010; Roslev & Bukh 2011; Kapoor *et al.* 2013; He *et al.* 2015, 2016; González-Saldía *et al.* 2019; Zhu *et al.* 2020). Particularmente, en la zona costera de la Región del Biobío (González-Saldía *et al.* 2019), se observó una concordancia durante la primavera de 2015, entre los máximos valores promedios de colimetría fecal, el ADN mitocondrial humano (ADNmTH) y el máximo número de casos de hepatitis A reportada por el Ministerio de Salud (González-Saldía *et al.* 2019). Así también, González-Saldía *et al.* (2019), demuestra la presencia del virus de la hepatitis A en organismos y agua de mar en Bahía Concepción. La situación epidemiológica de la hepatitis A en la Región del Biobío demuestra que esta área ha estado en una condición de epidemia de hepatitis A desde el 2014. Para el periodo 2014 - 2019, esta región posee, por lejos la mayor mediana de hepatitis A (918 casos) registrada del país (BET MINSAL, 2019). Solo para a los años 2018 y 2019, la región mostró una tasa de incidencia por cada 100 habitantes de 74,6 y 25,9 respectivamente, siendo las mayores tasas de incidencia del país (incidencia nacional = 16,7 y 5,6 por 100 habitantes para 2018 y 2019 respectivamente; BET MINSAL, 2019).

Junto a la eliminación de aguas residuales humanas o de actividades productivas, como la ganadería y la acuicultura, existe la eliminación de una variedad de substancias químicas asociadas a ellas. Entre las más importantes se encuentran los antibióticos, que han adquirido gran notoriedad pública en los últimos años, debido a la resistencia que microbiana inducida por su uso masivo (Karkman *et al.* 2019). Las bacterias patógenas para humanos o animales de cultivos, que son el objetivo principal del uso de antibióticos, desarrollan procesos adaptativos y selectivos que generan resistencia a este tipo de substancias, siendo hoy en día, una de las principales preocupaciones de la Organización Panamericana y Mundial de Salud (OPS/OMS 2016). Esta alerta se debe a que la resistencia descrita está ocurriendo a una velocidad que supera el descubrimiento y producción de nuevas substancias para tratar las infecciones causadas por bacterias multiresistentes (Lima *et al.* 2017), donde, entre los principales causantes de la diseminación de la resistencia bacteriana a antibióticos se encuentra la contaminación fecal humana y animal (Karkman *et al.* 2019). Especial cuidado, ha adquirido la diseminación del gen *mcr1* entre las bacterias multiresistentes a antibióticos, ya que codifica para la resistencia a Colistina (Erfanianesh & Hashemi 2016; AbuOun *et al.* 2017; Wang *et al.* 2018), que es un antibiótico utilizado como última

opción frente infecciones intrahospitalarias por bacterias multiresistentes a antibióticos.

Bahía Coronel, ubicada en la región del Biobío, Chile, enfrenta problemas de contaminación de sus aguas debido a la presencia de metales pesados, cuyo incremento en los sedimentos ha sido datada desde 1965 (Hidalgo 2017) y en especial, un incremento de la concentración de Hg asociado al inicio de la actividad de plantas termoeléctricas en 2012 (Chandía *et al.* 2022). Así también, se ha determinado la presencia de tributilestaño y sus derivados (Batista *et al.* 2016), un compuesto responsable de imposex en moluscos (Blaber 1970). González-Saldía *et al.* (2019), estableció la presencia de coliformes fecales por sobre la NCh.1333, pero en una sola estación de muestreo próxima a la vecina comuna de Lota. No obstante, no existen estudios sobre la distribución de la contaminación fecal humana dentro de la bahía a pesar de la existencia de múltiples descargas de agua dulce, tanto superficial como submarina.

En el presente trabajo, se dan a conocer los resultados de un estudio microbiológico realizado a fines de enero de 2019 (verano), en la Bahía de Coronel y en dos de los cuerpos de agua dulce que atraviesan la comuna de Coronel. El objetivo específico fue establecer el estado sanitario del área de estudio con respecto a la contaminación fecal humana y la presencia de bacterias multiresistentes a antibióticos contenidas en ella. Los resultados de esta observación se discuten en el contexto de los riesgos para la salud humana y las posibles implicancias ecológicas de los mismos.

METODOLOGÍA

ÁREA DE ESTUDIO, TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La campaña de terreno fue realizada en pleno verano de 2019, con el objetivo de conocer la carga de material fecal en la estación de mayor afluencia de población flotante a la playa y por lo tanto de un mayor contacto efectivo con el agua de mar, lo que sugiere que es la de mayor riesgo para la salud de las personas debido a este tipo de contaminación. La campaña de terreno se realizó en dos etapas. La primera (28/01/2019), correspondió a la toma de muestra en ocho estaciones de Bahía Coronel (Fig. 1); siete fueron distribuidas dentro de la bahía y una estación (C7) fuera de ella, la cual fue utilizada como referencia. La grilla de muestreo fue diseñada para poder ver el efecto de dilución desde tierra hasta la columna de aguas fuera de la bahía. En cada estación se tomó una muestra del estrato superficial (0m) y una del estrato más profundo (6 a 10m). Las muestras fueron tomadas con una botella Niskin y posteriormente submuestreadas en botellas de estériles de 1L. En cada muestra se midió el oxígeno

disuelto, temperatura y pH. Adicionalmente se obtuvo un perfil de CDT de cada estación mediante una sonda Star-Oddi Data Logging System. Las muestras fueron transportadas en cajas térmicas al laboratorio para su inmediato procesamiento y análisis. La segunda etapa (29/01/2019), correspondió a la toma de muestra de los cuerpos de agua dulce que atraviesan la comuna (Fig. 1). Se realizaron también un total de ocho estaciones superficiales; de C9 a C12 corresponde a las estaciones del acuífero conformado desde el sector Calabozo hasta el Humedal Boca Maule, siendo la estación C12 la única de agua de mar, correspondiente al sector de la desembocadura de dicho humedal. El resto de las estaciones superficiales fueron tomadas en el estero Manco, desde el sector de la Cascada hasta su desembocadura. Nuevamente, la última muestra de este sector correspondió a Playa Negra (agua de mar). En cada estación la muestra fue tomada directamente con una botella estéril y adicionalmente se tomó una muestra para determinar el oxígeno disuelto. Temperatura y pH fueron medidos directamente mediante un pH metro MW 102 Milwaukee, asociado a una termocupla. Las muestras fueron transportadas en cajas térmicas al laboratorio para su inmediato procesamiento y análisis.

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS INDICADORAS FÉCALES (FIB=FECAL INDICATOR BACTERIA)

A todas las muestras de agua tomadas, se determinó el Número más Probable (NMP), de coliformes totales (CT) y fécales (CF), siguiendo el protocolo PRT-712.03-005 (ISP, 2010) para agua dulce y marinas según APHA (2005).

DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA MICROBIANA VIVA (ATP)

La determinación de la fracción de ATP presente en las muestras se realizó en dos etapas siguiendo la metodología descrita por Holmes-Hansen & Booth (1966). 1L de la muestra fue filtrada por Ester de Celulosa 0,22 µm (Millipore) bajo vacío inferior a 100 mm de Hg. El material obtenido en el filtro fue sometido a una extracción del ATP mediante un baño de ebullición con buffer orgánico (Buffer Tris 20 mM, pH 7,7). La cuantificación del ATP extraído fue realizada mediante el ensayo de bioluminiscencia para el cual se utilizó un ATP meter Turner Designs Model TD 20/20, frente a una curva de calibración construida entre 0,01 y 100 nM, preparada desde una solución madre de 1 M de ATP, mediante diluciones seriadas y para cuantificar el ATP extraído se utilizó FLE-250 para generar el complejo enzima-substrato.



FIGURA 1. Área de estudio. / Study area.

DETERMINACIÓN DEL DNA MITOCONDRIAL HUMANO (HmtDNA)

A partir de 500 mL de las muestras obtenidas, se obtuvo el material particulado retenido en filtros de Polysulfona de 0,22 µm (Millipore), a los cuales se les realizó una extracción de ADN mediante un buffer de lisis que contiene Tris-HCl 20mM a pH 5,2, EDTA 50 mM, SDS al 10% (p/v) y proteinasa K (10 mg mL⁻¹). La mezcla obtenida se incubó a 50°C por 10 min y luego a -20°C por 20 min (repitiendo dos veces este paso), para luego centrifugar a 14000 rpm por 5 min. Al sobrenadante obtenido se agregó 500 µL de cloroformo: fenol: alcohol isoamílico (24:25:1), agitado mediante vórtex y luego centrifugado a 14000 rpm por 5 min. Posteriormente, mediante el uso de 2,5 volúmenes de etanol al 95% (v/v), se obtuvo el precipitado de los ácidos nucleicos. El pellet obtenido fue suspendido en agua PCR, la concentración de ADN y su pureza fueron determinadas mediante el equipo NanoDrop 2000. La calidad del ADN obtenido se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red y verificado bajo un transiluminador UV. El ADN obtenido se utilizó para determinar el HmtDNA mediante el uso de sondas TaqMan para qPCR mediante la utilización de un termociclador en tiempo real (Rotor Gene 6000 Corbett). Para la amplificación de la región de ADN mitocondrial se utilizaron los partidores HcytB-F y HcytB-R y la sonda HProbe (Baker-Austin *et al.* 2010). Se utilizó como control positivo un amplicón de PCR purificado con un número de copias del HmtDNA conocido, estimado mediante la siguiente ecuación: N = [D / (ALX660)] X 6,022 x 10²³, donde D (ng /µL) es la concentración del amplicón de PCR y AL (en pares de bases) es la longitud de amplicón. La determinación del número de copias del HmtDNA se calculó mediante una curva de calibración de diluciones en orden logarítmico desde 10² a 10⁸ copias/µL. Las eficiencias de la amplificación y los análisis de los datos obtenidos en el qPCR se realizarán mediante el Software Rotor Gene 1.7.

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Los cultivos positivos de coliformes fecales obtenidos se utilizaron para preseleccionar cepas multiresistentes a antibióticos. Estas cepas fueron sembradas en placas de agar LB marino con penicilina-estreptomicina y ampicilina, las colonias con crecimiento positivo fueron incubadas en medio líquido LB marino con el antibiótico que presentó crecimiento positivo. Posteriormente, se determinó la resistencia a antibióticos mediante el método de difusión en disco utilizando cuatro multidiscos (Valtek) que cubren las siguientes familias de antibióticos: anfenicol (cloranfenicol 30 µg), amino glucósido (amikacina 30 µg, gentamicina 10 µg, neomicina 30 µg), betalactámico (Sulfatamos / Ampicilina 10/10 µg), Cefalosporina / Cefem (Ceftazidime 30 µg, Cefuroxima 30

µg, Cefalotina 30 µg, Cefadroxil 30 µg, Cefazolin 30 µg), derivado de quinolona ácido 20 µg, ciprofloxacino 5 µg, norfloxacino 10 µg), macrólidos y lincosamida (eritromicina 15 µg, clindamicina 2 µg), nitrofurano (furazolidona 100 µg, nitrofurantoína 300 µg), penicilina (ampicilina 10 µg, oxacilina 1 µg U, penicilina 10 U), sulfonamida y similares (Sulfatrimetroprim 25 µg, sulfonamida 250 µg) y tetraciclina 30 µg. Los resultados obtenidos se usaron para calcular el índice de multiresistencia a antibióticos (MAR): a / b donde a es un número de antibióticos a los que la cepa es resistente y b es el número total de antibióticos expuestos.

CONSTRUCCIÓN DE MAPAS DE RIESGO

Para la elaboración de cartografías se utilizó una interpolación de distancia inversa (IDW) en el software ArcGIS 10.6, la cual estima los valores de las celdas calculando promedios de los valores de los puntos de datos de muestra en la vecindad de cada celda de procesamiento, dando como resultado mapas de densidad con diferentes intensidades de color, permitiendo reconocer áreas de mayor o menor concentración de las variables.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron análisis estadísticos de los resultados obtenidos en el período de estudio asociado a las correlaciones entre los parámetros microbiológicos y bioquímicos. En un primer paso, se analizó la homogeneidad de la varianza de los datos mediante la prueba estadística de Bartlett y la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, ya que no se puede asumir desde el n = 24. Comprobada la normalidad se determinaron las correlaciones entre coliformes fecales (CF), ADN mitocondrial humano (HmtDNA), biomasa microbiana viva (ATP) e Índice de Multiresistencia a antibióticos (MAR), obteniendo el coeficiente de correlación de Pearson con sus respectivos coeficientes de determinación y valor p. Además, para determinar su significancia, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Todos estos análisis se realizaron con el software estadístico R Studio 3.1.3.

RESULTADOS

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Los resultados indican que la temperatura superficial para la Bahía de Coronel se encontró en promedio a 15,6 ± 0,9 °C (rango 14,1 - 16,4 °C) y en estrato profundo (10m) a 13,2 ± 0,6°C (rango 12,7 - 14,0 °C). Para los cuerpos de agua dulce la temperatura superficial promedio corresponde a 19,1 ± 4,4 °C (rango 14,4 - 23,1°C), donde se observa además un incremento de temperatura desde su parte alta a la

desembocadura. Este mismo comportamiento se observó en los cuerpos de agua dulce para el pH, con un promedio de $8,0 \pm 0,9$ (rango 7,0 – 9,8). En la bahía se observó un pH promedio de $8,7 \pm 0,1$ (rango 8,46 – 8,85). Para el estrato superficial de la bahía (0m), se observó una concentración promedio de oxígeno disuelto de $3,23 \pm 1,19 \text{ mL L}^{-1}$ (rango 1,31 – 5,12) y para el estrato 10 m de $2,88 \pm 1,07 \text{ mL L}^{-1}$ (rango 1,31 – 4,94). En los cuerpos de agua dulce la concentración promedio de oxígeno disuelto se observó en $3,47 \pm 0,49 \text{ mL L}^{-1}$ (rango 2,86 – 4,09).

Para caracterizar los parámetros físico-químicos la columna de agua de Bahía Coronel, se graficaron dos

transectas: La primera más paralela a la costa en el interior de la bahía (Estaciones C6, C5 y C2), de Noroeste a Sureste (NO - SE) y la segunda saliendo de la bahía (Estaciones C1, C5 y C7), en dirección Noreste-Suroeste (NE - SO). La temperatura muestra una disminución en toda la columna de agua desde el NO hacia el SE (Fig. 2a) y un máximo en superficie hacia el interior de la bahía (Fig. 2d, Estación C6). El oxígeno muestra un mínimo en superficie hacia el interior de la bahía (hacia C6; Fig. 2b) y en profundidad de NE a SO (Fig. 2e). La salinidad muestra un mínimo en superficie, tanto al interior de la bahía, como hacia el SO saliendo de la Bahía (Fig. 2c y g).

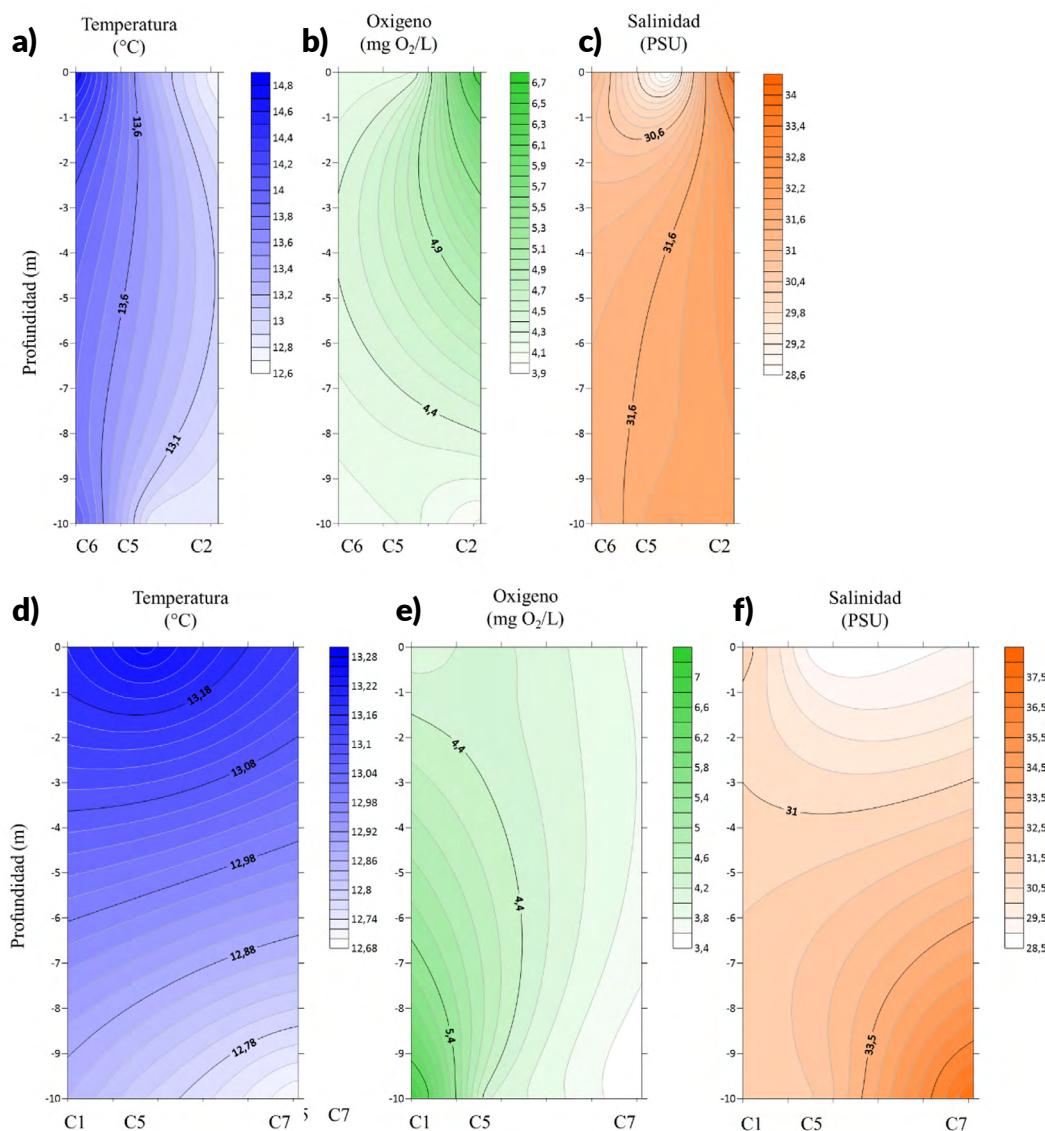


FIGURA 2. Transecta paralela a la costa (C6, C5, C2): a) Temperatura, b) Oxígeno, c) Salinidad. Transecta perpendicular a la costa (C1, C5, C7): d) Temperatura, e) Oxígeno, f) Salinidad. / Transect parallel to the coast (C6, C5, C2): a) Temperature, b) Oxygen, c) Salinity. Transect perpendicular to the coast (C1, C5, C7): d) Temperature, e) Oxygen, f) Salinity.

COLIMETRÍA, BIOMASA MICROBIANA VIVA (ATP), HmtDNA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN LA BAHÍA DE CORONEL Y CUERPOS DE AGUA DULCE DE LA COMUNA

Los resultados obtenidos para estos parámetros se encuentran contenidos en la Tabla 2. En la Bahía de Coronel, se observó un valor promedio para la colimetría total de 42.994 ± 58.760 NMP 100 mL^{-1} (rango 700 – >160.000) y de 37.360 ± 61.094 NMP 100 mL^{-1} (rango 460 – > 160.000), para la colimetría fecal. Para la biomasa microbiana viva (ATP), se observó un valor promedio de 428 ± 168 pM (rango 134 – 680) y de $2,4 \times 10^{12} \pm 7,5 \times 10^{12}$ copias 100 mL^{-1} (rango nd – $2,4 \times 10^{13}$) para el HmtDNA. Para los cuerpos de agua dulce se observó un valor promedio para la colimetría total de 21.000 ± 10.844 NMP 100 mL^{-1} (rango 7.000 – 35.000) y de 13.600 ± 11.295 NMP 100 mL^{-1} (rango 4.600 – 28.000), para la colimetría fecal. Para la biomasa microbiana viva (ATP), se observó un valor promedio de 247 ± 54 pM (rango 194 – 342) y de $7,0 \times 10^9 \pm 9,0 \times 10^9$ copias 100 mL^{-1} (rango nd – $2,0 \times 10^{10}$) para el HmtDNA.

Para la data total obtenida del área de estudio, se determinó la existencia de una correlación altamente significativa ($p << 0,05$), entre la colimetría fecal y la biomasa microbiana viva (Fig. 3a). Esta correlación, también se observó por separado en la Bahía de Coronel y los cuerpos de agua dulce analizados (Fig. 3b y 3c). Sumado a lo anterior, fue posible determinar una correlación significativa ($p < 0,05$), para la colimetría fecal y el HmtDNA en la Bahía de Coronel, no así en los cuerpos de agua dulce (Fig. 4).

En la estación 7 (C7), utilizada como área control fuera de la Bahía de Coronel, se observaron los mínimos valores de colimetría total, fecal, HmtDNA y biomasa microbiana viva en el estrato de 30 m de profundidad (Fig. 6, Tabla 2). En esta estación además se observó un mínimo de salinidad superficial (Fig. 2g).

ANÁLISIS MAR

En la Bahía de Coronel, para el índice MAR, se observó un valor promedio de $0,31 \pm 0,14$ (rango 0,13 – 0,54) y se aislaron enterobacterias resistentes a Colistina en el 25 % de las muestras analizadas. En los cuerpos de agua dulce, para el índice MAR, se observó un valor promedio de $0,33 \pm 0,09$ (rango 0,21 – 0,46) y se aislaron enterobacterias resistentes a Colistina en el 42 % de las muestras analizadas. El análisis para la colimetría fecal y el índice MAR, demuestra una correlación significativa ($p < 0,05$), pero solo en los cuerpos de agua dulce (Fig. 5).

MAPAS DE RIESGO MICROBIOLÓGICO

La interpolación de la data total de colimetría fecal a 0m obtenida de la Bahía de Coronel, demuestra que toda el área de estudio está en riesgo microbiológico dado que todas las muestras analizadas para este estrato presentan valores mayores que la NCh. 1.333 (Fig. 7a). En el estrato superficial, se observan principalmente dos núcleos de alta concentración para la colimetría fecal, la biomasa microbiana viva y el Índice MAR, al interior de la bahía (Figs. 7a, 7b y 7c). No obstante, para el HmtDNA (Fig. 7d) se observa solo un núcleo de alta concentración en la estación 8 (Fig. 7d; C8), sin la presencia del núcleo de alta concentración en la estación 6 (C6), como en los otros parámetros. Esto se debe a que, por razones técnicas, las muestras de C6 no amplificaron para ningún estrato. Finalmente, cuando se aísla el estrato de 10 m, se mantiene la consistencia en la distribución de las concentraciones para la colimetría fecal y la biomasa microbiana viva, entorno a C6 (Figs. 8a y 8b), no obstante, el índice MAR y el HmtDNA poseen distribuciones disímiles (Figs. 8c y 8d).

TABLA 1. Requisito bacteriológico de calidad de agua para diferentes usos, extraído desde la Norma Chilena Oficial NCh. 1333 (1978, modificada 1987). / Bacteriological water quality requirement for different uses, extracted from the Chilean Official Standard NCh. 1333 (1978, codified 1987).

Uso de agua	Coliformes fecales máximo NMP/100 mL
Agua para consumo humano	0
Riego	≤ 1000
Recreación con contacto directo	≤ 1000
Recreación sin contacto directo	no existe indicación
Agua destinada a estética	no existe indicación
Vida acuática	no existe indicación

TABLA 2. Resumen de resultados obtenidos del muestreo de bahía Coronel y cuerpos de agua dulce. nd= no data. / Summary of results obtained from sampling Coronel Bay and freshwater bodies.

Estaciones	Profundidad (m)	C. Totales (NMP/100mL)	C. Fecales (NMP/100mL)	ATP (pmol/L)	HmtDNA (Nº copias/100mL)	Índice MAR	Presencia colistina
C1	0	28.000	17.000	520	nd nd	0,2	-
	10	14.000	9.400	387		0,3	-
C2	0	17.000	17.000	544	$5,3 \times 10^{05}$	0,5	+
	10	22.000	9.400	358		0,2	-
C3	0	9.400	3.500	281	$1,4 \times 10^{05}$ nd	0,3	-
	10	2.800	1.700	210		0,2	-
C4	0	15.000	5.400	337	$6,3 \times 10^{04}$ nd	0,2	-
	10	12.000	4.300	305		0,4	+
C5	0	28.000	17.000	529	$7,3 \times 10^{07}$	0,5	+
	10	35.000	14.000	453		0,1	-
C6	0	160.000	160.000	680	nd nd	0,4	+
	10	160.000	160.000	692		0,2	-
C7	0	17.000	14.000	516	$1,5 \times 10^{06}$	0,5	+
	10	7.000	4.600	277		0,2	-
	30	700	460	134		0,4	+
C8	0	160.000	160.000	629	$2,4 \times 10^{13}$	0,3	-
C9	0	14.000	7.000	242	$1,3 \times 10^{05}$	0,3	-
C10	0	14.000	4.600	221	$1,9 \times 10^{09}$	0,4	+
C11	0	7.000	4.600	209	$2,0 \times 10^{10}$	0,4	+
C12	0	35.000	17.000	253	$1,1 \times 10^{05}$	0,3	-
Cascada	0	28.000	9.400	194	nd	0,2	-
Puente	0	35.000	28.000	273	nd	0,3	-
Des. Manco	0	28.000	28.000	342	$5,2 \times 10^{09}$	0,5	+
Playa Negra	0	160.000	160.000	597	$1,0 \times 10^{10}$	0,5	+

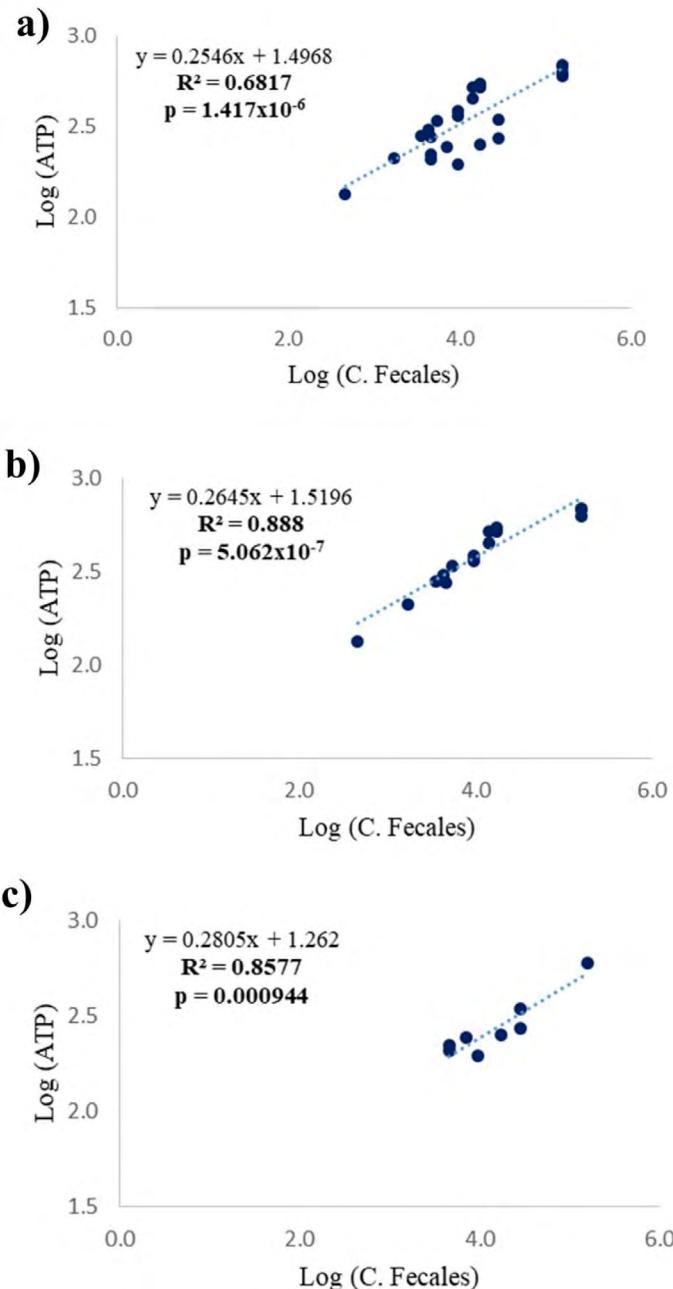


FIGURA 3. Correlaciones entre la colimetría fecal y la biomasa microbiana viva a) total b) Bahía Coronel c) Cuerpos de agua dulce. / Correlations between fecal colimetry and live microbial biomass a) total b) Coronel Bay c) Freshwater bodies.

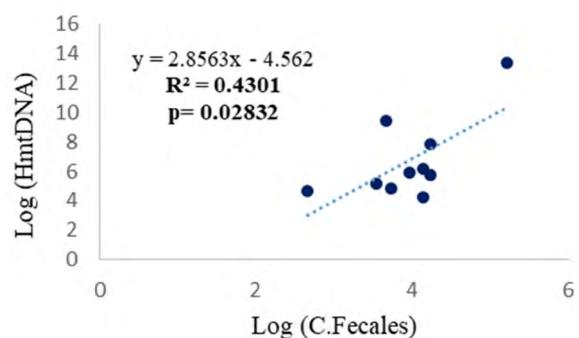


FIGURA 4. Correlación entre la colimetría fecal y el DNA mitocondrial humano (HmtDNA) en Bahía Coronel. / Correlation between fecal colimetry and human mitochondrial DNA (HmtDNA) in Coronel Bay.

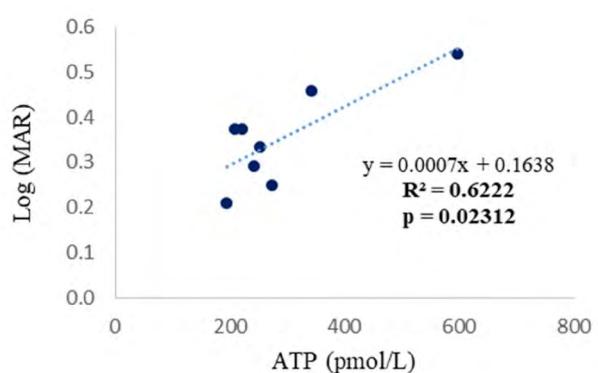


FIGURA 5. Correlación entre la colimetría fecal e Índice MAR en cuerpo de agua dulce de la comuna de Coronel. / Correlation between fecal colimetry and MAR Index in a freshwater body of the Coronel commune.

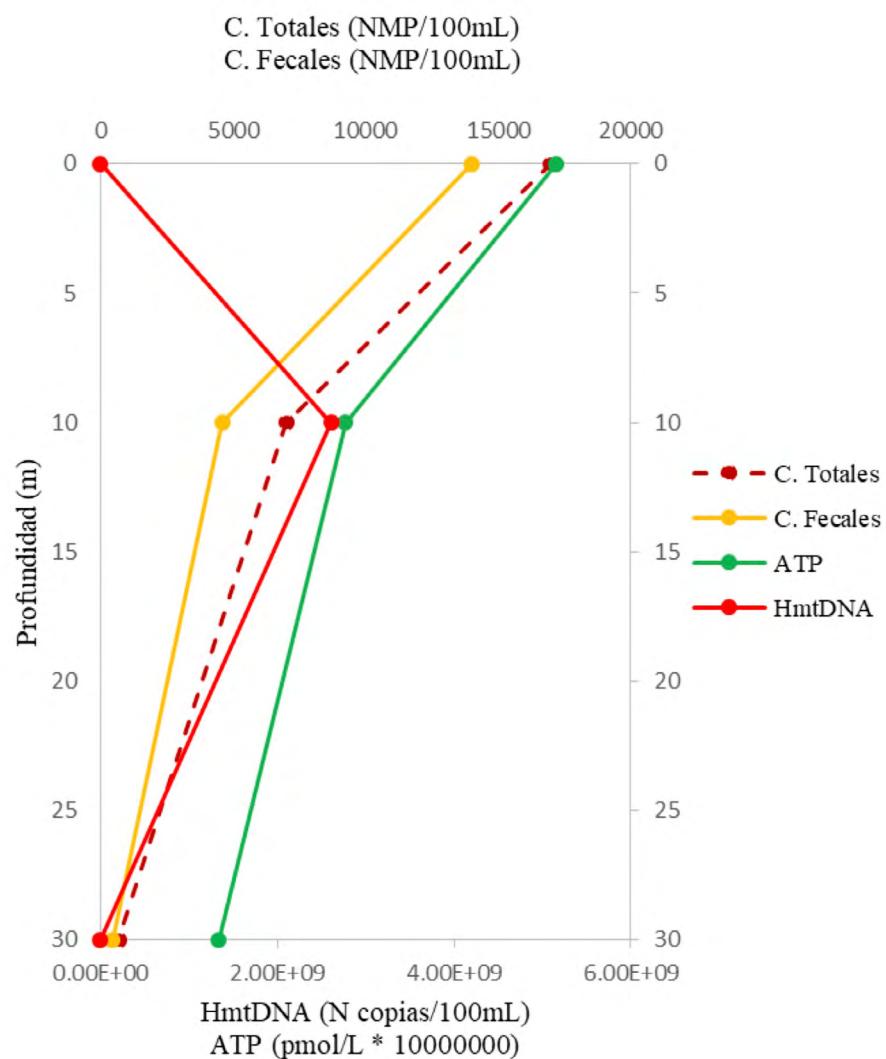


FIGURA 6. Perfiles de la estación control (referencia) C7 fuera de Bahía Coronel. / Profiles of the control station (reference) C7 outside Coronel Bay.

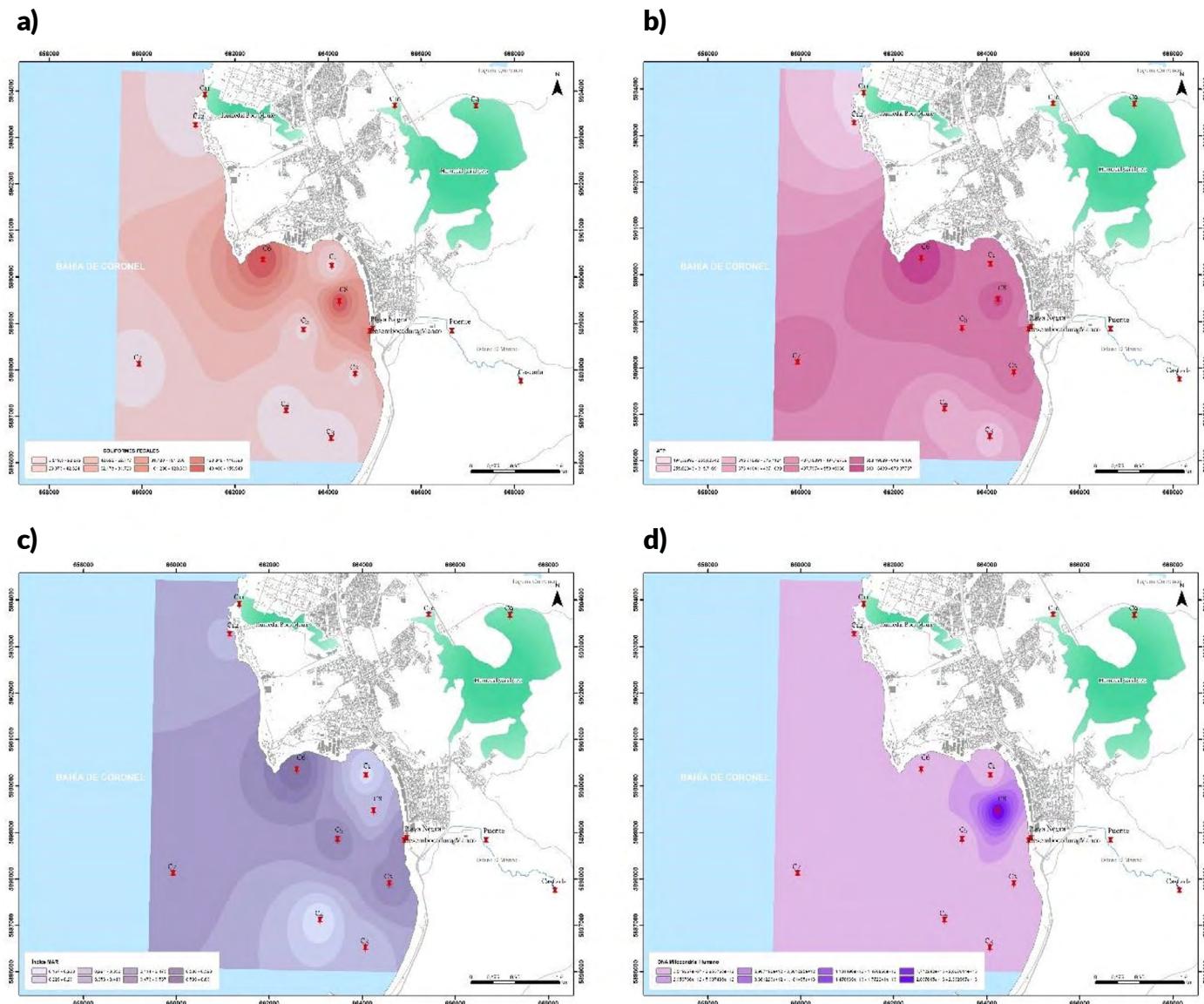


FIGURA 7. a) Colimetría fecal, b) Biomasa microbiana viva (ATP), c) Índice MAR y d) HmtDNA en el estrato superficial de la Bahía de Coronel. La cartografía solo contempla las estaciones de la zona costera. / a) Fecal colimetry, b) Live microbial biomass (ATP), c) MAR index and d) HmtDNA in the superficial stratum of Coronel Bay. The cartography only includes the stations in the coastal zone.

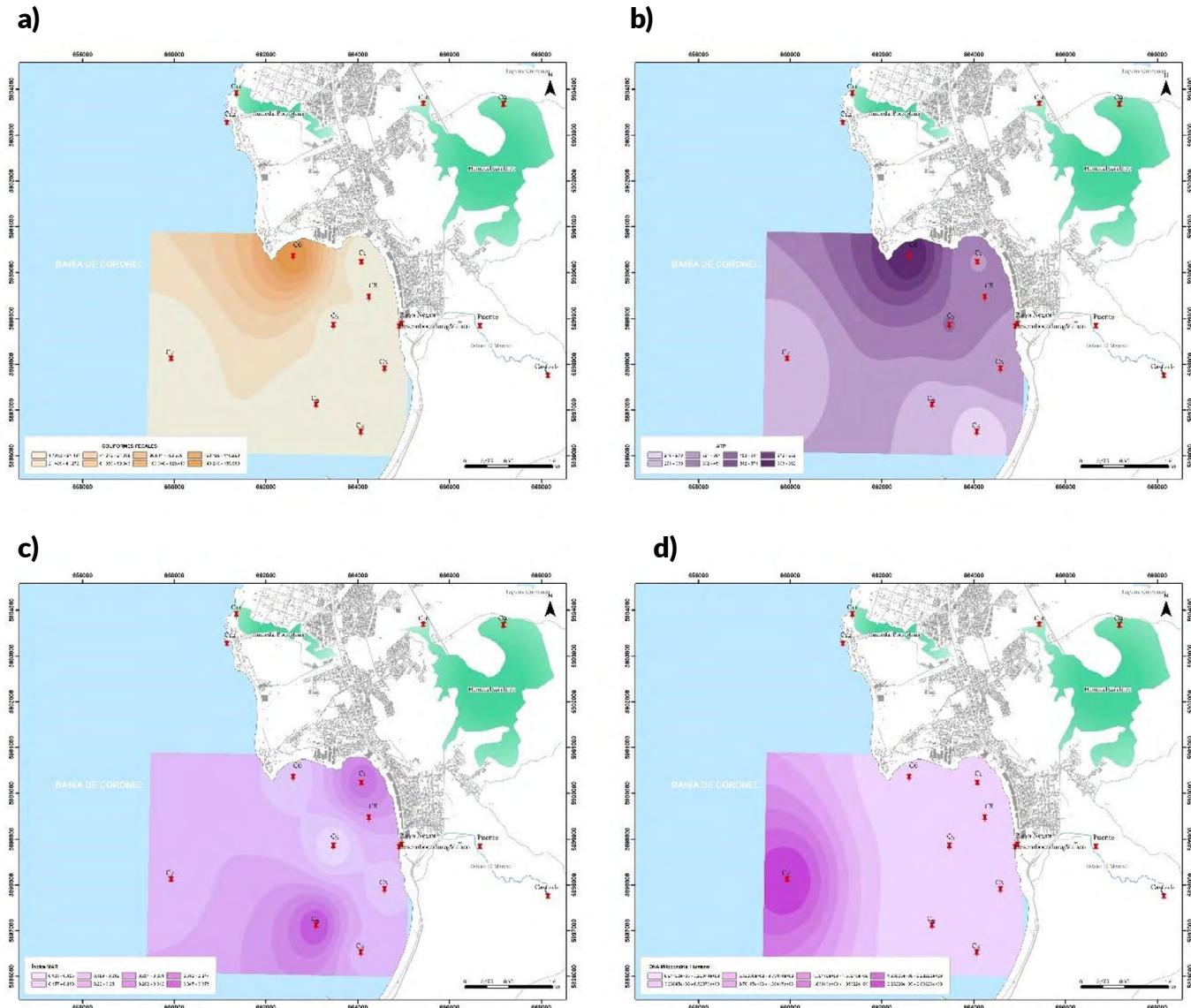


FIGURA 8. a) Colimetría fecal, b) Biomasa microbiana viva (ATP), c) Índice MAR y d) HmtDNA en el estrato 10 m de la Bahía de Coronel. La cartografía solo contempla las estaciones de la zona costera. / a) Fecal colimetry, b) Live microbial biomass (ATP), c) MAR index and d) HmtDNA in the 10 m stratum of Coronel Bay. The cartography only includes the stations in the coastal zone.

DISCUSIÓN

Los parámetros fisicoquímicos determinados, son consistentes con el sistema de surgencia frente a la costa de la región del Biobío, durante la temporada estival (Brandhorst 1971; Ahumada & Chuecas 1979; Schneider *et al.* 2017). Esta gran área oceanográfica, se caracteriza en verano por las bajas concentraciones de oxígeno disuelto, como consecuencia de la intensificación de la zona de mínimo oxígeno (Sievers & Silva 1982; Silva 1983). Esto es consistente con los bajos valores promedios de oxígeno disuelto observado en el presente estudio ($3,23 \pm 1,19 \text{ mL O}_2 \text{ L}^{-1}$).

Los valores de la colimetría fecal observada en toda el área de estudio corresponden a uno y en casos puntuales, hasta dos órdenes de magnitud mayores que lo establecido en la NCh. 1333 (Tabla 1). Solo la estación C7 (Fig. 1), mostró un valor menor a la NCh.1333 en el estrato más profundo (Fig. 6) y más salino (Fig. 2f). No obstante, el estrato más superficial y con una mayor concentración de coliformes fecales, está asociado a una entrada de agua dulce (menor salinidad C7, Fig. 2f). Los valores de coliformes fecales determinados en el presente estudio, están en el rango de lo observado previamente para la zona costera de la Región del Biobío, así como también para los valores de la biomasa microbiana viva (ATP) y HmtDNA (González-Saldía *et al.* 2019).

Los valores del índice MAR en promedio, están sobre lo que se considera como los valores basales (0,22), que se pueden encontrar en ambientes con baja perturbación antrópica. Más aún, el máximo valor observado corresponde a 0,54, que equivale a que los aislados bacterianos en una muestra son capaces de resistir la acción de 13 de los 24 antibióticos testeados en el presente estudio. Este hallazgo también es consistente con la presencia de enterobacterias aisladas que poseen resistencia a Colistina en un 42% de muestras totales analizadas, siendo el porcentaje de enterobacterias aisladas resistentes a Colistina mayores en agua de mar que en agua dulce. La resistencia a Colistina ha acaparado la atención de la Organización Panamericana y Mundial de Salud (OPS/OMS 2016), debido a que la resistencia transmisible a este antibiótico de última línea, utilizado para tratar infecciones intrahospitalarias por bacterias multiresistentes, se ha expandido a nivel mundial rápidamente (Erfanianesh & Hashemi 2016; AbuOun *et al.* 2017; Wang *et al.* 2018), debido a su uso veterinario, como antibiótico, pero también como factor de crecimiento. Se calcula que para el año 2050, las infecciones por bacterias multiresistentes a antibióticos, podrían ser la primera causa de muerte a nivel mundial (Aslam *et al.* 2018)

La correlación altamente significativa ($p << 0,05$)

encontrada entre la colimetría fecal y la biomasa microbiana viva (Figs. 3a, 3b y 3c), indican que una alta proporción de los microbios presentes en las muestras de agua de toda el área de estudio, corresponden a microbios entéricos. En el caso de Bahía Coronel, la correlación significativa ($p < 0,05$), encontrada entre la colimetría fecal y en HmtDNA indica que la alta contaminación por coliformes fecales presentes en la columna de agua de la bahía sería de origen humano. En la estación 8 (C8), que solo fue muestreada en superficie, se determinó el mayor número de copias del gen COI, utilizado en el presente estudio para identificar el DNA mitocondrial humano (HmtDNA; Fig. 7d). Consistentemente, en esta misma estación, se determinó una de las más altas colimetrías fecales determinadas, así como en la estación C6 (Tabla 2; Fig. 7a). En el Humedal Calabozo, la detección del HmtDNA y las colimetrías fecales entre 4,6 a 7 veces sobre la NCh.1333 (Tabla 1 y Tabla 2), indican la presencia de material fecal humano, no obstante, parte de esta contaminación también puede ser producto de contaminación fecal de un origen distinto al ser humano debido a la falta de correlación entre estos dos parámetros y a la actividad agrícola de la zona. No obstante, un mayor número de muestras y en distintos períodos del año, deberían ser realizadas para incrementar la resolución espaciotemporal de la trazabilidad de la contaminación fecal existente en esta área, incluido el Humedal Boca Maule. En tanto, la ausencia de detección de HmtDNA en el sector Cascada y Puente del Estero Manco, indica que la contaminación fecal determinada ahí correspondería a un origen no humano, siendo también la actividad agrícola y otras fuentes difusas, la explicación más plausible para dicha contaminación. Un estudio con mayor resolución espacio-temporal también debería ser realizado en esta área para trazar el origen más preciso de la contaminación fecal ahí determinada. Ese estudio podría proporcionar la información base para diseñar medidas de mitigación y erradicación de la contaminación fecal en estos cuerpos de agua dulce que pudiesen ser utilizados con fines recreacionales o como reservas de agua dulce estratégicas en caso de emergencias, como las catástrofes naturales observadas regularmente en nuestro país.

La correlación positiva y significativa entre la colimetría fecal y el índice MAR determinada en los cuerpos de agua dulce, sugiere que este tipo de contaminación es uno de los factores principales para la diseminación de bacterias multiresistentes en esta área, como ha sido descrito previamente para ambientes contaminados con material fecal humano y de animales de crianza (Karkman *et al.* 2019).

Finalmente, los mapas de riesgo microbiológico (Figs. 7 y 8), son consistentes con las correlaciones significativas observadas en el presente estudio entre la colimetría fecal y la

biomasa microbiana viva, así como con el DNA mitocondrial humano (HmtDNA). Dos son los focos de contaminación fecal determinada en Bahía Coronel (estaciones C6 y C8; Fig. 7a), siendo uno de ellos, consistente con contaminación fecal humana (C8). Desafortunadamente y por un error técnico, no fue posible amplificar HmtDNA desde las muestras obtenidas en la estación 6 (C6) y tampoco a la fecha ha sido posible repetir esta muestra. No obstante, el valor de colimetría determinado en la estación C6 (160.000 NMP 100 mL⁻¹; Tabla 2), independiente de la especie de origen que se trate, indica un riesgo para la salud de población humana costera.

En el futuro, el comportamiento estacional de la contaminación fecal humana, al interior de Bahía Coronel y la zona costera adyacente, debería ser determinado considerando las variables climáticas, en especial el régimen de viento, que domina la circulación de la zona costera de la Región del Biobío (Schneider *et al.* 2017; Sobarzo *et al.* 1997). En un contexto climático, la contaminación fecal humana de esta zona podría verse agravada en el tiempo, ya que se pronostica un incremento en la frecuencia y magnitud de los episodios de tormenta en la zona costera de Chile (Vicuña *et al.* 2013), así como un oleaje cada vez más paralelo a la costa (Goubanova *et al.* 2011). Este efecto podría incrementar la retención de las partículas en el borde costero, las que podrían ser transportadas por los aerosoles, sobre la población humana costera, como lo demuestran experimentos de dispersión de colorantes en la zona de rompiente que han detectado la marca química a más medio Km tierra adentro y por al menos dos días (Pendergraft *et al.* 2021). El efecto de los aerosoles sobre la salud de la población humana costera ha sido demostrado, por ejemplo, durante florecimientos activos de *Karenia brevis*, un microorganismo productor de brevetoxinas capaces de producir síntomas respiratorios de las vías altas y bajas, especialmente en personas con asma bronquial, que habitan o visitan la zona costera durante estos florecimientos (Fleming *et al.* 2006). Así también, el transporte hacia tierra de microrganismos patógenos y substancias químicas típicas de la contaminación por aguas servidas vertidas en la zona costera ha sido demostrada recientemente (Pendergraft *et al.* 2023). Finalmente, a pesar de que el límite para el riesgo de la salud humana con respecto a los niveles de contaminación fecal en el agua está establecido por normas a nivel internacional, por ejemplo, la Norma Chilena 1333 (≤ 1000 NMP 100mL⁻¹), o sus análogas (p.e. EEUU ≤ 200 NMP 100mL⁻¹), estas consideran solo el contacto directo con la matriz acuática. Al respecto, cuál es el límite en los aerosoles, así como sus implicancias sobre la salud humana, aún es materia de investigación.

CONCLUSIONES

La contaminación fecal determinada en el área de estudio se encuentra uno a dos órdenes de magnitud mayores con respecto a la NCh. 1333.

La contaminación fecal del área de estudio corresponde a bacterias entéricas capaces de soportar las condiciones ambientales, pudiendo ser persistentes en el tiempo.

Existe un alto riesgo para la salud humana en el área de estudio durante el periodo estival, lo que es consistente con el alto índice de Hepatitis A de la población humana costera de la comuna de Coronel.

La erradicación de este tipo de contaminación en el área de estudio podría tener un rol muy importante para detener los procesos de expansión de la multiresistencia a antibióticos en la comuna de Coronel.

Se recomienda estudiar el comportamiento de la contaminación fecal humana en distintas condiciones estacionales (climáticas), a través del año, para establecer las áreas de mayor riesgo para la salud humana a través de tiempo, así como las posibles vías alternativas de exposición a este riesgo microbiológico (e.g., rol de los aerosoles marinos).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue el resultado de un proyecto colaborativo impulsado por la SEREMI de Medioambiente de la Región del Biobío a través del Programa de Recuperación Ambiental y Social (PRAS) Coronel, las empresas ENEL y Cabo Froward, las Organizaciones sociales a través del Consejo para la Recuperación Ambiental y Social (CRAS) Coronel y la Universidad de Concepción. La Universidad de Concepción, financió los análisis a través de sus proyectos VRID 218.112.110-1.0 de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (UdeC) y del Centro COPAS Sur-Austral CONICYT PIA PFB31 y APOYO CCTE AFB170006.

REFERENCIAS

- AbuOun, M., Stubberfield, E.J., Duggett, N.A., Kirchner, M., Dorner, L., Nunez-Garcia, J., Randall, L.P., Lemma, F., Crook, D.W., Teale, C., Smith, R.P., Anjum, M.F. 2017. mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72(10): 2745-2749.

- Ahumada, R., Chuecas, L. 1979. Algunas características hidrográficas de la Bahía de Concepción (36°40'39"S; 73°02'39"W) y áreas adyacentes. *Gayana Misc.* 8: 1-56.
- APHA. 2005. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21° Edition. American Public Health Association, Washington. 55 pp.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M.I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M.H., Muhammad, A., Nisar, M.A., Alvi, R.F., Aslam, M.A., Qamar, M.U., Salamat, M.K.F., Baloch, Z. 2018. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance* 11: 1645-1658.
- Ayres, R., Wescot, D. 1987. La calidad del agua en la agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudio FAO Riego y Drenaje, N° 29. Roma. pp 8-101.
- Baker-Austin, C., Rangdale, R., Lowther, J., Lees, D.N. 2010. Application of mitochondrial DNA analysis for microbial source tracking purposes in shellfish harvesting waters. *Water Science & Technology* 61(1): 1-7.
- Brandhorst, W. 1971. Condiciones oceanográficas estivales frente a la costa de Chile. *Revista de Biología Marina (Chile)* 14: 45-84.
- Buchan, A., Alber, M., Hodson, R.E. 2001. Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S 23S intergenetic spacer region. *FEMS Microbiology Ecology* 35(3): 313-321.
- Caldwell, J., Payment, P., Villemur, R. 2007. Mitochondrial DNA as Source Tracking Markers of Fecal Contamination. En: *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*. Cap. 10: 229-250
- Craun, G.F., Calderon, R.L., Craun, M.F. 2004. En: Cotruvo, J.A., Dufour, A., Rees, G., Bartram, J., Carr, R., Cliver, D.O., Craun, G.F., Fayer, R., Gannon, V.P.G. (Eds.) *Waterborne outbreaks caused by zoonotic pathogens in the USA*. World Health Organization, IWA Publishing, London. pp 120-135.
- Díaz-Delgado, C. 2003. Red Iberoamericana de potabilización y depuración del agua (RIPDACYTED): Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas. Cap. 20: 105-109., en XII Congreso Nacional de Irrigación - Universidad Autónoma de Zacatecas, México.
- Dombek, P.E., Johnson, L.K., Zimmerley, S.T., Sadowsky, M.J. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied Environmental Microbiology* 66(6): 2572-2577.
- Erfanianmanesh, S., Hashemi, A. 2016. Global Dissemination of the Mcr-1 Colistin Resistance Gene. *Archives of Pediatric Infectious Diseases* 4(3): 38581.
- Fattal, B., Peleg-Olevsky, E., Agrushy, T., Shuval, H.I. 1987. The association between seawater pollution as measured by bacterial indicators and morbidity among bathers at Mediterranean bathing beaches of Israel. *Chemosphere* 16(2-3): 565-570.
- Fleming, L.E., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, A., Pomponi, S.A., Smith, S., Solo Gabriele, H., Walsh, P. 2006. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 53(10-12): 545-560.
- González-Saldía, R.R., Pino-Maureira, N.L., Muñoz, C., Soto, L., Duran, E., Barra, M.J., Saavedra, A. 2019. Fecal pollution source tracking and thalassogenic diseases: The temporal-spatial concordance between maximum concentrations of human mitochondrial DNA in seawater and Hepatitis A outbreaks among a coastal population. *The Science of The Total Environment* 686: 158-170.
- Goubanova, K., Echevin, V., Dewitte, B., Codron, F., Takahashi, K., Terray, P., Vrac, M. 2011. Statistical downscaling of sea-surface wind over the Peru-Chile upwelling region: diagnosing the impact of climate change from the IPSL-CM4 model. *Climate Dynamics* 36(7-8): 1365-1378.
- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B. 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6): 3163-3170.-
- He, X., Chen, H., Shi, W., Cui, Y., Zhang, X.X. 2015. Persistence of mitochondrial DNA markers as fecal indicators in water environments. *Science of the Total Environment* 533: 383-390.
- He, X., Liu, P., Zheng, G., Chen, H., Shi, W., Cui, Y., Ren, H., Zhang, X.X. 2016. Evaluation of five microbial and four mitochondrial DNA markers for tracking human and pig fecal pollution in freshwater. *Scientific Reports* 6: 35311.
- Holmes-Hansen, O., Both, C.R. 1966. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnology and Oceanography* 11(4): 510-519.
- Horman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Torvela, N., Heikinheimo, A., Hanninen, M.L. 2004. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1): 87-95.
- ISP. 2010. PRT-712.03-005. NMP para la determinación de coliformes y coliformes fecales en aguas. Sección Microbiología de Alimentos. Instituto de Salud Pública, Chile. 6 pp.
- Jiang, S., Noble, R., Chu, W. 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1): 179-184.
- Kapoor, V., Smith, C., Santo Domingo, J.W., Lu, T., Wendell, D. 2013. Correlative assessment of fecal indicators using human mitochondrial DNA as a direct marker. *Environmental Science & Technology* 47(18): 10485-10493.
- Karkman, A., Pärnänen, K., Larsson, D.J. 2019. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nature*

- Communications 10(1): 80.
- Lemarchand, K., Lebaron, P. 2003. Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. FEMS Microbiology Letters 218(1): 203-209.
- Lima Barbieri, N., Nielsen, D.W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S.G., Nolan, L.K., Logue, C.M. 2017. mcr-1 identified in Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). PLoS ONE 12(3): e0172997.
- NCh, Norma Chilena Oficial N° 1.333. of. 87. 1978. Requisitos de calidad de agua para diferentes usos. Inscripción N° 49.092 por Instituto Nacional de Normalización, INN. Santiago, Chile. 20 pp.
- Noble, R.T., Fuhrman, J.A. 2001. Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. Hydrobiología 460: 175-184.
- Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O., Ito, T. 2007. Identification and quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwaters. Applied Microbiology and Biotechnology 74(4): 890-901.
- OMS. 1998. Guidelines for Safe Recreational-Water Environments: Coastal and Fresh Waters. Draft for Consultation, Geneva, October 1998, World Health Organization (EOS/DRAFT/98.14), Geneva. 207 pp.
- OPS/OMS. 2016. Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica: Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud pública en las Américas, 10 de junio de 2016, Washington, D.C.
- Pendergraft, M.A., Belda-Ferre, P., Petras, D., Morris, C.K., Mitts, B.A., Aron, A.T., Bryant, M., Schwartz, T., Ackermann, G., Humphrey, G., Kaandorp, E., Dorrestein, P.C., Knight, R., Prather, K.A. 2023. Bacterial and Chemical Evidence of Coastal Water Pollution from the Tijuana River in Sea Spray Aerosol. Environmental Science & Technology 57(10): 4071-4081.
- Pendergraft, M.A., Grimes, D.J., Giddings, S.N., Feddersen, F., Beall, C.M., Lee, C., Santander, M.V., Prather, K.A. 2021. Airborne transmission pathway for coastal water pollution. PeerJ 9: e11358.
- Pruss, A. 1998. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. International Journal of Epidemiology 27(1): 1-9.
- Roslev, P., Bukh, A.S. 2011. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. Applied Microbiology and Biotechnology 89(5): 1341-1355.
- Santo Domingo, J.W., Bambic, D.G., Edge, T.A., Wuertz, S. 2007. Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. Water Research 41(16): 3539-3552.
- Schill, W.B., Mathes, M.V. 2008. Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome b targets. Environmental Science & Technology 42(14): 5229-5234.
- Schneider, W., Donoso, D., Garcés-Vargas, J., Escribano, R. 2017. Water-column cooling and sea surface salinity increase in the upwelling region off central-south Chile driven by a poleward displacement of the South Pacific High. Progress in Oceanography 151: 38-48.
- Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., Lukasik, J. 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. Applied and Environmental Microbiology 68 (12): 5796-5803.
- Shuval, H.I. 2003. Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. Journal of Water Health 1(2): 53-64.
- Sievers, H.A., Silva, N. 1982. Masas de agua y circulación geostrófica frente a la costa de Chile entre latitudes 18° S y 33° S (Operación oceanográfica MARCHILE VII). Ciencia y Tecnología del Mar CONA (Chile) 6: 61-99.
- Silva, N. 1983. Masas de agua y circulación en la región del norte de Chile, latitudes 18° S 32° S (Operación Oceanográfica Mar Chile XI-ERFEN II). Ciencia y Tecnología del Mar CONA (Chile) 7: 47-84.
- Sobarzo, M.B., Figueroa, D., Arcos, D.R. 1997. The influence of winds and tides in the formation of circulation layers in a bay, a case study: Concepción Bay, Chile. Estuarine, Coastal and Shelf Science 45(6): 729-736.
- Stewart, J.R., Santo Domingo, J.W., Wade, T.J. 2006. Fecal pollution, public health, and microbial source tracking. En: Santo Domingo, J.W., Sadowsky, M.J. (eds) Microbial Source Tracking: 1-32. ASM Press, USA
- Stritholt, J.R., Garono, R.J., Frost, P.A. 1998. Spatial patterns in land use and water quality in the Tillamook Bay Watershed: a GIS mapping project. Earth Designs Consultants, Inc., Corvallis, OR.
- Vicuña, S., Gironás, J., Meza, F.J., Cruzat, M.L., Jelinek, M., Bustos, E., Poblete, D., Bambach, N. 2013. Exploring possible connections between hydrological extreme events and climate change in central south Chile. Hydrological Sciences Journal 58(8): 1598-1619.
- Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L.P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L.A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., Balloux, F. 2018. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. Nature Communications 9(1): 1179.
- Wescot, D., Ayres, R. 1990. "Criterio de calidad de aguas de riego", en riego con agua residual municipal regenerada. Asano, T. Editado por Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona. pp 33-66.

Received: 11.09.2024

Accepted: 05.06.2025