



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL DE ORIGEN HUMANO Y
ANIMAL EN LA CUENCA ALTA DEL RÍO GUAYLLABAMBA MEDIANTE
INDICADORES VIRALES.

AUTOR

Edison Andrés Bonifaz Arcos

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL DE ORIGEN HUMANO Y
ANIMAL EN LA CUENCA ALTA DEL RÍO GUAYLLABAMBA MEDIANTE
INDICADORES VIRALES.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor guía

PhD. Laura Guerrero Latorre

Autor

Edison Andrés Bonifaz Arcos

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación de la contaminación fecal de origen humano y animal en la Cuenca Alta del Río Guayllabamba mediante indicadores virales, a través de reuniones periódicas con el estudiante, Edison Andrés Bonifaz Arcos, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Laura Guerrero Latorre

Doctora en Microbiología Ambiental y Biotecnología

CI: 1758028896

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación de la contaminación fecal de origen humano y animal en la Cuenca Alta del Río Guayllabamba mediante indicadores virales, realizado por el estudiante Edison Andrés Bonifaz Arcos, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación “.

Blanca Ríos Touma

Doctora en Estudios Avanzados en Ecología

CI:1707113765

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Edison Andrés Bonifaz Arcos

CI: 171686535-5

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios por haberme dado el valor y la disciplina para afrontar este reto. A mis padres Karina y Edison por enseñarme el esfuerzo y ser un ejemplo para mí. A mi querida Mamita Lucy y Papá Washito por su amor y ser mi apoyo siempre.

A Laura Guerrero por haber confiado en mis capacidades. A mi novia Danny y a mis hermanos Esteban y Daniela por ser un apoyo fundamental para el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

El Ecuador es un país rico en recursos hídricos, pero posee un deterioro en la calidad de las aguas superficiales debido a que apenas el 1,5% de las aguas residuales son tratadas, provocando el deterioro de ecosistemas acuáticos. La cuenca alta del río Guayllabamba es un claro ejemplo de la falta de tratamientos de residuos urbanos y agropecuarios que aportan grandes cantidades de contaminantes microbiológicos de distintos orígenes (humanos y ganaderos). Este estudio evalúa la contaminación fecal en la cuenca alta del río Guayllabamba, siendo pionero en emplear herramientas moleculares de cuantificación de indicadores virales específicos de origen. Los indicadores que se evaluaron fueron, Adenovirus humanos (HAdV), Poliomavirus Bovino (BPyV), Adenovirus Porcino (PAdV) y Parvovirus de pollos (ChPV). Además, se analizó el efecto de la estacionalidad y los patrones espaciales de contaminación. Los resultados indicaron que la cuenca alta del Guayllabamba está altamente impactada por contaminación fecal con valores de *E.coli* que superan los límites máximos permitidos para todo tipo de uso ($>2E+06$ ufc/L). La principal fuente de contaminación en la cuenca es de origen humano (HAdV $2,25E+05$ CG/L). Los ríos Machángara y Monjas mostraron los niveles más altos de contaminación humana debido a los aportes del sistema de alcantarillado de la ciudad de Quito. Los niveles de BPyV ($1,60E+05$ CG/L) revelaron que la crianza de ganado vacuno es la segunda fuente de contaminación, especialmente a lo largo del río San Pedro, la mayor zona lechera del país. Mientras que, los niveles de indicadores porcinos y aviares fueron menores. Los valores de todos los indicadores incrementan conforme disminuye la altitud de la cuenca, a excepción de BPyV ya que la ganadería ocupa zonas altas en páramos. Esta información apoya al diseño de estrategias de descontaminación y protección de los ríos como el Guayllabamba con numerosas fuentes de contaminación microbiológicas.

ABSTRACT

Ecuador is a rich country in water resources, but it has a deterioration in the quality of surface waters because only 1.5% of wastewater is treated, causing the deterioration of aquatic ecosystems. The upper basin of the Guayllabamba River is a clear example of the lack of urban and agricultural waste treatments that provide large amounts of microbiological contaminants from different sources (human and livestock). This study evaluates fecal contamination in the upper basin of the Guayllabamba river, being a pioneer in using molecular tools to quantify specific viral indicators of origin. The indicators that were evaluated were, Human Adenoviruses (HAdV), Bovine Polyomavirus (BPyV), Porcine Adenoviruses (PAdV) and Chicken Parvoviruses (ChPV). In addition, the effect of seasonality and spatial patterns of contamination was analyzed. The results indicated that the upper basin of the Guayllabamba is highly impacted by fecal contamination with *E. coli* values that exceed the maximum limits allowed for all types of use ($> 2E + 06$ cfu / L). The main source of contamination in the basin is of human origin (HAdV $2,25E + 05$ CG / L). The Machángara and Monjas rivers were found in the highest levels of human pollution due to the elements of the sewerage system of the city of Quito. The levels of BPyV ($1.60E + 05$ CG / L) indicate that raising cattle is the second source of contamination, especially along the San Pedro River, the largest dairy area in the country. While, the levels of porcine and avian indicators were lower. The values of all the indicators increase according to the altitude of the basin, an exception of BPyV since the cattle ranch occupies high areas in highlands. This information to the design of strategies of decontamination and protection of rivers like Guayllabamba with sources of microbiological contamination.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Objetivo General.....	4
1.4 Objetivos Específicos	4
1.5 Justificación del trabajo.....	4
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Estado de los recursos hídricos a escala global	6
2.1.1 Fuentes de agua dulce	6
2.1.2 Recurso limitado y una demanda en aumento.....	7
2.1.3 Regiones con estrés hídrico alto	8
2.2 Degradación antropogénica de fuentes de agua dulce.....	10
2.2.1 Fuentes de contaminación del agua	11
2.2.2 El rol del saneamiento en la calidad del agua.....	13
2.3 Regulación y normativas vigentes relacionadas con la contaminación de las fuentes de agua.....	16
2.3.1 Regulaciones para la descarga de contaminantes en el ambiente...	16
2.4 Riesgos microbiológicos transmitidos en agua contaminada con materia fecal	18
2.4.1 Riesgo para la salud y seguridad alimentaria	19
2.4.2 Principales agentes etiológicos de Enfermedades transmitidas por agua contaminada	20
2.4.3 Incidencia Enfermedades transmitidas por el agua a nivel global y nacional	23
2.5 El uso de indicadores para el análisis de la contaminación fecal.....	26
2.5.1 Parámetros para un buen indicador.....	26
2.5.2 Tipos de indicadores microbiológicos	27
2.6 Herramientas de trazabilidad de la contaminación microbiológica	31
2.6.1 Metodologías utilizadas para analizar el origen de la contaminación microbiológica.....	31

2.6.2 Virus como trazadores animales.....	35
2.7 Estado ecológico de la Cuenca Alta del Río Guayllabamba... 38	
2.7.1 El impacto de las actividades realizadas a lo largo de la Cuenca del Río Guayllabamba.....	39
2.7.2 Estudios con indicadores de contaminación realizados hasta la actualidad	40
2.7.3 Gestión actual de aguas residuales de zonas urbanas y rurales	41
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ...	42
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	43
4.1 Planificación de campañas y puntos de muestreo	43
4.2 Muestreo épocas lluviosa y seca.....	47
4.3 Medición de la contaminación con indicadores bacterianos ...	47
4.4 Análisis de indicadores virales	48
4.4.1 Concentración de muestras mediante el método floculación orgánica con leche descremada.....	48
4.4.2 Procedimientos de Biología Molecular.....	50
4.5 Análisis de resultados finales	53
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
5.1 Porcentajes de recuperación de virus mediante el método de concentración con leche descremada.....	56
5.2 Curvas de calibrado de cada indicador.....	58
5.3 Detección de la presencia de contaminación fecal mediante indicadores de contaminación.....	59
5.4 Diferencias debido a la variable climática (Lluviosa – Seca) ..	66
5.5 Patrones espaciales de la contaminación fecal en la cuenca	69
5.6 Correlación entre indicadores bacterianos y virales	86
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	89
6.1 Conclusiones.....	89
6.2 Recomendaciones	90
REFERENCIAS	92
ANEXOS	113

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Mediante estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha determinado que apenas el 3% del agua presente en la superficie terrestre puede ser consumida. Sin embargo, la presión del ser humano sobre los recursos hídricos ha desencadenado una amenaza para las fuentes de agua dulce debido a las descargas deliberadas de aguas residuales al ambiente (WHO, 2011, pp. 20-22).

La OMS ha determinado que 663 millones de personas no reciben agua con un tratamiento adecuado y 1800 millones a nivel mundial reciben este suministro contaminado con materia fecal. La contaminación fecal en el agua constituye un importante vehículo de enfermedades como la gastroenteritis, el cólera, la hepatitis, fiebre tifoidea, entre otras. Estas son causantes de una elevada tasa de mortalidad y morbilidad (WHO, 2005, p. 10).

Según un estudio realizado por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, Ciencia y Cultura (UNESCO) existe una correlación positiva entre los niveles de saneamiento y la contaminación microbiológica. Los países con altos ingresos históricamente han realizado una mayor inversión en tratamientos de aguas residuales, mientras los países con ingresos medios y bajos han considerado el saneamiento como una prioridad secundaria (UNESCO, 2017 p. 12).

En el plan de descontaminación de los ríos de Quito elaborado por la Empresa de Agua Potable y Saneamiento de Quito (EPMAPS), se prevé intervenir sobre el sistema hidrográfico más importante de la ciudad formado por los ríos Monjas, Machángara, Pita, San Pedro y Guayllabamba. El proyecto tiene como objetivo principal disminuir los niveles de contaminación química y fecal mediante la construcción de infraestructura de saneamiento para el tratamiento de los efluentes municipales para el 2040 (EPMAPS, 2011, p.11).

El municipio del Distrito Metropolitano de Quito únicamente contempla, en la norma técnica de control del medio ambiente, la medición de parámetros

relacionados con la contaminación fecal y microbiológica como DBO, DQO, sólidos en suspensión, aceite, y coliformes fecales (Consejo Metropolitano del DMQ, 2008, pp. 5-12). Sin embargo, estos indicadores no aportan información acerca del origen de la contaminación y no permiten realizar un seguimiento desde la fuente, sea humano o animal.

Con objetivo de la reducción de la contaminación desde su origen y establecer la responsabilidad integral de los daños al ambiente, desde los años 1980 se ha desarrollado herramientas biotecnológicas llamadas *Microbial Source Tracking* (MST). El MST consiste en metodologías que buscan determinar las principales fuentes de contaminación fecal, mediante la identificación y cuantificación de organismos o parte de ellos como indicadores (Hagedorn, Blanch, & Harwood, 2011, p. 30).

La investigación de la contaminación fecal específica de origen también ha sido usada para la identificación de las fuentes en contextos tanto urbanos y agropecuarios, considerando que la crianza de ganado puede llegar a influir en la ecología y las enfermedades transmitidas por el agua. En el 2015 Rusiñol y colaboradores realizaron un estudio en el que evaluaron indicadores humanos como HAdV, poliomavirus bovinos (BPyV) y ovinos (OPyV), en las áreas destinadas al cultivo y la crianza de animales. Los tres tipos de indicadores estuvieron presentes, con altos niveles de indicadores animales. Por otro lado, en los contextos netamente urbanos la presencia de HAdV fue alta y no se encontraron indicadores animales (Rusiñol, Moriarty, Lin, Bofill-Mas, & Gilpin, 2016, pp. 34-45). Estas investigaciones han permitido obtener conocimiento acerca de las metodologías de cuantificación de la contaminación en muchas cuencas hidrográficas, y han permitido diseñar programas de descontaminación adecuados a los aportes que recibe cada escenario.

1.2 Planteamiento del problema

A nivel mundial, la generación de aguas residuales se encuentra en aumento al igual que los niveles de contaminación de ríos, lagos y mares, producto de la creciente expansión demográfica y actividades industriales. La problemática se desarrolla en vista de que la mayor parte de aguas residuales que se generan a

nivel mundial se vierten deliberadamente al medio ambiente sin el adecuado tratamiento previo. Según las estadísticas presentadas por la UNESCO, los países de ingresos altos realizan tratamientos a un 70% de las aguas residuales, mientras que los países de ingresos medios lo hacen en un promedio de 33%, dejando a los países de ingresos bajos apenas con un 8% (UNESCO, 2017, pp. 5-10).

El Ecuador, a pesar de ser un país de ingresos medio – alto, en materia de saneamiento, únicamente realiza el tratamiento al 1.5% del agua posterior a su consumo (INEC, 2013, p.13). Estas cifras adquieren mayor relevancia al ver que la sierra es la región que consume mayor cantidad de agua y también es la que realiza el menor porcentaje de tratamiento a las mismas (INEC, 2013, p. 13). Provocando que los ríos que atraviesan grandes poblados en la serranía acarreen la contaminación a las regiones de menor altitud. Esto evidencia el potencial peligro no solo ambiental sino también de salud, creando un reservorio de múltiples agentes etiológicos causantes de gran parte de enfermedades diarreicas y gastrointestinales presentes en el país.

La ciudad de Quito, capital del Ecuador, posee una población superior a los 2 millones de personas. Esta ciudad se proyecta a un futuro sostenible, buscando tratar de manera responsable y definitiva el agua residual urbana generada (EPMAPS, 2014, p. 16). Sin embargo, los pocos planes de recuperación de los ríos y quebradas realizados hasta la actualidad no han sido ejecutados adecuadamente y las plantas de tratamiento que se prevé construir carecen de estudios previos que determinen el impacto de la contaminación de acuerdo a su origen (da Cruz E Sousa & Ríos-Touma, 2017, pp. 1-10).

El único parámetro microbiológico establecido como control de la calidad de agua propuesto en normativas nacionales, es el bacteriano de coliformes fecales (MAE, 2015, pp 1-37). Sin embargo, a pesar del bajo costo y facilidad, este indicador no aporta información del origen de la contaminación ya que habita en el tracto gastrointestinal de todos los animales de sangre caliente, haciendo necesaria la aplicación de otros métodos de monitoreo de la contaminación que

permitan realizar la trazabilidad del origen de la contaminación como los indicadores virales.

1.3 Objetivo General

Evaluar la contaminación fecal en la cuenca alta del río Guayllabamba mediante la determinación de indicadores virales.

1.4 Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de contaminación fecal mediante indicadores virales en distintos puntos establecidos en las zonas rurales y urbanas a lo largo de la cuenca del río Guayllabamba.
- Analizar patrones de estacionalidad de los indicadores analizados en época seca y lluviosa.
- Establecer un patrón espacial de la presencia de los indicadores virales encontrados a lo largo de la cuenca del Río Guayllabamba.

1.5 Justificación del trabajo

Gracias a la constitución del Ecuador del año 2008, la búsqueda de un mejor ambiente para vivir ya no solo es un compromiso adquirido por parte de los gobiernos, sino que es un derecho que todos los ecuatorianos podemos reclamar. En el artículo 14 se menciona que “Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, Sumak Kawsay” (Asamblea Nacional, 2008, pp. 1-54). Para facilitar este derecho, es necesario conocer la calidad del ambiente en donde vivimos, asegurando que el mismo brinde las condiciones adecuadas para asegurar la salud humana y la sostenibilidad del ecosistema en general.

La falta de planificación en determinados sectores del distrito metropolitano de Quito y poblados aledaños asentados sobre la Cuenca Alta del Río Guayllabamba es evidente. Las actividades antropogénicas como la construcción de viviendas y establecimiento de industrias, tanto agrícolas como

ganaderas, incumplen varias normas de construcción establecidas como la ley forestal y ordenanzas municipales de ordenamiento territorial, asentándose a pocos metros de los ríos acabando con la vegetación de ribera y aportando contaminantes que no pasan por el sistema de alcantarillado antes de llegar a los cauces naturales (Secretaría de ambiente del DMQ, 2013, pp. 1-30). Esto puede llegar a dificultar una adecuada gestión en la descontaminación de los ríos.

La generación de información que visibiliza el estado real de la contaminación en los cauces evitará que sigan convirtiéndose en una fuente de enfermedades gastrointestinales que influyen en la mortalidad y morbilidad de la población ecuatoriana. Cabe recalcar que, si no se realizan investigaciones y mediciones oportunas sobre el estado de los recursos hídricos, es imposible visibilizar el verdadero problema y todas las políticas promulgadas resultarán ineficaces.

Este trabajo sustentará futuras investigaciones que analicen los efectos que provoca la contaminación fecal en la salud, correlacionando los tipos de contaminación encontrados en los ríos junto con la prevalencia de enfermedades virales en los sistemas de salud pública. Adicionalmente, genera un antecedente metodológico en la aplicación de técnicas moleculares para la identificación de la contaminación microbiológica en el país aplicando *Microbial Source Tracking*. Estas técnicas podrían ser aplicadas en el resto de ciudades del Ecuador, aumentando el conocimiento del verdadero estado de los ríos que atraviesan tanto zonas rurales y urbanas.

Esta tesis forma parte del macro proyecto impulsado por la Universidad de las Américas “Ecological and microbiological status of the Upper Guayllabamba River Basin, historic trends, biodiversity threats and health risks” (Rios-Touma & Guerrero-Latorrre, 2016, pp. 1-10). Además, se encuentra enmarcado dentro de una de las principales aplicaciones de la biotecnología ambiental como es el monitoreo de la contaminación, la conservación y la gestión de residuos.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Estado de los recursos hídricos a escala global

El agua es una sustancia abundante en el planeta y constituye parte fundamental tanto de la anatomía como de la fisiología de los seres vivos. De su presencia depende el equilibrio natural de todos los ciclos que existen en el planeta Tierra. Este recurso se encuentra distribuido de forma natural en los océanos, bajo tierra y en la superficie. Sin embargo, apenas el 2.5% del total de agua corresponde a agua dulce, que en mayor medida se encuentra congelada y en forma de agua subterránea, por lo que apenas un bajo porcentaje está disponible en la superficie (ONU, 2006, pp. 7-12).

Como consecuencia del desarrollo tecnológico agroindustrial y expansión demográfica alcanzado por las civilizaciones, el estado de los recursos hídricos a nivel mundial experimenta una disminución notable (UNESCO, 2009, p. 4). Esto ha puesto en evidencia la necesidad de mecanismos de protección y gestión adecuados. Los efectos de la presión sobre los recursos hídricos del planeta, se evidencian debido a las alteraciones en los episodios de estacionalidad, lluvias, deshielos, inundaciones, sequías, incongruencias temporales que afectan los caudales que se agravan con el cambio climático (WHO & UNICEF, 2017, pp 6-8). Frente a esto se requiere un compromiso y esfuerzo global para asegurar este recurso a las generaciones venideras.

2.1.1 Fuentes de agua dulce

El agua dulce es aquella que posee una baja cantidad de sales y sólidos totales disueltos, en contraposición del agua salobre y agua de mar que posee al menos 35 g/L de sales minerales disueltas (FAO, 2011, pp. 7-9). El agua dulce se considera como un recurso renovable, pero a la vez limitado por la gran demanda existente. Las fuentes de agua dulce son principalmente los glaciares, cascos polares, el agua subterránea (acuíferos) y agua superficial (Barba, 2002, p. 10). Cada una de estas fuentes se abastecen principalmente por la renovación continua a través del ciclo del agua. Éste ciclo consiste en la acción de fenómenos físicos que permiten el paso del agua de la superficie terrestre de fase líquida a fase gaseosa contenida en la atmósfera. Cuando las condiciones

físicas son las adecuadas el vapor de agua en las nubes se condensa y regresa a la superficie mediante las lluvias. Finalmente, los efectos de la escorrentía superficial permiten que el agua renueve cada una de las fuentes hídricas. A partir de la frecuencia de estos fenómenos se puede determinar su disponibilidad a futuro (Barba, 2002, p. 4).

La calidad y disponibilidad de las aguas superficiales y subterráneas, dependen del contexto geográfico, la meteorología y las actividades humanas que se realicen alrededor. El agua subterránea es una fuente ampliamente utilizada para el consumo y la agricultura. No obstante, para que exista un equilibrio y se convierta en un recurso renovable es necesario que se extraiga a un caudal prudente para que la naturaleza la renueve mediante las precipitaciones y la infiltración (Barba, 2002, pp. 3-8). A su vez, el agua superficial proviene principalmente a partir del agua de lluvias, efloraciones de acuíferos o a su vez por el derretimiento de glaciares y nevados, sin considerar el agua de los océanos (Barba, 2002, pp. 3-8).

2.1.2 Recurso limitado y una demanda en aumento

Según las estadísticas planteadas por la Organización de las Naciones Unidas destinada a la evaluación de la alimentación y agricultura (FAO), en el portal AQUASTAT, a nivel mundial el ser humano emplea al año un promedio de 3928 km^3 de agua dulce. La principal actividad que consume es la agricultura mediante el riego. Esta actividad emplea anualmente 1716 km^3 de agua, que corresponde al 38% (Figura 1), el restante se distribuye a aguas de su uso municipal o industrial (UNESCO, 2017, pp. 10-12).

Las principales acciones que se recomienda frente al desabastecimiento de este recurso son el acopio del agua de lluvia, las presas o embalses que ayudan a mitigar inundaciones, los trasvases entre cuencas hidrográficas, la desalinización del agua y el reúso de aguas residuales tratadas. Siempre y cuando sean gestionados de manera sostenible, monitoreados y mantenidos en el tiempo (UNESCO, 2009, pp. 10-12).

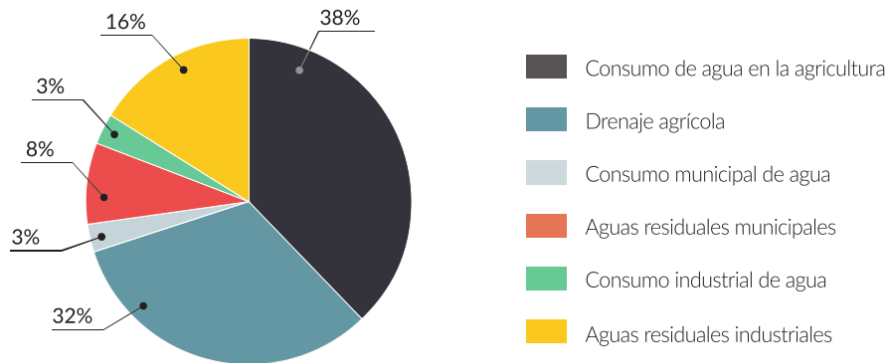


Figura 1. Distribución de las extracciones de agua dulce de acuerdo a su uso a nivel mundial.

Tomado de (UNESCO, 2017, p. 9)

El reúso de agua residual tratada es una alternativa con mucho potencial en zonas con presión de los recursos hídricos. Consiste en la reducción de la contaminación desde el origen, evitando que las aguas lleguen al ambiente sin un tratamiento previo. Tradicionalmente el reúso ha estado orientado al riego, y con el avance de las técnicas de tratamiento se ha podido emplear para espacios públicos y recreativos con o sin contacto humano. También se ha conseguido la recuperación de nutrientes y productos útiles para determinadas industrias aprovechando su uso como sustrato para la producción de biogás y biocombustibles (UNESCO, 2017, p. 35).

2.1.3 Regiones con estrés hídrico alto

El estrés hídrico es un indicador cuantitativo de existencia de fuentes de agua dulce en un lugar determinado, se determina mediante el análisis de la demanda de agua per cápita al año frente a la cantidad del recurso existente en el mismo periodo de tiempo (FAO, 2013, p. 17). Se presenta estrés hídrico cuando los recursos hídricos renovables per cápita al año son menores a 1700 m^3 , cuando equivalen a 1000 m^3 se considera como escasez de agua crónica, mientras que si el suministro de agua cae por debajo de 500 m^3 se considera escasez absoluta, por lo que la cantidad de agua no es la suficiente para la subsistencia de la vida humana (ONU, 2016, pp.11-15).

Existen diferencias marcadas entre varias regiones y países. África es el continente posee la menor cantidad de recursos para satisfacer la demanda existente (Figura 2), especialmente en las zonas norte, oriental y austral. De igual manera el continente asiático presenta conflictos y problemas con este recurso, en Asia occidental y Asia del sur en donde se encuentran China e India (UNESCO, 2017, pp 84-98). Estas zonas son también las de mayor densidad poblacional y menores recursos disponibles.

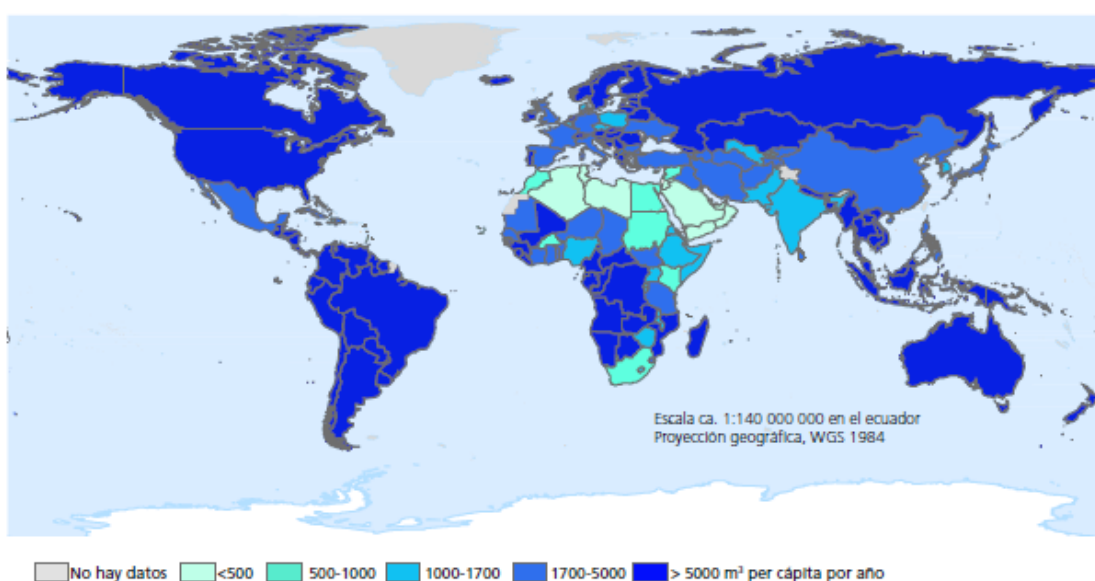


Figura 2. Mapa de la distribución de las zonas con estrés hídrico, representada por el total, de recursos hídricos renovables m^3 per cápita al año (2014).

Tomado de (ONU, 2016, p. 16)

El estrés hídrico, es un medidor anual que analiza la escasez de agua física ocurrida en todo el año, sin considerar la escasez de agua generada en cortos periodos, ni la escasez económica que se produce por la falta de infraestructura y limitaciones financieras (UNESCO, 2016, p. 26). Esto explica el hecho de que varias regiones no sean consideradas como zonas con estrés hídrico, a pesar de que la población no cuente con este recurso en cantidad ni calidad durante días o meses del año.

El continente americano cuenta con recursos naturales suficientes para abastecer a toda la población por lo que en gran parte del continente no se presenta estrés hídrico (Figura 2). Sin embargo, Centroamérica y Sudamérica, principalmente Ecuador, Perú y Bolivia, muestran escasez económica por la falta de infraestructura y políticas que permitan dotar de agua segura durante todo el año (Figura 3) (ONU, 2016, pp. 15-20). Esto revela que en estos países la inversión en mecanismos de potabilización y saneamiento no son los suficientes a pesar de poseer agua en cantidad.

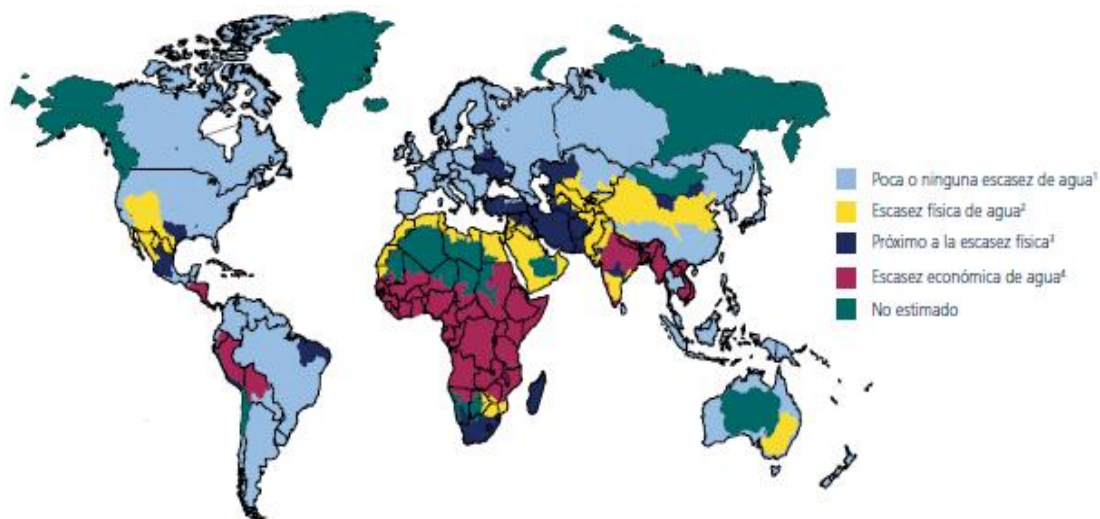


Figura 3. Mapa del estado de los recursos hídricos, considerando la escasez a nivel mundial tanto física como económica.

Tomado de (ONU, 2016, p. 19)

2.2 Degradación antropogénica de fuentes de agua dulce

Las fuentes de agua dulce son impactadas por efluentes generados por actividades industriales, agua municipal y de escorrentía que acarrea contaminantes de los diferentes usos de suelo (OMS, 2016, p. 16). El agua residual urbana y rural que no cuenta con ningún tipo de tratamiento previo, genera contaminantes químicos y biológicos que pueden llegar a ser un peligro para la salud (Janet et al., 2012, pp. 14-28). El riesgo de contaminación aumenta con la expansión antropogénica, degradando los recursos hídricos existentes y

provocando una grave amenaza a los distintos ecosistemas (UNESCO, 2017, p. 12).

El progreso económico experimentado en las últimas décadas a nivel mundial, ha estado marcado por el desarrollo de las industrias, muy necesarias, pero en su mayoría muy contaminantes por los niveles de químicos y desechos que son liberados al ambiente (OMS, 2016, pp. 15-22). La industria agrícola ocupa gran cantidad de fertilizantes que no todos son metabolizados y son arrastrados a cuerpos de agua ocasionando la eutrofización, generando crecimiento de algas y vegetación que pone en riesgo el equilibrio del ecosistema y la salud animal (Barba, 2002 pp. 17-20). Esta contaminación es generada por los nutrientes que poseen los productos agroquímicos que llegan a los cauces mediante la escorrentía de terrenos de cultivo (Barba, 2002 pp. 17-20). La escorrentía superficial es un factor que también puede acarrear patógenos presentes en el estiércol generado por animales de pastoreo o por el compost empleado en la agricultura (Reischer et al., 2008, pp. 2598-2608).

2.2.1 Fuentes de contaminación del agua

Se considera agua contaminada a aquella que posee algún grado de sustancias que impiden la utilización de este recurso para un propósito específico (Owa, 2013, pp. 2039-9340).

La contaminación del agua puede ser provocada principalmente por fuentes como (Owa, 2013):

- Fugas de aguas residuales
- Residuos ambientales
- Aguas de escorrentía que en épocas lluviosas acarrear desechos y patógenos.
- Radioisótopos y metales pesados
- Deforestación y minería
- Pesticidas, herbicidas y fertilizantes
- Productos químicos domésticos
- Derrames de petróleo
- Perforación de suelos
- Servicios higiénicos cercanos a cuerpos de agua
- Desechos tóxicos en mares, ríos y lagunas
- Desechos de basura
- Sistemas sépticos con fisuras
- Desechos animales

La eliminación de las aguas residuales municipales en el ambiente sin un tratamiento adecuado ha sido considerada como principal fuente de contaminación del agua (UNESCO, 2017, p. 35). Estas aguas poseen contaminantes (Figura 4) que provocan la disminución del oxígeno disuelto en agua, que los organismos descomponedores de la materia orgánica respiran para cumplir con todos sus ciclos (Barba, 2002, p. 45). En consecuencia, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) incrementa en esta matriz, ocasionando que tanto la flora y fauna endémica mueran por asfixia, a pesar de que los contaminantes químicos y gran parte de patógenos son persistentes en estos escenarios (Larios-Meño, González, Yennyfer, & Olivares, 2015, pp. 12-18).

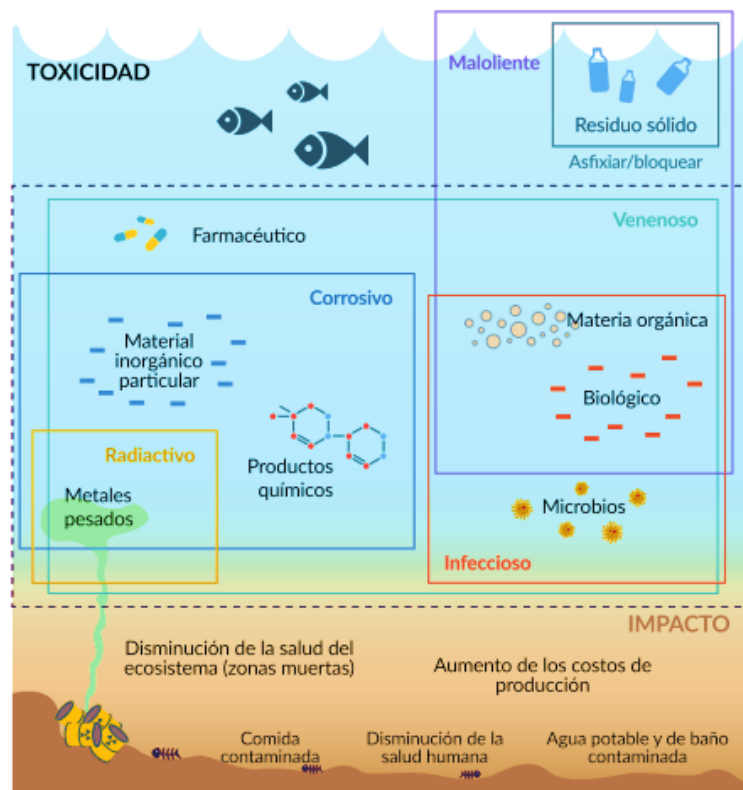


Figura 4. Contaminantes y sustancias química peligrosas presentes en las aguas residuales y sus efectos en el ambiente.

Tomado de (UNESCO, 2017, p.41).

2.2.2 El rol del saneamiento en la calidad del agua

El saneamiento engloba los niveles de servicios e infraestructura que tienen como finalidad la eliminación de restos de heces fecales y orina en el agua (Julian, 2016, pp. 944-55). La falta de los sistemas adecuados de saneamiento trae como consecuencia la contaminación de las fuentes de agua y un aumento de las tasas de mortalidad y morbilidad en la población. Se ha demostrado que el tratamiento y descontaminación de desechos sólidos y aguas residuales municipales permiten el mantenimiento del buen estado de los recursos hídricos, disponibilidad y la calidad del agua en el ambiente (UNESCO, 2017, pp. 99-120). La ampliación de la cobertura de saneamiento es en una de las metas a cumplir para alcanzar los objetivos del desarrollo sostenible (ODS) planteados por las Naciones Unidas hasta el 2030 (UNESCO, 2016, pp. 8-12).

2.2.2.1 En el Mundo

A nivel mundial, el agua residual urbana recibe poca atención e inversión por parte de las autoridades. Las políticas y la atención están orientadas al reto que constituye el abastecimiento de agua en momentos de escasez, y no a los potenciales impactos negativos que puede llegar a tener el vertido desmesurado de las aguas residuales en el ambiente (CONAGUA México, 2007, p. 15).

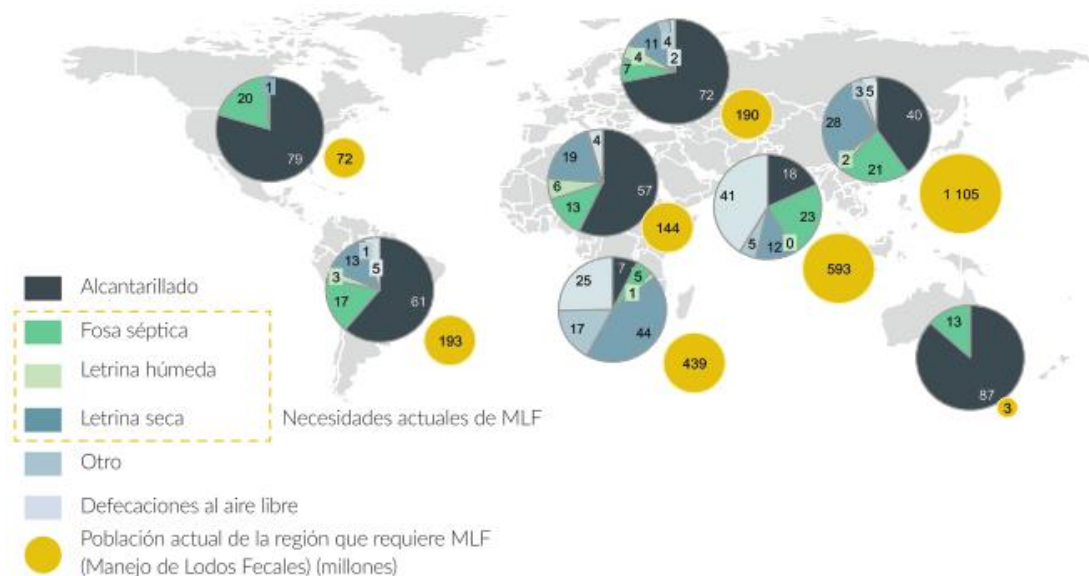


Figura 5. Mapa de distribución mundial y porcentajes de uso de distintos mecanismos de eliminación de restos fecales y saneamiento.

Tomado de (UNESCO, 2017, p. 51).

El alcantarillado constituye el principal mecanismo de evacuación de las aguas residuales en el mundo (Figura 5). Sin embargo, en regiones como África subsahariana, América del sur y Asia aún existe deficiencia de tratamientos de aguas residuales municipales (OMS, 2016). En el caso del África, existe una difícil situación que se agrava por la falta de recursos hídricos para una población cada vez en aumento. Especialmente África Subsahariana tiene una tercera parte de la población sin acceso a ningún tipo de fuente de agua potable y mecanismos de saneamiento básico (UNESCO, 2017, p. 24).

En Asia, el 85% de las aguas residuales generadas se vierten directamente al ambiente sin un tratamiento adecuado. Esto ocurre mientras los países generan políticas para intervenir la mayor cantidad de recursos hídricos en la región en busca de cumplir con una población en crecimiento exponencial (PNUD, 2016, pp 11-20). Las regiones que cuentan con mejores indicadores de acceso a saneamiento son Europa y América del Norte, llegando a tener una cobertura del 95% con una mejora en los últimos 10 años (Michaud, Gabric, Hommann, & Shegay, 2015, pp. 8-20). Sin embargo, existe ejemplos de inequidad en cuanto a políticas de tratamiento entre países que comparten una misma cuenca hidrográfica (Kirschner et al., 2017, pp. 543-555).

América Latina y el Caribe son regiones donde La falta de planificación de saneamiento urbano y rural ha ocasionado que los efluentes municipales tradicionalmente sean vertidos sin un tratamiento previo (UNESCO, 2017, pp. 109-112). La región posee un área rural, donde el sistema de saneamiento mayormente no tiene conexiones de alcantarillado y cuenta únicamente con sistemas sanitarios de eliminación *in situ* como letrinas y fosas sépticas (Figura 5). Esto genera posibles contaminaciones a aguas subterráneas por medio de percolación (UNESCO, 2017, pp. 109-112).

2.2.2.2 En el Ecuador

Según el último censo (2010), la población ecuatoriana es de 14.5 millones de habitantes (Villacís & Carrillo, 2011, p. 14). El 63% de la población se encuentra principalmente en zonas urbanas y el restante 37% en zonas rurales. Se calcula que al menos 5 millones de personas viven con necesidades básicas

insatisfechas, en donde una necesidad es el acceso a redes de agua potable y saneamiento (Banco del Estado del Ecuador, 2014, pp. 5-10). En el país el 72% de los hogares poseen conexión con la red de agua potable pública, el porcentaje restante recibe agua de carros repartidores o de fuentes de agua no mejoradas como acequias, ríos, canales o vertientes, ubicadas principalmente en zonas rurales (INEC, 2013, p.8).

En el país las aguas residuales generadas se descargan a los ríos y el mar sin tratamiento previo (FONAG, 2009, p. 25). Otro problema persistente a nivel nacional es la poca información disponible de los niveles de contaminación producto de las descargas en el ambiente (Banco del Estado del Ecuador, 2014, pp 5-10).

El Instituto Nacional de Estadísticas y censos del Ecuador (INEC) en el año 2013, llevó a cabo el censo de información ambiental económica de Gobiernos Autónomos Descentralizados (GAD) en donde se consideraron aspectos como manejo del agua, residuos sólidos y tratamiento de aguas residuales. En este estudio al analizar el volumen de agua consumida frente a la cantidad de agua que se trata, sorprendentemente se revela que únicamente el 1,5% del agua que se consume recibe un tratamiento y el resto se derrama al ambiente (Figura 6).

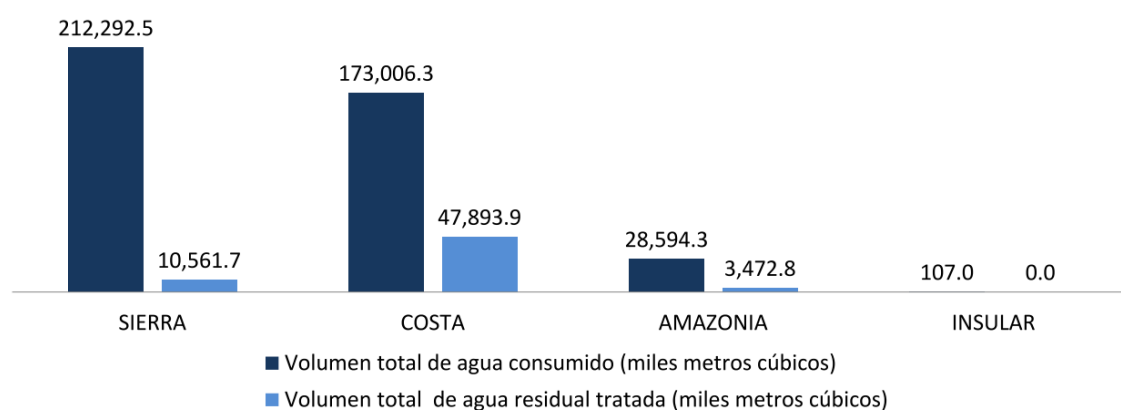


Figura 6. Valores del censo de información ambiental, sobre el volumen agua consumida vs el volumen registrado de agua residual tratada en el Ecuador (miles de m³).

Tomado de (INEC, 2013)

Según la Subsecretaría de Agua Potable y Saneamiento Básico del Ecuador (SAPyS), la falta de mecanismos de tratamiento previo de las descargas de agua residual al ambiente, desencadena un grave problema ambiental y sanitario, que se hace más frecuente en la costa, producto de la pestilencia y enfermedades generadas (Banco del Estado del Ecuador, 2014, pp. 5-10). Mediante la Estrategia Nacional de Agua Potable y Saneamiento, el Ecuador pretende alcanzar en los próximos años los (ODS) relacionados con la sostenibilidad del uso el agua, por lo que se ha planteado reducir a la mitad las aguas residuales que se liberan al ambiente sin tratar y a su vez plantear los mecanismos adecuados para extraer el agua dulce de una forma sostenible (SENAGUA, 2015, pp. 32-38).

2.3 Regulación y normativas vigentes relacionadas con la contaminación de las fuentes de agua

2.3.1 Regulaciones para la descarga de contaminantes en el ambiente

A nivel internacional se ha establecido normativas que emplean conceptos básicos que permiten el establecimiento de valores permisibles y límites de contaminantes de descargas en aguas municipales a cuerpos de agua receptores (WHO, 2008, pp. 51-101). Los criterios contemplan las normativas de la calidad de agua requerida son (CONAGUA México, 2007):

- El uso destinado.
- La concentración y carga de los contaminantes.
- Los tratamientos que se puedan realizar considerando los recursos técnicos y económicos existentes.

2.3.1.1 Internacionales

Los parámetros de contaminantes vertidos a un cuerpo de agua internacionales considerados en el presente trabajo, son los establecidos por la Agencia de Protección Ambiental, EPA por sus siglas en inglés.

Tabla 1.

Parámetros de descarga de aguas a un cuerpo de agua receptor considerados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.

Parámetro	Medida	Unidades
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	45	mg/L
Sólidos totales en suspensión (SST)	45	mg/L
Potencial de hidrógeno (pH)	6 – 9	-
Coliformes Fecales	10000	NMP/L

Adaptado de (EPA, 2001, pp.44-50) .

2.3.1.2 Nacionales

En el Ecuador la autoridad ambiental nacional que establece los límites permisibles de eliminación de contaminantes en el ambiente es el ministerio de ambiente. Los instrumentos jurídicos como la ley de gestión ambiental basándose en los anexos del texto unificado de la legislación secundaria del ministerio del ambiente, TULSMA, contempla el anexo 1 referente a la norma de calidad ambiental y descarga de los efluentes al recurso agua entrado en vigencia en noviembre del 2015 (MAE, 2015, pp. 21-33). Donde se establece los siguientes parámetros:

Sin embargo, el ministerio del ambiente otorga la competencia a los gobiernos autónomos descentralizados, provinciales o municipales el análisis y control de la contaminación ambiental en el caso de que se encuentren en la capacidad de poder realizar un seguimiento del estado ambiental de su territorio (MAE, 2015, pp. 21-33). Esto quiere decir que cada municipio puede establecer sus propias normativas técnicas, con niveles máximos y mínimos de los contaminantes según sus propios criterios.

Tabla 2.

Criterios de calidad para uso agrícola en riego y cuerpos de agua dulce en el Ecuador.

Parámetro	Medida		Unidades
	Uso agrícola en riego	Descarga a un cuerpo de agua dulce	
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	-	100	mg/L
Demanda química de oxígeno (DQO)	-	200	mg/L
Sólidos totales en suspensión (SST)	-	130	mg/L
Potencial de hidrógeno (pH)	6 – 9	6 – 9	-
Coliformes Fecales	10000	20000	NMP/L

Adaptado de (MAE, 2015, pp. 21-33)

2.4 Riesgos microbiológicos transmitidos en agua contaminada con materia fecal

El agua superficial mantiene contacto directo con el medio ambiente, lo cual la expone a una compleja mezcla de microorganismos patógenos y no patógenos en los cauces naturales (Cantalupo et al., 2011, pp. 1-2). En el agua que no posee un tratamiento adecuado antes y después del consumo es un foco infeccioso, que puede provocar afecciones gastrointestinales, respiratorias, oculares, nasales y piel en la población (Fong & Lipp, 2005, pp. 357-371). Los efluentes de alcantarillado, desechos industriales y restos de animales son factores que pueden provocar la presencia de materia fecal en las fuentes de agua para el consumo y agua con fines recreativos (Barba, 2002, pp. 1-35). Esto hace indefectible considerar los riesgos que esto representa para la salud, tomando en cuenta las enfermedades producidas por la transmisión de agentes microbiológicos relacionados con la contaminación fecal, su incidencia en la

población, así también el riesgo que contempla para la seguridad alimentaria el agua de riego contaminada con patógenos de origen fecal.

2.4.1 Riesgo para la salud y seguridad alimentaria

Según el informe realizado por un grupo de expertos de alto nivel de la FAO en el 2015, se considera que el agua es fundamental para la seguridad alimentaria y la nutrición. Sobre todo, es indispensable contar con un recurso en cantidad y calidad adecuada para el consumo, producción y transporte de alimentos. La explotación de los recursos hídricos de manera no sostenible reduce la posibilidad de emplear este recurso en la producción de alimentos de calidad. La falta de tratamientos de los efluentes puede llegar a afectar la calidad de los alimentos cuando se emplea agua contaminada para el riego (FAO, 2015, pp. 18-20). Es por eso que se plantean barreras múltiples como planes de tratamiento efectivo de aguas residuales, buenas prácticas de riego, manipulación higiénica de los alimentos y un lavado de alimentos antes del consumo con agua que provenga de una fuente mejorada (UNESCO, 2017, pp. 74-80).

Las enfermedades transmitidas por el agua, en su mayoría, son aquellas que se producen mediante el consumo de agua y alimentos contaminados con restos de heces fecales de origen animal y humano. Las evidencias sugieren que el agua en este estado es causante de enfermedades gastrointestinales. Estas afecciones pueden ser de corta duración por lo que no suelen considerarse en las estadísticas de los sistemas de salud pública a pesar de su recurrencia (Olaolu, Akpor, & Akor, 2014, pp. 205-212). Las principales enfermedades relacionadas con el agua contaminada con restos fecales son:

- Disentería: trastorno gastrointestinal generado por la colonización en el intestino delgado y grueso de patógenos como *Entamoeba histolytica* o *Shigella* sp. Se caracteriza por la presencia de diarrea, fiebre, náuseas y vómito, esfuerzos al defecar, diarrea acuosa con sangre y moco (Julian, 2016, pp. 18).
- Diarrea: Es el aumento de deposiciones diarias (> 4/día). Los cuadros de diarrea severa se provoca por la ingestión de agua y alimentos contaminados con patógenos parásitos, bacterianos o virales (Olaolu et al., 2014, pp. 205-212).

Puede ser grave en ancianos y niños de corta edad, llevando a cuadros de deshidratación severa, desnutrición y muerte (Cortez, Arreola, & Escarpulli, 2011).

- Cólera: es una enfermedad que se produce cuando la bacteria *Vibrio cholerae* logra infectar el tracto intestinal, generando un cuadro inicialmente asintomático. En casos extremos provoca cuadros de diarrea severa, dolor en las extremidades, vómito, deshidratación y ocasionando la muerte si no se realiza el tratamiento adecuado a tiempo. (De Guzman, de los Reyes, Sucaldito, & Tayag, 2015, pp. 12-6).

- Hepatitis: enfermedades víricas que atacan principalmente al órgano hepático, ocasionando inflamación. Los principales virus entéricos causantes de hepatitis son el virus de la hepatitis A y el virus de la hepatitis E. El mecanismo de transmisión se realiza mediante el consumo de alimentos o bebidas contaminados con restos fecales de portadores del virus. En el caso del virus de la hepatitis E la transmisión es principalmente por consumo de carne de animales portadores (zoonosis) (Fong & Lipp, 2005, pp. 357-371).

- Fiebre tifoidea: enfermedad comúnmente conocida como la fiebre entérica ocasionada por bacterias (*Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*). Se produce mediante el consumo de agua y alimentos contaminados con materia fecal. Se caracteriza por la propagación de toxinas que generan procesos inflamatorios y necrosis en varios órganos provocando cuadros febriles, dolores de cabeza, diarrea, se presenta pérdida de la conciencia, hemorragias en el tracto gastrointestinal, lastimados de coloración roja en la piel y complicaciones cardiacas (FAO, 2009, p. 13).

2.4.2 Principales agentes etiológicos de Enfermedades transmitidas por agua contaminada

- Agentes Bacterianos

El contenido bacteriano en los restos fecales es elevado en vista que todos los seres vivos poseen una microbiota normal relacionada con procesos de

digestión. Mediante distintas técnicas se ha podido determinar que los microorganismos que predominan en la flora intestinal de personas sanas pertenecen a los géneros *Bacteroides* y *Bifidobacterium*. Mientras que los agentes bacterianos relacionados con infecciones adquiridas por consumo de agua y alimentos contaminados principalmente son *Vibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Shigella* que son bacterias gram-negativas y anaerobias facultativas, junto con *Pseudomonas*, con características de aerobias gram-negativas y *Bacillus* o *Rhodococcus* que son gram-positivas (Bitton, 2011, p.25).

E. coli que es un microorganismo que posee serotipos inofensivos y que forman parte de la flora bacteriana normal desde los primeros instantes de vida de las personas. No obstante, se ha identificado que existen serotipos que pueden resultar patogénicos en altas dosis (10^6 células) y causar diarreas agudas, estos se han dividido en *E.coli* entero-toxigénico (ETEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasivo (EIEC) y enteroagregativo (EAAC) (Bitton, 2011, p. 28).

- Agentes virales

Los virus son organismos que, debido a su incapacidad de reproducirse de manera autónoma, entran a un ser vivo y aprovechan los mecanismos celulares para reproducirse y finalmente se excretan en las heces (Hjelms et al., 2017, pp. 1-16). En lugares que existe una gran presencia urbana los sistemas de alcantarillado son puntos en los que se concentran los patógenos excretados por la población. Estos patógenos reflejan las infecciones que se transmiten entre los habitantes, incluyendo aquellas que se transmiten a través de alimentos y agua contaminada con heces fecales (Shakir, Zahraw, & Al-Obaidy, 2017, pp. 95-102).

Las técnicas de metagenómica han permitido la determinación de las principales familias y especies de virus presentes en aguas residuales crudas presentes en sistemas de alcantarillado como *Adenoviridae* (Adenovirus Humano 41), *Astroviridae* (Astrovirus MLB1), *Caliciviridae* (Virus Norwalk), *Papillomaviridae* (Papillomavirus humano), *Parvoviridae* (bocavirus humano),

Picobirnaviridae (Picobirnavirus humano), *Picornaviridae* (Aichi virus) y *Polyomaviridae* (Polyomavirus HPyV6) (Cantalupo et al., 2011, pp. 1-11).

Las familias de virus no siempre se encuentran en iguales proporciones, se ha observado que adenovirus humanos, que poseen una tasa baja de patogenicidad, se encuentran en grandes cantidades en aguas residuales. Estos virus generalmente son empleados como indicadores de la contaminación, el resto en su mayoría son patógenos que se encuentran en bajas cantidades de acuerdo a la incidencia de las enfermedades en la población (Cantalupo et al., 2011, pp. 1-11).

- Agentes protozoarios

Los protozoarios son organismos que se asocian directamente con enfermedades hepáticas, gastrointestinales y disentería, generadas por el consumo de agua y alimentos con contaminación fecal. Como mecanismo de protección frente a agentes climáticos o respuestas del sistema inmune, los parásitos generan quistes que les permiten resistir en el ambiente hasta que las condiciones sean más favorables al ser ingeridos (Olaolu et al., 2014, pp. 205-212). Los principales parásitos patógenos relacionados con aguas residuales y contaminadas con materia fecal son *Cryptosporidium* y *Giardia*.

Giardia es un parásito flagelado, causante de la enfermedad Giardiasis, los quistes que se excretan a partir de pacientes poseen un rango de $1-5 \times 10^6$ quistes/ gramo de heces. (Bitton, 2011, pp. 30-95). *Cryptosporidium* posee un ciclo biológico que comprende una etapa de reservorio en animales y que emplea medios de transmisión como agua, heces, insectos vectores. La fase infecciosa de este organismo se realiza a partir de un criptocisto resistente a diferentes condiciones ambientales y posee estructuras que le permiten adherirse a fácilmente a las superficies (Richard et al., 2016, pp. 20-24).

Tabla 3.

Agentes etiológicos y enfermedades que provocan, concentración promedio presente en aguas residuales crudas.

Agente Etiológico	Enfermedad	Unidades por 100 ml
Bacterias		
<i>Campylobacter</i> spp.	Gastroenteritis	$10^4 - 10^5$
Esporas de <i>Clostridium perfringens</i>	Gastroenteritis	$6 \times 10^4 - 8 \times 10^4$
<i>Escherichia coli</i>	Diarrea	$10^6 - 10^7$
<i>Salmonella</i> spp.	Gastroenteritis	$0.2 - 8 \times 10^3$
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	
<i>Shigella</i> spp.	Disenteria basiliar	$0.1 - 10^3$
Virus		
Norovirus		
Poliovirus	Poliomielitis	$1.8 \times 10^2 - 5 \times 10^5$
Rotavirus	Diarrea, vomito	$4 \times 10^2 - 8.5 \times 10^4$
Adenovirus entéricos (40 y 41)	Gastroenteritis y enfermedades respiratorias	5.01×10^5
Virus de Norwalk	Diarrea y vómito	
Hepatitis A	Hepatitis	
Protozoarios y parásitos		
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Diarrea	0.1-39
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería	0.4
<i>Giardia lamblia</i>	Diarrea	12.5 – 20000
Huevos del Helmitos		
<i>Ascaris</i> spp.	Ascariasis	0.5 – 11
<i>Ancylostoma</i> spp. Y <i>Necator</i> sp.	Anemia	0.6 – 19
<i>Trichuris</i> spp.	Diarrea	1 – 4

Adaptado de (WHO, 2008, pp.10)

2.4.3 Incidencia Enfermedades transmitidas por el agua a nivel global y nacional

La incidencia de una enfermedad es considerada como la aparición de nuevos casos de en un periodo de tiempo establecido, mientras que la prevalencia es la proporción de individuos de un grupo o población que presentan determinada característica o comportamiento en un determinado tiempo (Cortez et al., 2011, pp. 137-151).

Las enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso son consideradas un problema de salud pública debido a que constituyen una de las principales razones de atención médica en centros de salud a nivel mundial. Con el fin de

determinar la incidencia de una enfermedad transmitida por el consumo de agua, se debe considerar la etiología de las enfermedades diarreicas (Brunkard et al., 2011, pp. 38-68). Relacionando el riesgo provocado por cada agente etiológico junto con la prevalencia de los episodios de diarrea producidos.

La mayor prevalencia de enfermedades gastrointestinales existe en países de bajos ingresos, debido a la poca inversión en manejo de recursos hídricos y déficit en mecanismos de atención médica inmediata. Sin embargo, en países con altos ingresos existen brotes esporádicos de diarrea aguda infecciosa (Wazny et al., 2013, p. 45). Revelando que este es un problema que está presente de manera global y requiere de la atención tanto de la población como de las autoridades de estado en el diseño de políticas adecuadas. Cabe destacar que, a pesar de la disminución de mortalidad en los últimos 10 años, no se ha observado aun disminución en la morbilidad que provocan las enfermedades diarreicas en la población (Liu et al., 2017, pp. 1291-1301).

Se ha estimado que la diarrea es la cuarta causa de muerte de niños menores de 5 años a nivel mundial. En el año 2015 ocasionó un promedio de 2.5 millones de muertes a nivel mundial, sin embargo, entre los años 2005 y 2015 las muertes disminuyeron aproximadamente un 20% (Tabla 4) (Forouzanfar et al., 2016, pp. 1659-1724). Entre los años mencionados anteriormente el rotavirus fue el agente etiológico que más afectó a la población llegando a ocasionar 199 000 muertes. En segundo lugar, *Shigella spp.* ocasionó 164 300 decesos y *Salmonella spp.* 90 300 casos. Sin embargo, el problema persiste especialmente en zonas como África subsahariana y Asia (GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, 2017, pp. 909-948).

Se atribuye la disminución de mortalidad infantil entre 2005 y 2015 (-34%) (Tabla 4), a la ampliación de la cobertura de agua potable y la construcción de infraestructura de saneamiento adecuada, estos factores han tenido una influencia directa en la disminución de rotavirus, *Cryptosporidium spp.* y *Shigella spp.* disminuyendo los episodios diarreicos y la desnutrición infantil (GBD, 2017, pp. 909-948).

América latina cuenta con las mejores cifras en cuanto a la reducción de muertes en todas las edades, y también ha conseguido disminuir notablemente la morbilidad, reflejados en la disminución de años de vida ajustados por discapacidad (DALY) gracias a los planes realizados para el combate de la desnutrición infantil (GBD, 2017, pp. 909-948).

Tabla 4.

Morbilidad y mortalidad por causa de enfermedades diarreicas de acuerdo a cada región y su disminución durante los años 2005 y 2015.

	Niños menores de 5 años				Todas las edades							
	Muertes		Episodios (100 000s)		DALYs ¹		Muertes		Episodios (100 000s)		DALYs ¹	
	Número	Porcentaje de cambio, 2005-15	Número	Porcentaje de cambio, 2005-15	Número	Porcentaje de cambio, 2005-15	Número	Porcentaje de cambio, 2005-15	Número	Porcentaje de cambio, 2005-15	Número	Porcentaje de cambio, 2005-15
Global	498 888	-34%	9574	45 109 455	-33%	1 312 128	-20%	23 925	71 589 510	-27 %		
Europa Central, Europa del Este y Asia Central	1967	-49%	145	207 352	-44%	3179	-39%	313	274 787	-41%		
Altos ingresos	683	-30%	26	66 050	-28%	25 701	47%	111	342 122	15 %		
América Latina y el Caribe	9367	-58%	668	980 659	-54%	24 053	-35%	1720	1542 673	-44 %		
Ecuador	227	-64%	28	26 887	-57%	484	-50%	60	39 815	-49%		
Norte de África y Medio Oriente	23 676	-48%	1070	2310 442	-44%	30 112	-42%	1696	2666 966	-41%		
Asia del Sur	143 342	-40%	3212	13 069 605	-39%	571 867	-22%	8986	25 939 993	-31%		
Sudeste de Asia, Asia oriental y Oceanía	16 805	-57%	1138	1739 482	-52%	88 066	-30%	3083	3789 582	-40%		
África Subsahariana	303 045	-25%	3311	26 735 862	-24%	569 147	-16%	8014	37 033 384	-20 %		

Adaptado de (GBD, 2017, pp. 909-948)

Nota: ¹DALYs es la disminución de años de vida ajustados por discapacidad, es una medida de la morbilidad en la población.

En el Ecuador se ha conseguido una reducción de muertes en niños menores de 5 años del 64% y de todas las edades en un 50% (Tabla 4), lo cual representa que las políticas adoptadas entre el año 2005 al 2015 le permitieron mantener índices de mejora de la calidad de vida, aunque los niveles de muertes por causa de enfermedades gastrointestinales aún son superiores a los que se presenta en países de ingresos altos (GBD, 2017, pp. 909-948). En el país existe una brecha

entre la incidencia en zonas rurales y zonas urbanas debido a la falta de infraestructura para la dotación de agua potable y saneamiento lo cual se ve reflejado en los agentes etiológicos (Vasco et al., 2014, pp. 563-569).

Estudios realizados muestran que en ambos entornos rotavirus como *E. coli* se encuentran presentes. Sin embargo, se ha visto que estos agentes etiológicos están actuando en coinfección con otros microorganismos, en el contexto urbano se ha observado que los casos de diarrea se presentan gracias a la acción conjunta entre *Shigella spp.* junto con rotavirus mientras que en el contexto rural lo hacen *Giardia lamblia* junto con rotavirus (Vasco et al., 2014, pp. 563-569).

2.5 El uso de indicadores para el análisis de la contaminación fecal

La identificación de patógenos bacterianos, virales y quistes de parásitos, existentes en fuentes de agua contaminada como los efluentes municipales, suelos, ríos, lagunas etc, requiere de constancia y periodicidad además de un personal bien capacitado ya que son agentes que pueden llegar a poner en riesgo la salud del operador (Brown et al., 2017, p. 12). En vista de la complejidad de las matrices existentes y la gran diversidad de organismos que pueden o no ser cultivables, existe la necesidad de establecer un indicador específico, que su análisis permita adquirir una idea del estado de la contaminación fecal específicamente y con menos riesgos (Meals, Harcum, & Dressing, 2013, pp. 1-29).

Durante 100 años el servicio de salud de los Estados Unidos ha establecido los coliformes totales como un indicador de la contaminación para agua de consumo y a través de los años otros indicadores se han venido estableciendo dependiendo el comportamiento de cada uno en los diferentes ambientes y su asociación con patógenos como virus o protozoarios (WHO, 2005, pp. 30-45).

2.5.1 Parámetros para un buen indicador

Para ser considerado un buen indicador debe de cumplir las siguientes condiciones (Bitton, 2011, pp. 30-95):

1. Debe de formar parte de la microbiota intestinal de los seres vivos de sangre caliente.

2. Debe de encontrarse al mismo tiempo que los organismos patógenos se encuentran presentes y deben ser inexistentes en muestras que no se encuentran contaminadas.
3. La concentración del indicador en la muestra debe ser superior a la del patógeno.
4. Al menos debe tener la misma resistencia que el organismo patógeno frente a los factores climáticos y ambientales.
5. Debe tener un comportamiento igual frente a la desinfección de agua y al tratamiento de aguas residuales.
6. Un buen indicador no debe tener la capacidad de multiplicarse en el medio ambiente
7. Los mecanismos de detección deben de aplicar métodos rápidos, eficientes, fáciles y económicos.
8. El Indicador no debe presentar ninguna patogenicidad ni constituir un riesgo a la población ni a los operarios que realizan análisis y pruebas.

2.5.2 Tipos de indicadores microbiológicos

1. Indicadores Bacterianos

a. Bacterias coliformes

Este tipo de bacterias pertenece a la familia Enterobacteriaceae, englobando tanto organismos aeróbicos como anaerobios facultativos, gram – negativos y no esporuladores, lactosa positivos con producción de gas a las 48 horas a 35°C. los microorganismos que se incluyen en este grupo son *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*. Diariamente estos organismos son descargados en las heces fecales de humanos y animales en un promedio de 10^9 Cfu/gr. Estos indicadores son ampliamente empleados para determinar la calidad del agua de consumo, agua recreacional y agua riego, etc. A pesar de su baja sensibilidad con respecto a los virus y protozoarios, es el principal indicador para determinar la eficiencia de plantas de tratamiento. (Bitton, 2011, pp. 30-95).

- Coliformes fecales: Son un grupo de bacterias fermentadoras de lactosa, principalmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La presencia de estos

organismos se correlaciona directamente con la presencia de material fecal proveniente de organismos de sangre caliente. *Escherichia coli* es un indicador ampliamente utilizado que se puede distinguir de otras enterobacterias porque son ureasa negativa y β - glucuronidasa positiva. Sin embargo, en el ambiente este indicador posee un comportamiento similar al de otras bacterias patógenas, pero no frente al observado en virus y protozoarios. Los coliformes fecales pueden reproducirse en el ambiente principalmente tropical y con baja contaminación química de manera independiente del huésped (Olaolu et al., 2014, pp. 205-212).

El método de detección principalmente es mediante el Número más probable (NMP) o filtración en membrana, este método puede verse influenciado por los métodos de recolección de muestras y el medio de cultivo empleado. La cantidad de bacterias debilitadas por la presencia de organismos competidores en el ambiente puede llegar a afectar su detección en medios selectivos con sales biliares y desoxicolatos, esto puede ocasionar que se subestime la presencia de algunos patógenos en una muestra que a pesar de ser afectados física o fisiológicamente conservan su capacidad de infección (Manyi-Lohc et al., 2016, pp. 1-27).

El desarrollo de ensayos enzimáticos ha facilitado la detección de *E.coli* de una forma más sensible, mediante el empleo de sustratos cromogénicos (Bitton, 2011, pp. 30-95). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también se emplea para la detección de genes específicos.

- *Streptococcus* Fecales

Este tipo de indicador comprende una serie de organismos que habitan el tracto gastrointestinal de todos los organismos de sangre caliente. Dentro de este grupo están *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus avium* y *Streptococcus equinus*. Es por este motivo que se emplean comúnmente con el fin de determinar contaminación fecal en una muestra de agua, alcanzando una mejor supervivencia en el ambiente y sin reproducción. Este tipo de indicadores se ha demostrado que poseen una correlación no solo con la presencia de bacterias patógenas sino también con virus patógenos en cuerpos de agua, agua de mar

y desechos sólidos, sobre todo *Enterococcus faecalis* (Byappanahalli, Nevers, Korajkic, Staley, & Harwood, 2012, pp. 685-706).

b. Bacterias anaeróbicas

- *Clostridium perfringens*

Este organismo es un indicador ampliamente discutido por ser un patógeno oportunista. Es anaeróbico, gram positivo y formador de esporas, habita el colon y constituye uno de los principales miembros de la flora bacteriana, gracias a su capacidad de generar esporas es resistente en el ambiente y métodos de desinfección al igual que algunos patógenos (Bitton, 2011, p. 38). Su mecanismo de detección se lo realiza aprovechando su capacidad sulfito-reductora (Vierheilig et al., 2013, pp. 5089-5092).

- Bifidobacterias

Este grupo de bacterias habita en el intestino de humanos y animales. Se ha determinado que este género de microorganismos es el tercero con más presencia en seres humanos por lo que se sugiere que puede brindar información acerca del origen de la contaminación humana. Estos indicadores son anaerobios, no forman esporas y son gram-positivos. El método de detección más empleado es mediante PCR con sondas que amplifican secciones específicas del ARN ribosómico (Lamendella, Santo Domingo, Kelty, & Oerther, 2008, pp. 575-584). PCR multiplex ha permitido determinar que *B. adolescentis* y *B. dentium* estaban estrechamente relacionados con aguas residuales de origen humano (Bonjoch, Balleste, & Blanch, 2004, pp. 3171-3175).

- *Bacteroides spp.*

Este microorganismo ha sido estudiado gracias a la gran cantidad existente en el aparato gastrointestinal de los animales de sangre caliente. En consecuencia, se encuentran a una mayor concentración que los mismos coliformes fecales. Existen varios tipos de *Bacteroides* que habitan en el intestino de determinadas especies animales por lo que se ha considerado en varios estudios como un trazador de contaminación. Sin embargo, no posee una prolongada estabilidad

en el medio ambiente lo cual dificulta su uso como un indicador (McQuaig, Griffith, & Harwood, 2012, pp. 6423-6432).

2. Indicadores Virales

- Colifagos Somáticos

Son virus que infectan enterobacterias especialmente *E.coli*. Este indicador se emplea tanto para la identificación de patógenos fecales bacterianos y virus entéricos, en muestras ambientales impactadas por la contaminación de aguas residuales se ha encontrado en concentraciones más elevadas que los mismos virus entéricos (Bitton, 2011, pp. 30-95). La desventaja se encuentra en que pueden ser confundidos con bacteriófagos que se encuentran naturalmente en el ambiente. Son ampliamente utilizados para evaluar la eficiencia de los procesos de las plantas de tratamiento de aguas residuales con las adecuadas modificaciones genéticas que le permiten ser identificado de manera específica (Jofre, Lucena, Blanch, & Muniesa, 2016, pp. 1-21).

- Male-specific Fagos de RNA

Son fagos pertenecientes a la familia *Leviviridae*, con ARN monocatenario y una cápside cúbica. El mecanismo de infección consiste en la entrada a la célula huésped mediante el pili sexual de la célula. Este tipo de virus tienen poca presencia en la materia fecal humana por lo que no pueden ser empleados como indicadores de la contaminación de manera directa. Sin embargo, existen grandes cantidades en aguas residuales. De los 4 tipos existentes 2 de ellos el I y III se pueden relacionar directamente con contaminación humana mientras que el II y el IV pueden ser relacionados con desechos animales por lo que se puede emplear como trazadores (Nappier, Aitken, & Sobsey, 2006, pp. 2471-2475).

3. Esporas

Las esporas de *Bacillus* se ha establecido como un buen indicador de quistes de protozoarios, la ventaja que poseen es que no son patógenos y pueden vivir por tiempos prolongados en el ambiente sin reproducirse en cuerpos de agua. Su

medición resulta económica frente a otros indicadores. En plantas de tratamiento de aguas residuales se usa este indicador para evaluar la tasa de eliminación de quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*. Su presencia es elevada en aguas de ríos gracias a la resistencia a la radiación ultravioleta (Cabral, 2010, pp. 3657-3703).

2.6 Herramientas de trazabilidad de la contaminación microbiológica

Se ha observado que la valoración de la contaminación mediante el empleo de indicadores fecales bacterianos es muy útil para la evaluación de lugares altamente impactados por la contaminación antropogénica. Sin embargo, no permite obtener información específica del origen de la contaminación fecal (Hagedorn et al., 2011, pp. 40-60). El conocimiento de la contaminación fecal desde el origen es importante ya que la detección de la contaminación humana presente en aguas residuales municipales es la primera estrategia para asegurar el adecuado manejo ambiental y precautelar la salud. Otra ventaja que poseen los trazadores es discriminar el origen de la contaminación entre fuentes animales y humanas. Gran cantidad de enfermedades zoonóticas pueden ser prevenidas únicamente con controles de los efluentes de granjas que pueden actuar como reservorios de distintas enfermedades (Bitton, 2011, pp. 30-95).

Los esfuerzos en investigación de indicadores microbiológicos de la calidad del agua, han englobado las metodologías desarrolladas en una herramienta llamada *Microbial Source Tracking* (MST), esto implica el uso de indicadores específicos de huésped encontrados en una sola especie y asociados al hospedador, para rastrear la contaminación en un espacio geográfico (Hagedorn et al., 2011, pp. 40-60).

2.6.1 Metodologías utilizadas para analizar el origen de la contaminación microbiológica.

Existen 2 metodologías de MST desarrolladas para el análisis de indicadores específicos de origen. Dependiente de librería, que requiere un conocimiento previo de varios factores que pueden relacionar los perfiles de un organismo con los encontrados en el ambiente. El segundo grupo de métodos es independientes de librería que va de la mano con técnicas moleculares avanzadas, como metagenómica, para determinar el origen de la contaminación sin necesidad de

hacer un perfil previo de los animales existentes en una zona (Wong, Fong, Bibby, & Molina, 2012, pp. 151-164).

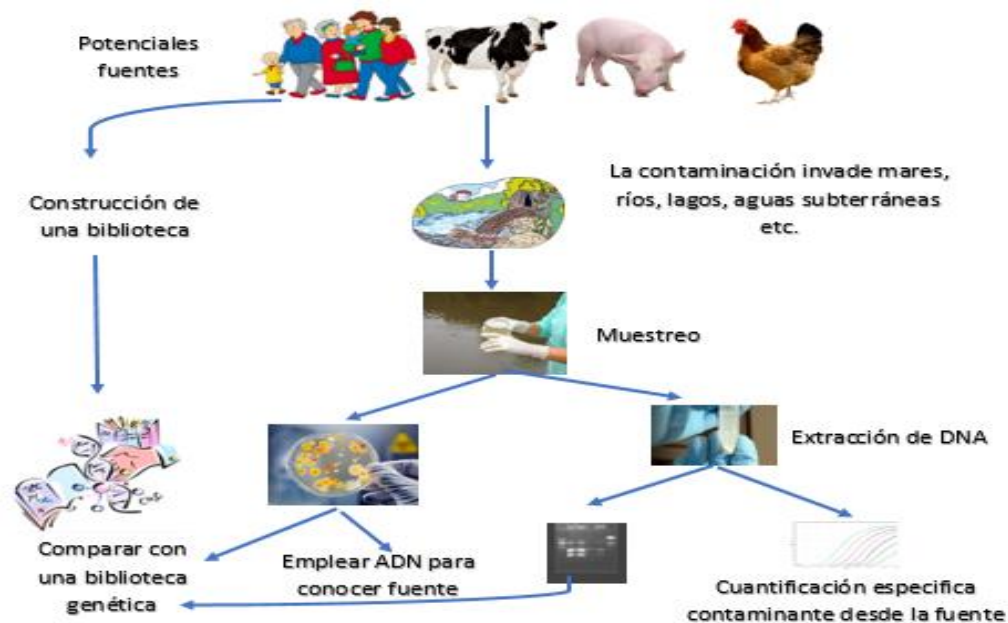


Figura 7. Diagrama de metodologías de *Microbial Source Tracking* (MST)

- ***Microbial Source Tracking* dependiente de librería**

El análisis dependiente de librería se caracteriza por la necesidad de contar con un conjunto de datos que posean las características del organismo (huellas, patrones y perfiles) obtenidos a partir de aislados fecales de distintos animales, estos son comparados con las características obtenidas de los organismos que se encuentran en muestras ambientales donde hay sospecha de contaminación fecal (Figura 7) (Meschke & Boyle, 2007, pp. 137-179).

La librería puede estar compuesta por perfiles fenotípicos, bioquímicos, o genotípicos. Las bacterias fecales se relacionan directamente con grupos de organismos específicos a los cuales infectan, por lo que las cepas encontradas en ambientes como ríos lagos y mares normalmente poseen gran similitud con las encontradas en diversos hospedadores presentes en el área donde la librería fue realizada.

Los principales indicadores fecales bacterianos empleados son: *Escherichia coli*, *Enterococcus*, coliformes fecales y coliformes totales. La elección del tipo de

indicador bacteriano determinará el éxito de los resultados. En varias investigaciones, *Enterococcus* ofrece una mejor predicción de la fuente que *E.coli* gracias a sus características metabólicas específicas (Hagedorn et al., 2011, pp. 40-60).

Los métodos empleados son:

Fenotípicos

- Resistencia a antibióticos: generan presión selectiva y resistencia en bacterias que habitan en el sistema digestivo expuesto a antibióticos (Wiggins et al., 2003, pp. 3399-3405).
- Huella Bioquímica: capacidad de las bacterias de metabolizar sustratos de nitrógeno y carbón específicos (Ahmed, Neller, & Katouli, 2005, pp. 4461-4468).
- Ésteres de metilo y ácidos grasos (FAME): se basa en la composición de los ácidos grasos presentes en las paredes celulares de distintos microorganismos (Haznedaroglu, Yurtsever, Lefkowitz, & Duran, 2007, pp. 803-809).

Genotípicos

- Electroforesis de gel en campo pulsado: consiste en digerir el ADN con una enzima de restricción de cortes raros, limitando el número de fragmentos y estableciendo perfiles característicos de distintos organismos presentes en la librería (Furukawa & Suzuki, 2013, pp. 444-449).
- Ribotyping: consiste en una digestión del ADN genómico con enzimas de restricción, seguido por una electroforesis en gel y un southern blot que permite discriminar las secuencias conservadas de cada especie mediante hibridación (Kelsey, Webster, Kenny, Stewart, & Scott, 2008, pp. 2220-2228).
- Técnicas dependientes de PCR (Bitton, 2011, pp. 190-300):
 - Rep- PCR: Análisis de secuencias palindrómicas conservadas y repetitivas en el genoma de las bacterias de cada huésped.
 - AFLP: consiste en digerir el ADN genómico de las bacterias de la librería con enzimas EcoRI Y MseI, ligando a adaptadores

reconocidos por cebadores específicos realizando una PCR selectiva.

- RAPD: Es la amplificación de ADN polimórfico al azar, por lo que se emplea cebadores no selectivos y en gran cantidad en una reacción estableciendo diferentes patrones de acuerdo a los huéspedes identificados en la librería.
- DGGE: electroforesis desnaturalizante en gradiente, permite la separación de indicadores estrechamente relacionados genéticamente debido a las concentraciones de urea y formamida presentes en el gel que condicionan la movilidad a través del gel de acrilamida.

- ***Microbial Source Tracking independiente de librería***

Los métodos independientes de librería nacen de la necesidad de cubrir un amplio espectro de organismos en diversos contextos geográficos donde se hace imposible el acceso a muestras previas para establecer los perfiles relacionados a la contaminación fecal. Además, Las técnicas moleculares independientes de librería poseen una ventaja al permitir determinar la presencia de distintos indicadores independientemente de la integridad celular o cultivo, ya que se analiza ADN que se mantiene estable en el tiempo y en condiciones extremas (Hagedorn et al., 2011, pp. 40-60).

Para considerar un buen indicador independiente de librería, este debe estar ausente en los restos fecales de cualquier otro grupo de individuos que no sea el huésped, de la misma manera deben de ser abundantes en las heces fecales y de alta ocurrencia (Tornevi, Bergstedt, & Forsberg, 2014, pp. 1-5). Este grupo de métodos independientes de librerías a su vez se clasifican en función de la necesidad de cultivo previo.

Métodos dependientes de cultivo

- Indicadores bacterianos: la relación entre coliformes fecales y Streptococcus fecales (FC/FS), permite discriminar entre contaminación humana cuando $FC/FS \geq 4$ y contaminación animal cuando la relación FC/FS es < 0.7 . Sin

embargo, es una metodología poco confiable ya que se ha demostrado que las diferencias de crecimiento observadas son consecuencia de la muerte de las bacterias debido a los tratamientos y al almacenamiento (Meschke & Boyle, 2007, pp. 137-179).

Métodos independientes de cultivo

- Genes del 16S rRNA: Es a la secuencia de ARN ribosómico que conforma la unidad 30S de los procariotas, posee secuencias ampliamente utilizadas en análisis filogenéticos de bacterias, debido a que cuenta con secuencias altamente conservadas y cebadores universales para su aplicación en técnicas moleculares (Ballesté & Blanch, 2011, pp. 3518-3525). Sin embargo, existen regiones del 16S rRNA únicas entre diferentes especies de bacterias que se emplean como dianas de reconocimiento en MST. La existencia de múltiples copias en una misma célula, permite que este material genético sea detectable a pesar del efecto de la dilución en el ambiente. (Hughes, Beale, Dennis, Cook, & Ahmedb, 2017, pp. 1-16).
- Monitoreo directo de ADN de patógenos humanos y animales: las técnicas moleculares junto con los procedimientos de concentración efectivos han permitido la detección directa de distintos patógenos virales, bacterianos y protozoarios. La metodología que se emplea principalmente consiste en la detección y cuantificación de secuencias de ADN específicas mediante PCR convencional, RT-PCR y qPCR. En la actualidad esta técnica es muy utilizada a nivel mundial ya que permite el análisis de las secuencias de virus específicos de contaminación humana y animal con la finalidad de establecer el origen de la contaminación, es por ello que se está convirtiendo en parte del análisis microbiológico rutinario para conocer el estado de diversas fuentes de agua dulce y algunos organismos están estableciendo normativas técnicas ambientales que incluyen la medición de estos parámetros (Bitton, 2011, pp. 190-300).

2.6.2 Virus como trazadores animales

Los indicadores virales presentan ventajas tanto por el corto tiempo que requiere su análisis como por su independencia de librerías y cultivos, que facilita su

aplicación. El análisis de virus consiste en el empleo de genes de virus entéricos como marcadores para MST (Wong et al., 2012, p. 15). La aplicabilidad de los virus como trazadores de la contaminación fecal, nace de la utilidad que confiere la replicación específica en un huésped. La cuantificación de virus humanos y animales es la clave para determinar la presencia y el origen de la contaminación fecal en el agua (Bofill-mas et al., 2013, pp. 1-7).

El desarrollo de técnicas moleculares para la detección y cuantificación de ADN han permitido el desarrollo de métodos efectivos para analizar los virus que se excretan. El análisis molecular de virus de ADN se realiza con mayor facilidad que los de ARN debido a que la técnica de PCR empleada es menos susceptible tanto a inhibición enzimática y otros problemas ocasionados por la enzima transcriptasa reversa que se usa para la detección de virus de ARN (Bofill-mas et al., 2013, pp. 1-7).

Los virus entéricos que más se ha reportado en el ambiente son virus de ADN como adenovirus (AdV) y los poliomavirus (PyV), y de ARN como enterovirus (EV), norovirus (NoV), rotavirus (RV), virus de la hepatitis (HepV). Esto ha hecho que se permita su empleo como trazadores de la contaminación específica humana y animal sea ampliamente desarrollada.

La familia *Adenoviridae* posee un genoma de doble cadena de ADN con 35 000 bp. Estos virus son transmitidos mediante alimentos, agua y aerosoles contaminados. Se ha encontrado en mamíferos, anfibios y aves. En el caso de humanos infectan principalmente niños los cuales excretan mediante las heces fecales y la orina.

Los adenovirus humanos (HAdV) comprenden 7 especies con 52 serotipos que son responsables principalmente de infecciones entéricas, respiratorias y oculares. Los tipos 40 y 41 son altamente relacionados a gastroenteritis por lo que técnicas de MST emplean qPCR diseñadas para identificar la secuencia que codifica la proteína hexón. Esta se encuentra específicamente en la cubierta de los adenovirus y está relacionada con algunos procesos de infección tardía. En varias investigaciones realizadas HAdV han mostrado una especificidad del 100% para contaminación fecal humana (Hagedorn et al., 2011, pp. 40-60). En

el caso de adenovirus porcinos (PAdV) se han identificado 6 serotipos que generan algunos síntomas de gastroenteritis en cerdos como diarrea o anorexia, y también enfermedades respiratorias. Se han desarrollado indicadores específicos que reconocen la proteína hexón (Hundesda et al., 2009, pp. 130-135).

Los Poliomavirus bovinos (BPyV) pertenecen a la familia *Polyomaviridae*, con un genoma circular de doble cadena de ADN. La primera vez que se logró aislar fue como un contaminante que infectó un cultivo celular de células de riñón de monos. BPyV han sido identificados en mataderos, aguas residuales, lodos y agua de ríos de áreas de influencia de actividades ganaderas. Sin embargo, en alcantarillas 100% urbanas no se han identificado, esto ha favorecido el uso de este indicador específicos para bovinos (Hundesda et al., 2010, pp. 12-15). En el genoma de poliomavirus se ha identificado 5 genes que pueden ser empleados para MST y que presentan secuencias específicas de huésped (VP1, VP2, VP3, Large T-antigen y small T-antigen), esto permite validar la teoría de que poliomavirus evolucionan junto con sus hospedadores ya sean aves, humanos o cualquier otro tipo de mamíferos (Wong et al., 2012, pp. 151-164).

Los Parvovirus son partículas de forma icosaédricas, poseen un genoma de ADN de 5 kb, monocatenarios y lineal. La familia *Parvoviridae* se encuentra ampliamente distribuida en diferentes huéspedes como insectos y primates sin embargo están relacionados con enfermedades neurológicas y entéricas de los pollos y pavos causando diarreas, retraso en el crecimiento y aumento en el consumo de alimentos (Domanska-Blicharz, Jacukowicz, Lisowska, & Minta, 2012, pp. 2425-2430). Para emplear este virus como un indicador de MST se ha analizado las secuencias que codifican para proteínas de cápside VP1 y VP2 que han sido seleccionadas como genes marcadores para la detección y cuantificación de parvovirus de pollos (ChPV) (Carratalà et al., 2012, pp. 7496-7499).

2.7 Estado ecológico de la Cuenca Alta del Río Guayllabamba

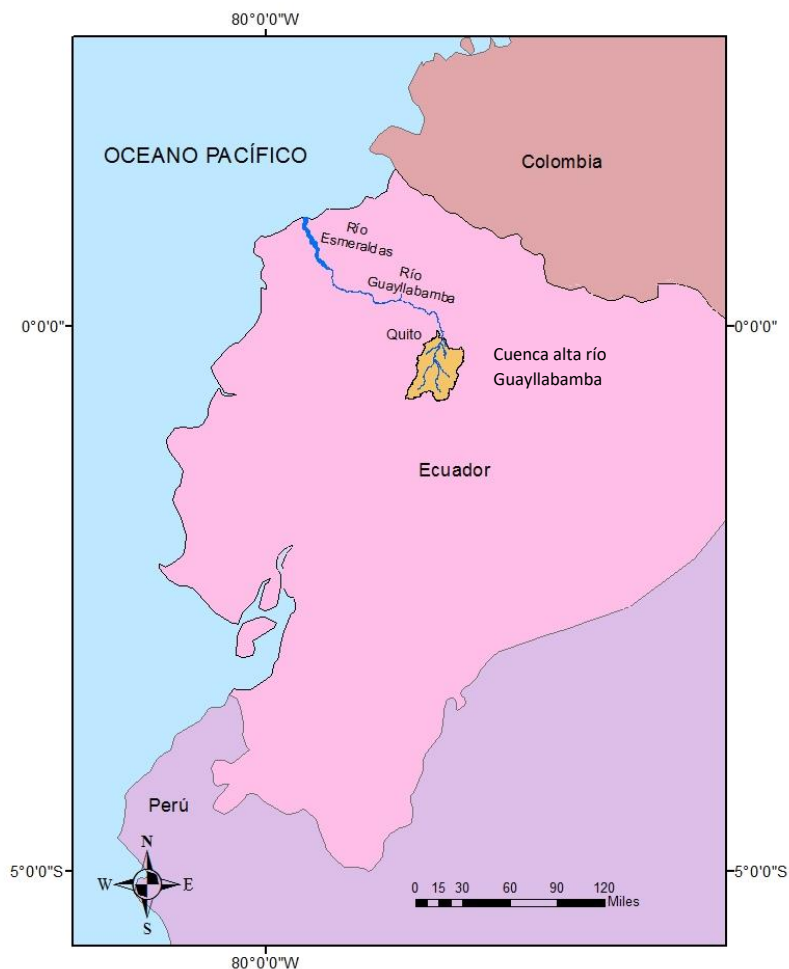


Figura 8. Ubicación geográfica de la Cuenca Alta del río Guayllabamba.

La Cuenca Alta del Río Guayllabamba se ubica en la parte norte de la serranía ecuatoriana (Figura 8), principalmente en la provincia de Pichincha y conforma parte de la cuenca del río Esmeraldas que desemboca sus aguas en el Océano Pacífico. A lo largo existen importantes centros poblados como Cayambe, Tabacundo, Machachi, Sangolquí y Quito, dentro de este espacio de 4707 Km^2 habitan un aproximado de 2,5 millones de personas (FONAG, 2009, pp. 5-12).

El estado ecológico de la cuenca alta del río Guayllabamba se encuentra amenazado por la expansión del urbanismo y el crecimiento demográfico que experimentan las ciudades nor-andinas del Ecuador (Voloshenko-Rossin et al., 2015, pp. 41-53). Los cuerpos de agua que conforman la cuenca son de gran importancia e interés tanto ambiental, social y político. la captación de los

deshielos de glaciares en los nevados, las fuentes subterráneas, principalmente son empleadas como agua de consumo y riego (Ríos Touma, Prat, & Terneus, 2004, pp. 7-39).

Se considera que aproximadamente el 1% de las aguas residuales en esta zona son descontaminadas y la infraestructura de saneamiento no ha presentado avances significativos en los últimos años (De Bievre, Coello, De Keizer, & Maljaars, 2008, p. 64).

2.7.1 El impacto de las actividades realizadas a lo largo de la Cuenca del Río Guayllabamba

La Cuenca Alta del Río Guayllabamba posee zonas antropogénicas que históricamente han impactado la ecología de los ríos. Esto se puede evidenciar debido a la disminución de la diversidad de animales nativos como macroinvertebrados y vegetación de ribera (Ríos-Touma, Acosta, & Prat, 2014, 249-273). La ganadería y agricultura son actividades que afectan la diversidad ecológica de los ríos de la cuenca del Río Guayllabamba. Según varios estudios, las zonas de páramo que presentan menos intervenciones humanas poseen parámetros ecológicos saludables y mejores hábitats ecológicos en los ríos (Carvajal, 2016, pp. 17-20).

El deterioro de los recursos hídricos, el cambio del paisaje debido a los incendios forestales, la extensión de las fronteras agrícolas, el pastoreo intensivo y prolongado se ha agudizado los últimos años (De Bievre et al., 2008, pp. 120). Se ha determinado que actividades como las vulcanizadoras, la crianza de truchas y la minería son actividades que afectan la ecología de los sistemas fluviales de la zona (FONAG, 2009, pp. 5-12).

La red de alcantarillado de la ciudad de Quito tiene un sistema combinado que permite la circulación tanto de las aguas de las lluvias junto con las aguas residuales domésticas generadas en el área urbana (EPMAPS, 2011, p. 24). Esto genera que en épocas de lluvia los sistemas colapsen y las aguas residuales junto a las de lluvia se desborden incrementando el riesgo de contaminación y el aparecimiento de enfermedades.

La unidad destinada para el control de la contaminación del agua de la EPMAPS ha realizado estudios sobre la calidad del recurso en donde se ha establecido que tanto el río San Pedro, Machángara, Monjas y Guayllabamba no se encuentran aptos para ningún uso, como el abastecimiento de agua potable, preservación de la vida acuática y silvestre, riego y uso recreativo (EPMAPS, 2014, p. 12) (FLACSO-Ecuador, 2011, pp. 30-35).

La ciudad de Quito consume cantidades cercanas a $5,82 \text{ m}^3/\text{s}$ en agua potable y genera aproximadamente de $4,8 \text{ m}^3/\text{s}$ de aguas residuales. Estas aguas son descargadas principalmente en el río Machángara con un caudal de $3,48 \text{ m}^3/\text{s}$, en el río San Pedro y Guayllabamba con $0,69 \text{ m}^3/\text{s}$, y el río Monjas con $0,64 \text{ m}^3/\text{s}$ (EPMAPS, 2011, p.24) .

2.7.2 Estudios con indicadores de contaminación realizados hasta la actualidad

Las investigaciones realizadas hasta el momento han permitido comprender la dinámica de la diversidad en los ríos de la región andina del Ecuador. Sin embargo, se requiere de estudios que permitan ampliar el conocimiento de las relaciones existentes entre la diversidad biótica fluvial y las actividades terrestres que pueden influir en su estado, esto permitiría el adecuado manejo y preservación.

Según una investigación realizada por la Universidad San Francisco de Quito en el año 2011, los ríos que pasan por zonas pobladas en varios lugares de la cuenca alta del río Guayllabamba presentan un aumento en la conductividad, menor diversidad de invertebrados acuáticos e índice biótico andino (ABI), Debido a la alta carga de contaminantes orgánicos presentes en efluentes de alcantarillas (Ordóñez, 2011, p.24). Se ha determinado que cuando los caudales se encuentran en niveles bajos los índices de *E. coli* son elevados al igual que la cantidad de sólidos suspendidos (Ordóñez, 2011, p.24).

En el año 2008, EPMAPS realizó la caracterización de las descargas de aguas residuales generadas en varios sectores del distrito metropolitano de Quito, los niveles promedio de los indicadores fueron: Coliformes fecales ($8,36\text{E}+07 \text{ Cfu/L}$), DBO ($302,4 \text{ mg/l}$) y DQO ($634,8 \text{ mg/l}$) (SENPLADES, 2016, pp. 1-20).

Voloshenko-Rossin, en el año 2015 presentó un estudio de contaminantes emergentes en la cuenca del río Esmeraldas. Los valores de coliformes totales presentados en el Chaupi (Río San Pedro) fue de $3,16E+03$ Cfu/L, en la parroquia de Amaguaña (Río San Pedro) de $6,30E+06$ Cfu/L, en el Machángara sur $5,01E+08$ Cfu/L, Machángara norte $6,30E+09$ Cfu/L, Cumbayá (San Pedro) $1,58E+07$ Cfu/L, río Monjas $3,98E+06$ Cfu/L y río Guayllabamba $1,58E+08$ Cfu/L (Voloshenko-Rossin et al., 2015, pp. 41-53).

2.7.3 Gestión actual de aguas residuales de zonas urbanas y rurales

La falta de planificación para un uso de los recursos hídricos es evidente y bien documentados en varios estudios realizados previamente. La principal zona urbana de la cuenca es el Distrito Metropolitano de Quito. Los servicios de agua de consumo y saneamiento están manejados por la Empresa Metropolitana de Alcantarillado y Agua Potable de Quito (EMAAP-Q). El río Machángara es la mayor cuenca de la zona urbana del DMQ. En la zona de aportación de este río se encuentran construidos varios colectores donde confluyen las aguas provenientes de la red de alcantarillado de la ciudad y son descargadas en los cauces naturales deteriorándolas (De Bievre et al., 2008, p. 64).

Hasta el año 2013 la ciudad de Quito contó con más del 97 % de cobertura de agua potable, 91% de alcantarillado y 0% de tratamiento de aguas residuales (FONAG, 2009). Los programas de descontaminación de los ríos de Quito abarcan la sub-cuencas de los ríos Machángara y Monjas. Considerando que los ríos Guayllabamba y San Pedro pertenecen a otros cantones se ha planteado que la intervención programada para el tratamiento de aguas residuales se lo debe de implementar simultáneamente (EPMAPS, 2011, p. 85).

Actualmente, (año 2017) ya se encuentra en funcionamiento la primera planta de tratamiento de aguas residuales pública de Quito en el sector de Quitumbe, con un caudal de 100 L/s, interviniendo el agua que usa apenas 75 mil personas del sector. Está planta está ubicada en el extremo sur de la ciudad e inicio del río Machángara. Hasta el momento los efluentes del agua de alcantarilla de la ciudad todavía se siguen descargando desde los diferentes colectores a los ríos directamente (EPMAPS, 2014, p. 9). Sin embargo, se contempla la construcción

de la planta de tratamiento Vindobona hasta el 2025 que tratará 7500 L/s, proveniente de emisarios e interceptores que abarquen todo el caudal de los efluentes de la ciudad y lo canalicen por aproximadamente 30 kilómetros hasta la planta de tratamiento en donde se pretende aplicar métodos biológicos y devolver al río Guayllabamba agua de mejor calidad (Vidal, 2016, pp. 1-15).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

Con el objetivo de analizar la contaminación fecal producto de las diferentes actividades que se realizan en la Cuenca alta del Río Guayllabamba, se plantea una metodología de investigación de carácter descriptivo y exploratorio. Tanto la parte práctica como teórica se centra en identificar el comportamiento de distintos fenómenos en un área determinada, buscando dar respuesta a estos a partir de lo observado y medido en cada lugar. Un diseño experimental no es aplicable en este contexto, debido a que no es posible plantear ningún experimento que manipule variables para observar diferentes respuestas.

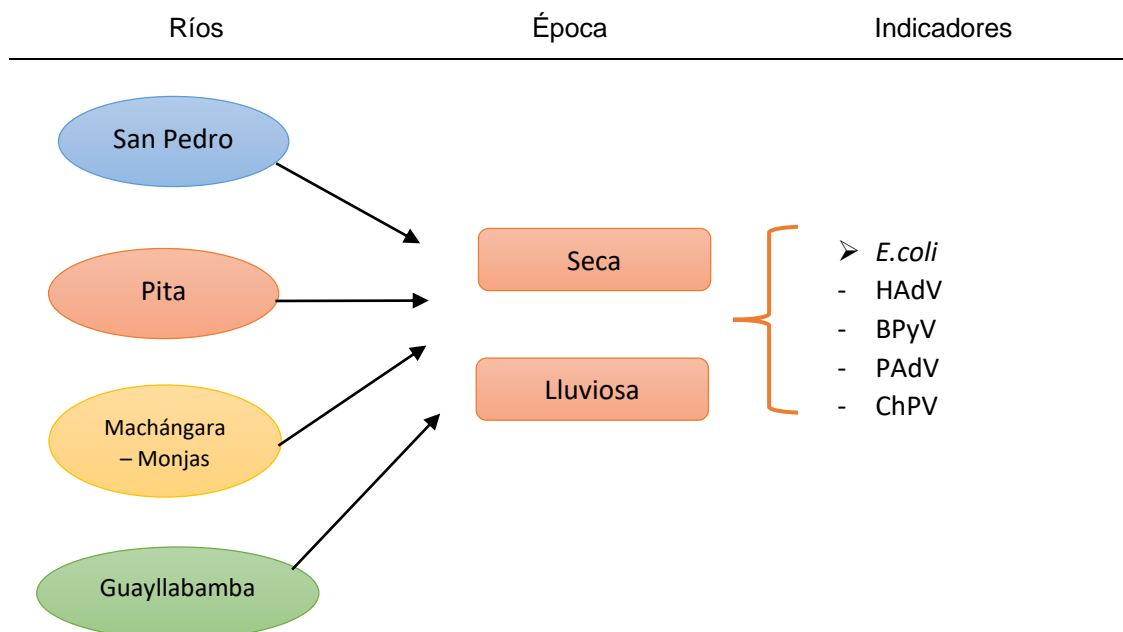


Figura 9. Planteamiento del análisis de las muestras de investigación

Como se puede comprobar en el esquema planteado en la Figura 9. La investigación consiste en el análisis de la contaminación fecal en la Cuenca Alta del Río Guayllabamba, para lo cual se considera 37 puntos ubicados en los principales afluentes de del río Guayllabamba, como lo son río San Pedro, Pita y Machángara-Monjas. Los muestreos se realizaron tanto en época seca como lluviosa para ser analizados por indicadores bacterianos y virales, con el fin de analizar diferencias entre épocas climáticas, buscando determinar el origen de los aportes de contaminación microbiológica.

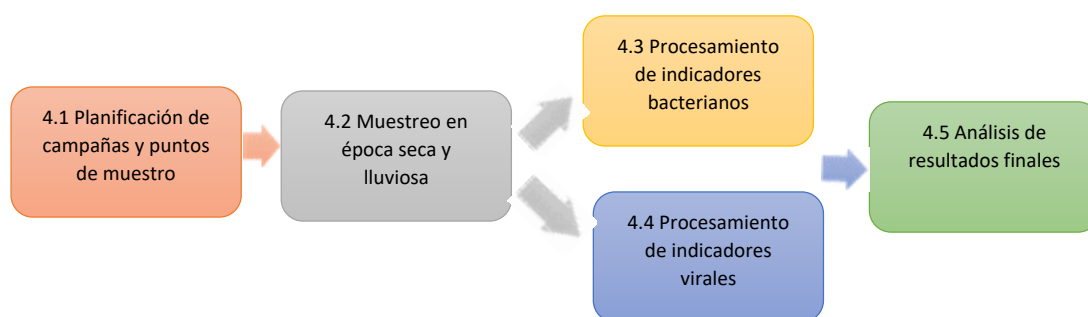


Figura 10. Diagrama metodológico del procedimiento experimental planteado.

Para el cumplimiento de los objetivos experimentales establecidos en el presente trabajo se ha planteado el procedimiento experimental (Figura 10) que inicia con la planificación de la localización y fechas de muestreos. A continuación, se realizó el muestreo en las épocas correspondientes. El procesamiento en el laboratorio consiste en dos fases paralelas, análisis bacteriológico y de virus, al final se interpreta los resultados.

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 Planificación de campañas y puntos de muestreo

Para llevar a cabo el presente trabajo de titulación se realizó la colección de las muestras en 37 puntos distribuidos a lo largo de los ríos Pita, San Pedro, Machángara y Monjas, que conforman las principales sub-cuencas de la cuenca alta del río Guayllabamba. El muestreo se realizó durante los meses de marzo, abril y mayo del 2017, en época lluviosa, mientras que el realizado en julio y agosto 2017 coincidieron con la época seca del año.

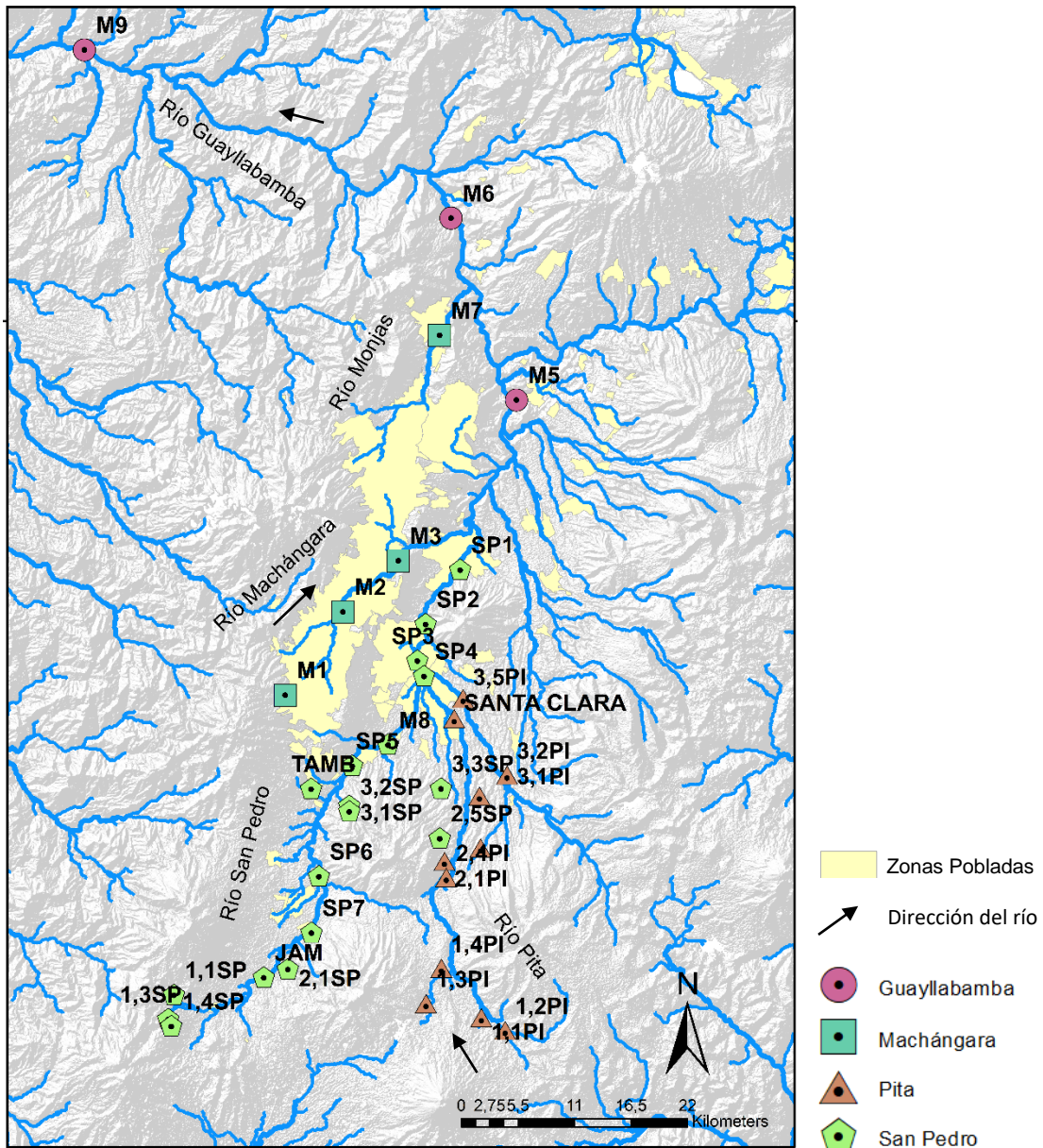


Figura 11. Geolocalización de puntos de muestreo en la Cuenca Alta del Río Guayllabamba.

Para este estudio se consideró la región centro - norte de la cordillera interandina del Ecuador, la cual es de gran importancia ya es una región altamente poblada e intervenida por la agricultura por lo que también presenta un alto porcentaje de deforestación y degradación ecológica de los ambientes acuáticos de los ríos.

La distribución espacial de los puntos, junto con la ubicación en latitud/Longitud decimal se puede observar en la Figura 11 y Tabla 5. Las muestras fueron

tomadas en altitudes que van desde los 3863 m.s.n.m hasta los 500 m.s.n.m. Considerando zonas cercanas a vertientes naturales y deshielos de nevados, hasta puntos en donde el río Guayllabamba ha recibido efluentes de un gran número de sub-cuencas que poseen altos niveles de contaminación de diferentes orígenes. los criterios de la mayor parte de puntos fueron considerados de trabajos previos realizados en la Cuenca (Ríos Touma et al., 2004, pp. 5-10) y (Ríos-Touma et al., 2014, pp. 249-273).

Los puntos establecidos en la cuenca del río San Pedro provienen de afluentes que reciben aguas de deshielos de los volcanes Illinizas, Corazón, La Viudita, Rumiñahui y Pasochoa. Los puntos se dividieron en 4 secciones de acuerdo a la altitud. La sección 1 (1,1SP, 1,3SP, 1,4SP) con zonas de páramo andino que van desde los 3600 msnm hasta los 3500 msnm. La sección 2 (2,1SP, 2,5 Y JAM) con altitudes desde 3300 hasta 3000 msnm con vegetación de bosque montano. La sección 3 (3,1SP, 3,2SP, 3,3SP, TAMB, SP5, SP6 y SP7) corresponde a 2900 a 2700 m.s.n.m, se caracteriza por poseer una zona de matorral húmedo apropiado para la crianza ganadera y los asentamientos humanos. La sección 4 (SP1, SP2, SP, SP4 y M8) se encuentra a una altitud de 2600 a 2200 m.s.n.m, estas zonas se caracterizan por un alto impacto antropogénico ocasionado por lugares poblados del Valle de los Chillos y Cumbayá, encontrándose después de la confluencia del Río San Pedro y Río Pita.

Los puntos establecidos en la cuenca del Río Pita reciben afluentes provenientes de los volcanes Rumiñahui, Cotopaxi, Pasochoa, Sincholagua y Antisana. La sección 1 (1,1PI, 1,2PI, 1,3PI, 1,4PI) comprende puntos de páramo andino desde los 3900 a 3600 m.s.n.m. La sección 2 es bosque andino (2,1PI, 2,2PI, 2,4PI) de 3300 a 3000 m.s.n.m., La sección 3 (3,1PI, 3,2PI, 3,4PI, 3,5PI y Santa Clara) de 2900 a 2500 m.s.n.m. característicos de matorrales en donde se dedica a la ganadería y hay varias parroquias rurales asentadas.

Tabla 5.

Descripción de los puntos, el Río al que pertenecen, coordenadas decimales (longitud y latitud) y la elevación en metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m).

Río	Nombre	Latitud	Longitud	Elevación (m.s.n.m.)
Pita	1,1PI	-0,608499	-78,404001	3817,07
Pita	1,2PI	-0,619687	-78,383113	3863,59
Pita	1,3PI	-0,596131	-78,452345	3788,20
Pita	1,4PI	-0,565322	-78,439000	3696,92
Pita	2,1PI	-0,471902	-78,436200	3322,67
Pita	2,2PI	-0,460177	-78,404679	3071,50
Pita	2,4PI	-0,485829	-78,434624	3261,32
Pita	3,1PI	-0,400242	-78,382614	2843
Pita	3,2PI	-0,400956	-78,383733	2844
Pita	3,4PI	-0,414716	-78,405623	2823,29
Pita	3,5PI	-0,329488	-78,419888	2600,00
Pita	SANTA CLARA	-0,347155	-78,427702	2556,57
San Pedro	1,1SP	-0,588220	-78,672676	3600,49
San Pedro	1,3SP	-0,609456	-78,677732	3553,57
San Pedro	1,4SP	-0,615521	-78,675125	3565,72
San Pedro	2,1SP	-0,565741	-78,573086	3192,00
San Pedro	2,5SP	-0,451513	-78,440328	3323,21
San Pedro	3,1SP	-0,423051	-78,519382	2786,05
San Pedro	3,2SP	-0,427860	-78,519453	2793,49
San Pedro	3,3SP	-0,407939	-78,439265	2872,52
San Pedro	SP1	-0,216752	-78,422523	2284,10
San Pedro	SP2	-0,264217	-78,452697	2386,00
San Pedro	SP3	-0,296142	-78,459882	2464,54
San Pedro	SP4	-0,309680	-78,454079	2473,38
San Pedro	SP5	-0,387971	-78,516861	2621,84
San Pedro	SP6	-0,484597	-78,545929	2815,99
San Pedro	SP7	-0,533825	-78,552438	2923,44
San Pedro	M8	-0,369505	-78,485541	2549,69
San Pedro	TAMB	-0,408202	-78,552868	2816,51
San Pedro	JAM	-0,572955	-78,594184	3161,38
Machángara	M1	-0,326552	-78,575515	3139,90
Machángara	M2	-0,253837	-78,524991	2824,53
Machángara	M3	-0,209099	-78,476567	2612,75
Machángara	M7	-0,012091	-78,440510	2341,70
Guayllabamba	M5	-0,068651	-78,373258	1944,50
Guayllabamba	M6	0,090336	-78,430443	1565,59
Guayllabamba	M9	0,237364	-78,751013	500,00

Los puntos de muestreo ubicados sobre el río Machángara (M1, M2, M3) tienen altitud desde los 3136 a 2341 m.s.n.m. y cruzan la ciudad de Quito recibiendo aportes de efluentes de alcantarillas y colectores de la ciudad. El punto M7 corresponde al río Monjas, consiste un aporte mayoritario de efluente municipal por lo que para el tratamiento estadístico de los resultados se junta con los puntos de Machángara. Los puntos sobre el río Guayllabamba (M5, M6 y M9) presentan altitudes desde los 2000 a los 500 m.s.n.m reciben las aguas de todos los ríos de la cuenca alta

4.2 Muestreo épocas lluviosa y seca

Antes de la recolección del agua de ríos se realizó un tratamiento preventivo con HCl al 1% a cada uno de los recipientes plegables plásticos empleados con la finalidad de realizar una hidrólisis ácida y consiguientemente desnaturalizar cualquier resto de material genético que pueda alterar los resultados (Prince & Andrus, 1992, p. 358). En el punto de muestreo se realizó un tratamiento final a los recipientes plásticos realizando varios lavados y enjuagues con la propia agua del río acondicionándolos previamente.

Se recolectó muestras de 10 litros en cada punto en los recipientes plegables acondicionados. Adicionalmente se colectaron 100 ml de agua por duplicado de río en recipientes estériles y se llevaron al laboratorio para su posterior análisis bacteriológico. En cada lugar de muestreo se midieron parámetros fisicoquímicos de pH, conductividad y sólidos totales disueltos (TDS) empleando un medidor de pH y concentración iónica (METTLER TOLEDO, Columbus, Estados Unidos).

4.3 Medición de la contaminación con indicadores bacterianos

Las muestras de 100 ml fueron destinadas para el análisis de indicadores bacterianos. Primeramente, la muestra se filtró en membranas de 0.45 μm (Millipore) empleando el sistema de filtrado *Vaccum Manifold Filtration System* (Proscitech, Townsville, Australia) con una bomba de vacío (Millipore, Billerica, Estados Unidos). La membrana se sembró en un medio sólido de agar cromogénico *Chromocult®* (MERCK) durante un mínimo de 18 h y se contaron

la cantidad de colonias de color violeta correspondientes a *E. coli* (β -galactosidasa positivas y β -glucuronidasa positivas) existentes en cada punto (APHA, 1999, pp. 1-12). Las muestras muy contaminadas se diluyeron en proporciones 1/10 o 1/100 según el impacto de la contaminación presente y se sembraron directamente 100 μ l en la placa de Petri.

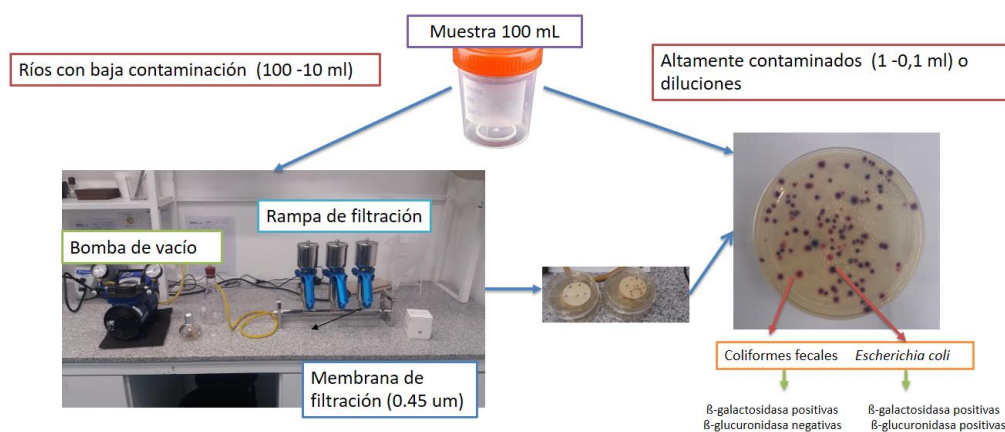


Figura 12. Procedimiento experimental realizado en el análisis de indicadores bacterianos.

4.4 Análisis de indicadores virales

Para el análisis de los indicadores virales, se procedió a una concentración de los 10 L de agua para obtener un concentrado final aproximado de 5 ml (Calgua et al., 2008, pp. 79-83). Posterior a dicha concentración se extrajo el material genético de los concentrados y finalmente se realizó el análisis molecular de los distintos indicadores virales mediante real-time PCR.

4.4.1 Concentración de muestras mediante el método floculación orgánica con leche descremada

Acondicionamiento de las muestras

Las muestras fueron procesadas en el área de análisis ambiental de los laboratorios de investigación de la Universidad de las Américas. Aquellas que presentaron gran cantidad de material en suspensión se dejaron sedimentar por un tiempo aproximado de 15 minutos para retirar sólidos grandes. El agua se transfirió a baldes rígidos para mejor manipulación y se aplicó agitación para homogenizar la muestra. Primeramente, se ajustó el pH de la muestra a 3,5 (± 0.1) mediante la adición de HCL 1N y a continuación, la conductividad se

incrementó con sales de mar artificiales grado analítico (SIGMA-ALDRICH) hasta 1,500 S/cm (Bofill-Mas et al., 2011, pp. 5-9).

Floculación

Una vez acondicionada la muestra se añadió un control positivo de proceso, en este caso, el bacteriófago MS2 a una concentración final de 10^3 ufp/ml. Para proceder a la floculación, se añadió un volumen de 100 ml de solución de leche pre-floculada (PSM) 1% w/w, grado analítico (Sigma-Aldrich), en los 10 litros de muestra acondicionada. Esta matriz proteica facilita la formación adecuada de flóculos que actuarán como una red de carga opuesta a la cápside de los virus, quedando adheridos a la matriz (Calgua et al., 2008, pp. 79-83). A continuación, se agitó durante 8 a 10 horas y finalmente se dejó reposar las 8 horas siguientes para fomentar la sedimentación gravitatoria de la materia orgánica que contiene los virus (Calgua et al., 2013, p. 84).

Extracción de concentrados

Se extrajo el líquido sobrenadante con cuidado de no levantar los flóculos sedimentados, dejando un volumen final aproximado de 250 a 500 ml. Este volumen se traspasó a tubos falcon (Corning) con capacidad de 50 ml, y se centrifugó a una velocidad de 4000 rpm por un tiempo de 40 minutos a 4°C. Al retirar los tubos de la centrifuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) inmediatamente se retiró todo el sobrenadante teniendo cuidado de no alterar el pellet. A continuación, este pellet se resuspendió con solución salina PBS en un volumen final promedio de 10 ml por muestra (Byron Calgua et al., 2013, p.84). Finalmente se neutralizó el pH 6 (± 1) con HCl 1 N antes de conservarlo a -80°C hasta su análisis molecular.

Control interno del proceso de concentración: análisis de infectividad

Para analizar el porcentaje de recuperación viral del proceso de concentración de virus por medio de floculación orgánica con leche descremada, se realizó un procedimiento de infectividad basado en el método de análisis de la calidad del agua mediante la detección y enumeración de bacteriófagos detallados en la ISO 10705-1 (ISO, 1995, pp. 1-15). Para realizar el proceso descrito se debe tomar una alícuota de 1 ml de concentrado (con MS2 previamente), aplicando de forma

directa y otra alícuota de 100 uL se disolverá en 900 uL de PBS. A continuación, se realizará un proceso de infección empleando la cepa control de *Salmonella* WG49, el mismo que consiste en mezclar 1 ml del concentrado obtenido, 1 ml de WG49 y 2,5 ml de medio de cultivo semi-sólido para bacterias (TGYA), y se hará crecer sobre una placa petri con medio sólido durante toda la noche, finalmente se contará la cantidad de unidades formadoras de placa (PFU) lo cual permitirá determinar el porcentaje de recuperación de virus del proceso de concentrado obtenido con respecto a los 10 L iniciales (ISO, 1995, pp. 1-15).

Los concentrados fueron almacenados a -80°C. El porcentaje de recuperación obtenido mediante la floculación orgánica se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación}(\%) = \frac{MS2_{output}}{MS2_{input}} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

En donde:

- MS2 output es la cantidad de PFU contadas en las placas
- MS2 input es la concentración teórica inicial de bacteriófago MS2 dopada en los 10 litros, (10^3 pfu/ml).

4.4.2 Procedimientos de Biología Molecular

Extracción de DNA viral (kit QIAamp® Viral RNA)

La extracción de ADN viral se realizó mediante el kit QIAamp® Viral RNA (QIAGEN, Hilden, Alemania), basado en columnas de sílica mediante el procedimiento definido por el fabricante con pequeñas modificaciones (anexo 1). Las muestras se tomaron a partir de los concentrados obtenidos al final del proceso de floculación orgánica, descrito anteriormente. El volumen de muestra empleado fue de 140 ul y el volumen final de elución de ADN fue de 80 ul. Las muestras fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis (QIAGEN, 2014, pp. 1-35). La extracción de ADN se realizó en un lugar destinado únicamente para este fin.

Cuantificación de los indicadores virales mediante PCR en tiempo real (qPCR).

La cuantificación de las copias genomas por litro (GC/ L) de cada indicador viral están basadas en estudios descritos previamente donde se optimizaron los procedimientos moleculares y secuencias genéticas empleadas (Tabla 6). Este procedimiento se realizó mediante el método de Taq Man® con el uso de Cebadores y sonda fluorogénica (Tabla 6) que reconocen secciones específicas del genoma de cada indicador viral.

Tabla 6.

Secuencias de cebadores empleados en el análisis molecular de indicadores virales.

Virus	Huésped		Secuencias (5' - 3')
Adenovirus Humano (HAdV)	Humano	Forward	CWTACATGCACATCKCSGG
		Reverse	CRCGGGCRAAYTGCACCAG
		Sonda	6-FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-BHQ1
Adenovirus Porcino (PAdV)	Porcino	Forward	AACGGCCGCTACTGCAAG
		Reverse	AGCAGCAGGCTCTTGAGG
		Sonda	6-FAM-CACATCCAGGTGCCGC-BHQ1
Polyomavirus Bovino (BPyV)	Bovinos	Forward	CTAGATCCTACCCTCAAGGGAAT
		Reverse	TTACTTGGATCTGGACACCAAC
		Sonda	6-FAM-GACAAAGATGGTGTGTATCCTGTTGA-BHQ1
Parvovirus Aviar (ChPV)	Aves	Forward	AGTCCACGAGATTGGCAACA
		Reverse	GCAGGTAAAGATTTTCACG
		Sonda	6-FAM-AATTATTCGAGATGGCGCCACG-BHQ1

Adaptado de (Bofill-mas et al., 2013)

Las reacciones de amplificación se ensamblaron en un área específica y restringida para el trabajo con muestras de ADN y ARN y amplificadas. Cada reacción de amplificación se preparó con un volumen final de 25 ul que contenía: 10 ul de muestra (DNA viral) y 15 ul de una *mix solution* que contó con volúmenes determinados de *environmental master mix 2x* (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) y una concentración específica de cebadores y sonda para cada indicador viral (Tabla 7). *Environmental master mix 2x* comercialmente posee

una concentración establecida de AmpliTaq Gold® DNA polimerasa, dNTPs con dUTP, buffers optimizados, y AmpErase® uracil-N-glycosylase.



Figura 13. Diagrama de reacciones realizadas en cada corrida de qPCR. En cada corrida se colocaron 4 puntos de estándares, 3 reacciones de muestras (1 directa y 2 diluciones -1) y dos non template control (NTC).

A continuación, se cargó las muestras en una sección separada destinada para la carga y manipulación de DNA para evitar contaminaciones. La reacción se llevó a cabo en un termociclador CFX96 *Real-time PCR System* (Bio-Rad, San Francisco, Estados Unidos). Cada corrida contó con al menos 3 puntos correspondientes a los estándares y 2 controles negativos (NTC) (Figura 13).

Tabla 7.

Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa, concentraciones de cebadores y sondas en la reacción.

VIRUS	Referencias	Concentración cebadores y sondas		Condiciones de PCR
HAdV	(Hernroth, 2002)	Forward	0,9 µM	10 min a 95 °C, 40 ciclos (15s a 95°C y 1 min a 60°C)
		Reverse	0,9 µM	
		Sonda	0,225 µM	
BPyV	(A Hundesa et al., 2009)	Forward	0,4 µM	10 min a 95°C, 45 ciclos (15s a 95°C, 30s a 60°C)
		Reverse	0,4 µM	
		Sonda	0,12 µM	
PAdV	(Hundesa et al., 2010)	Forward	0,9 µM	10 min a 95°C, 45 ciclos (15s a 95°C, 20s a 55°C y 20s a 60°C)
		Reverse	0,9 µM	
		Sonda	0,225 µM	
ChPV	(Carratalà et al., 2012)	Forward	0,3 µM	2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos (15s a 95°C, 1min a 60°C)
		Reverse	0,9 µM	
		Sonda	0,25 µM	

Las condiciones de las reacciones de PCR de cada indicador fueron específicas para cada indicador viral, considerando las condiciones optimizadas previamente en varias investigaciones establecidas en las referencias de la Tabla 7.

4.5 Análisis de resultados finales

Curva de calibrado:

Las curvas de calibrado realizadas en el presente trabajo consisten en el empleo estándares (anexo 2) con secuencias y concentraciones conocidas por cada indicador. Con la finalidad de establecer una recta patrón. Esta recta permitió traducir los valores de fluorescencia obtenidos en el termociclador, en valores de concentración de cada virus en GC/L, presentes en cada muestra (Griffith et al., 2013, pp. 50-61).

Para realizar las curvas de calibrado, se hizo diluciones de estándares de DNA (GBlocks), de 10^0 a 10^6 GC/10 μ l por triplicado empleando una pipeta destinada únicamente para este fin, y un área exclusiva que contenga UV para eliminar DNA y limpiar el material (Bofill-Mas et al., 2011, pp. 5-9). Estas diluciones fueron amplificadas con el mismo volumen correspondiente a la muestra, siguiendo los mismos pasos de ensamblaje y condiciones de PCR de cada indicador (Tabla 6) y (Tabla 7).

Para considerar aceptable una curva de calibrado estándar, la pendiente de la regresión de la curva debió encontrarse en el rango de -3.0 a -3.6 para que la eficiencia (E) sea lo más cercana posible al 100%. El valor de R^2 debió encontrarse en el rango de 1 a 0.9 y la intersección (y-Int) debe ser 40 ± 2 (Gaur, Gupta, Sharma, & Tuohy, 2016, pp. 722)

Para evitar variaciones provocadas por el error experimental y ambientales, en cada corrida se colocaron 4 reacciones de concentraciones conocidas (Figura 13), por duplicado. Después de cada corrida de PCR se analizó sus parámetros y en caso de no cumplir con lo establecido anteriormente, se optó por realizar el cálculo de las concentraciones a partir de la curva de calibrado de referencia.

Calculo de concentraciones

Los valores de Ct (*Threshold cycles*) obtenidos a partir de las reacciones de PCR en tiempo real, corresponden el número de ciclos que le tomó al equipo detectar la fluorescencia producida por la reacción, al sobrepasar el umbral (*Threshold*) ajustado por el *software* del equipo en cada corrida. A partir del Ct el software realiza automáticamente el cálculo de la concentración (GC/Rx), que corresponde a las concentraciones de cada indicador viral en copias genómicas detectadas en cada reacción. En el caso de que los valores no cumplan con los parámetros adecuados de una curva de calibrado y sean muy diferentes establecidos en (Gaur, Gupta, Sharma, & Tuohy, 2016, p. 722) se toma la ecuación obtenida en la curva de calibrado de cada indicador.

Determinando los valores (GC/Rx) corregidos mediante la siguiente Ecuación:

$$(GC/Rx) = \left(\left(\frac{E}{100}\right) + 1\right)^{(y-Int)-Ct} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

GC/Rx: Copias genómicas presentes en cada reacción de PCR.

E: Eficiencia de la reacción de PCR.

y – Int: Intersección en el eje Y, límite teórico de detección de Ct.

Ct: *Threshold cycles*

Una vez obtenidos los valores de (GC/Rx) es necesario conocer si la presencia de inhibidores de PCR se encuentran afectando los resultados obtenidos. Este es un problema común en muestras ambientales debido a la complejidad de las matrices orgánicas junto con la interferencia de químicos y contaminantes. Para poder valorar la inhibición presente en cada muestra se ha procedido al cálculo del factor de inhibición considerando la señal de la reacción de qPCR para la muestra directa y diluida 1:10 (Figura 13), mediante la siguiente ecuación:

$$\text{valor de inhibición} = \frac{(GC/Rx)directas}{promedio\left(\frac{GC}{Rx}\right)_{1:10}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

$(GC/Rx)directas$: Copias genómicas presentes en cada reacción de PCR colocadas directamente desde el concentrado.

$\left(\frac{GC}{Rx}\right)_{1:10}$: Copias genómicas presentes en cada reacción de PCR, diluidas a un factor 1:10, colocadas por duplicado en cada corrida.

El valor de inhibición permite conocer el estado de inhibición en el que se encuentra la muestra. Para considerar una muestra como no inhibida es necesario que este parámetro se encuentre en el rango de 10 a 5. Si el valor de inhibición es inferior a 5 se elimina el valor de (GC/Rx) directa y se considera solamente las diluciones. En el caso de que sea mayor a 10 se eliminan valores anormales generados producto del error experimental.

A continuación, se procede con el cálculo del promedio de los valores de CG/Rx , que se hayan calculado con los parámetros adecuados de curva de calibrado, que no posean inhibición y que se haya corrigiendo el factor de dilución aplicado (1:10), para establecer el valor $prom.(CG/Rx)$.

Finalmente, se realizó el cálculo de los valores finales de concentración (GC/L) de cada virus presente en cada litro de río muestreado, mediante la siguiente fórmula.

$$X(CG/L) = \frac{7.14 \times Vt \times 8 \times prom.(CG/Rx)}{10l} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

$prom.(CG/Rx)$: promedio de los valores de (CG/Rx) corregidos.

Vt = cantidad de ml concentrados en cada muestra

7,14 = constante relacionada a la cantidad de GC en 1 ml de concentrado $\left(\frac{140ul}{1000ul}\right)$

8 = constante relacionada a la cantidad de GC presentes en 80 ul $\left(\frac{80ul}{10ul}\right)$

10 l = volumen total muestreado

Análisis geográfico y estadístico de los resultados.

Los resultados fueron analizados mediante pruebas de normalidad Shapiro-Wilk, con el objetivo de conocer la normalidad de la distribución de los datos, y establecer el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas. Se utilizó la prueba de Wilcoxon para determinar diferencias significativas entre época lluviosa y seca. Además, se realizó pruebas de Rho de Spearman para determinar correlaciones existentes entre indicadores, altitud y los valores de indicadores. El análisis estadístico se realizó aplicando el software SPSS versión 23 (IBM Statistics, 2015).

Para la realización de los mapas geográficos de cada cuenca se empleó el software de sistemas de información geográfica ArcGIS 10.5 (ESRI, 2016). La capa empleada para la ubicación de lugares poblados se tomó de la información del INEC colocada en la web acerca del censo del año 2010 (INEC, 2010). El uso de suelo se relacionó con la concentración de indicadores virales para establecer los patrones espaciales, la información se extrajo de los datos disponibles en la página web de la Secretaría Nacional de Información del Ecuador.

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Porcentajes de recuperación de virus mediante el método de concentración con leche descremada

Los porcentajes de recuperación promedio de MS2 obtenidos en época lluviosa fue de 14.88% mientras que en invierno fue de 18.41% por lo que las épocas climáticas no influyeron considerablemente en los porcentajes de recuperación viral (Tabla 8). Sin embargo, los porcentajes de recuperación viral usando el método de infectividad son muy dispersos (Tabla 8). El valor de recuperación mínimo es de 0%, mientras que el máximo es 155%.

Este resultado revela que, debido a la alta variabilidad en los porcentajes de recuperación viral, la infectividad no es un control confiable para extrapolar la cantidad de MS2 en los concentrados con el resto de indicadores virales

presentes en la muestra. A pesar de que durante todo el procedimiento experimental se empleó el mismo stock de bacteriófago MS2 a la misma concentración y volumen para todas las muestras.

Tabla 8.

Porcentajes de recuperación de muestras mediante el método de concentración por floculación orgánica con leche descremada

	N° muestras	PFU inoculado	Porcentaje Máximo	Porcentaje Mínimo	Porcentaje Promedio
Época lluviosa	37		155%	0%	14.88%
Época seca	37	10 ³ pfu/ml	112%	0%	18.41%
Total	74		155%	0%	16.64%

Considerando los factores ambientales y la complejidad de los contaminantes presentes de la cuenca del río Guayllabamba, la existencia de porcentajes de recuperación viral de 100% y superiores, son poco probables. Mediante un análisis se determinó que esto es debido a la interferencia de bacteriófagos propios de la muestra previo a la colocación de MS2 en el laboratorio. Estudios realizados sobre el viroma de las aguas residuales urbanas sin tratamiento muestran que del total de virus, al menos el 80% son bacteriófagos y la mitad infectan específicamente enterobacterias como la *Salmonella* WG49 empleada en el proceso de infectividad (Cantalupo et al., 2011, pp. 1-11).

Las características complejas en la matriz orgánica del río, pueden abarcar inhibidores químicos y microbiológicos que afectan la replicación de los bacteriófagos en el medio de cultivo cromogénico, haciendo que los porcentajes de recuperación viral disminuyan drásticamente (Calgua et al., 2008, pp. 79-83). Otros factores importantes son las condiciones de temperatura, humedad y operadores que pueden introducir errores experimentales y afectar la eficiencia de la concentración (Gonzales-Gustavson et al., 2017, pp. 46-53). Para evitar al máximo la interferencia de estos factores todo el procedimiento se realizó en el mismo lugar y el mismo operador para todas las muestras.

Existen estudios en los que los porcentajes de recuperación de MS2 son altos, pero esto se debe a que la matriz analizada no tiene la misma complejidad que los ríos con elevados aportes de contaminación química y microbiológica (Byron Calgua et al., 2013, p. 135). Por otro lado, el porcentaje de recuperación viral medido por el método de infectividad de MS2 en cultivo celular siempre resulta inferior que cuando se cuantifica directamente por qPCR (Gonzales-Gustavson et al., 2017, pp. 46-53).

A pesar de ser recomendable contar con un control de la concentración viral; MS2 no es la mejor alternativa para puntos de muestreo con matrices heterogéneas como las encontradas en la cuenca estudiada. Además, virus como HAdV son más resistentes que MS2 en condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad por lo que el método de concentración orgánica empleado no es efectivo ya que inhibe la capacidad infectiva de bacteriófagos en cultivo (Ogorzaly, Bertrand, Paris, Maul, & Gantzer, 2010, pp. 8019-8025).

5.2 Curvas de calibrado de cada indicador

Las curvas de calibrado de los estándares de cada indicador presentaron pendientes entre -3.287 y -3.615, eficiencias de 89.1% - 101.5% y R^2 de 0.990 a 0.997 (Figura 14). Estos valores cumplieron con los criterios y rangos propuestos en la metodología (Botteldoorn et al., 2006, pp. 125-135; Gaur et al., 2016, pp. 722). Los criterios de las curvas de calibrado son importantes ya que representan un nivel de confianza en la obtención de los resultados mediante métodos de qPCR.

La eficiencia más baja (89,1%), no es significativamente menor a lo establecido, puede ser causada por concentraciones incorrectas de cebadores o parámetros de reacción ineficientes (Gaur et al., 2016, p. 722). Cabe resaltar que estos ensayos han sido realizados a 2800 msnm y los protocolos fueron diseñados a 0 msnm, pudiendo afectar al rendimiento de la reacción.

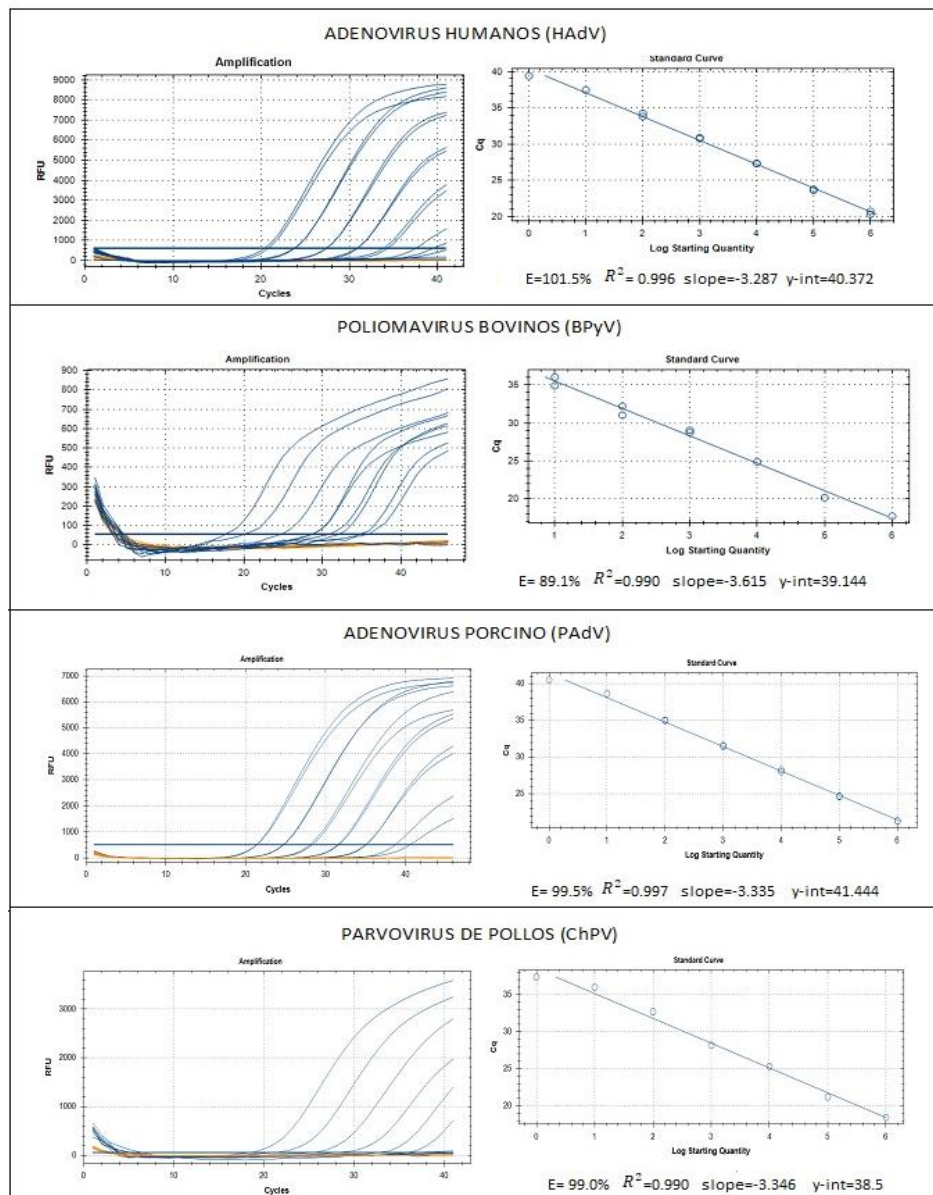


Figura 14. Resultados qPCR de estándares de cada indicador. Curvas de amplificación (Izquierda). Curvas de calibrado con parámetros obtenidos (Derecha).

5.3 Detección de la presencia de contaminación fecal mediante indicadores de contaminación

El indicador bacteriano, *E. coli*, se detectó en el 98,64% de las muestras evaluadas (73/74), encontrando que el 62,16% de los puntos muestreados en las dos temporadas poseen valores superiores a los de la norma nacional para uso agrícola, 10000 Cfu/L (MAE, 2015, pp. 1-15) y el 56,76% de muestras

sobrepasan el límite de descarga a un cuerpo de agua dulce, 20000 Cfu/L (MAE, 2015, pp. 1-15), en al menos una de las dos temporadas de muestreo. Este hallazgo concuerda con información previa que establece que la mayor parte de la cuenca del río Guayllabamba incumple la norma para usos domésticos y/o agropecuarios (FLACSO-Ecuador, 2011, pp. 30-35).

E. coli es un indicador muy sensible, ya que aparece en todos los puntos y épocas de estudio, con excepción del punto 1.3 PI en época seca (Tabla 9). Este punto se encuentra en el nacimiento del río Pita dentro del parque nacional Cotopaxi. En el resto de puntos, la presencia de bacterias en el ambiente es persistente, aun en aguas de páramo, en donde no existen ciudades ni poblados alrededor. La principal explicación de la presencia de *E. coli* en este entorno es debido a que este microorganismo puede habitar en el tracto gastrointestinal de todo tipo de animales de sangre caliente que habitan en la zona (Wu, Rees, & Dorner, 2011, pp. 94-106).

Los puntos que presentan mayores niveles de *E. coli* son M2 (2,90E+07 Cfu/L) y M3 (2,93E+07 Cfu/L) en época de verano, sobre el río Machángara. La cuenca alta del río Guayllabamba con un área de 4.7 mil Km² y una población aproximada a los 3 millones de habitantes, posee niveles de contaminación 84 veces mayores que los puntos de mayor contaminación fecal encontrados en la cuenca del río Danubio (max. 3,45E+05 Cfu/L) (Kirschner et al., 2017, pp. 543-555). Sorprendentemente el río Danubio posee una cuenca con un área de 817 mil Km², cruza a través de 19 países europeos y tiene una población de 80 millones de habitantes (ICPDR, 2009, pp. 1-15). Los factores que claramente influyen en que los niveles observados en la cuenca del Danubio sean menores son: el tamaño de los caudales, la geografía y sobre todo la presencia de plantas de tratamiento de aguas residuales en cada uno de los principales centros poblados (Kirschner et al., 2017, pp. 543-555).

Tabla 9.

Resultados en época lluviosa y seca de *E.coli* (*EcoliW*, *EcoliD*), *Adenovirus humanos* (*HAdVW*, *HAdVD*), *Poliomavirus bovinos* (*BPyVW*, *BPyVD*), *Adenovirus porcino* (*PAdVW*, *PAdVD*), *Parvovirus de pollos* (*ChPVW*, *ChPVD*), Valores no detectados (ND), Copias genómicas por litro (GC/L), Unidades formadoras de colonias por litro (Cfu/L).

Río	Nombre	EcoliW (Cfu/L)	EcoliD (Cfu/L)	HAdVW (GC/L)	HAdVD (GC/L)	BPyVW (GC/L)	BPyVD (GC/L)	PAdVW (GC/L)	PAdVD (GC/L)	ChPVW (GC/L)	ChPVD (GC/L)
Pita	1,1PI	3,00E+02	4,60E+02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,2PI	4,00E+01	1,40E+02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,3PI	1,30E+02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,4PI	3,90E+02	1,20E+02	ND	ND	ND	2,90E+03	ND	ND	ND	ND
	2,1PI	4,30E+02	1,00E+01	ND	ND	ND	1,16E+04	ND	ND	ND	ND
	2,2PI	2,27E+03	4,58E+03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2,4PI	5,30E+02	1,30E+02	ND	ND	ND	1,42E+04	ND	ND	ND	ND
	3,1PI	5,16E+03	5,19E+03	ND	5,15E+01	3,73E+02	ND	ND	1,22E+03	ND	ND
	3,2PI	3,64E+03	5,35E+02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3,4PI	2,74E+03	3,20E+02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3,5PI	4,96E+04	4,36E+04	2,48E+01	1,05E+03	ND	ND	5,30E+02	ND	ND	ND
	SANTA CLARA	9,08E+04	6,59E+04	1,77E+03	5,48E+03	ND	2,64E+04	ND	4,37E+02	ND	3,18E+02
	Promedio positivos	1,30E+04 12/12	1,01E+04 11/12	8,96E+02 2/12	2,20E+03 3/12	3,73E+02 1/12	1,38E+04 4/12	5,30E+02 1/12	5,53E+02 2/12	0,00E+00 0/12	3,18E+02 1/12
San Pedro	1,1SP	3,20E+02	8,00E+02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,3SP	4,00E+01	6,80E+02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1,4SP	2,70E+02	2,34E+04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2,1SP	7,20E+04	2,35E+02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2,5SP	1,50E+02	1,02E+04	ND	3,36E+01	1,11E+03	3,05E+03	ND	ND	ND	ND
	3,1SP	1,68E+04	6,30E+03	ND	ND	1,29E+04	3,03E+03	ND	ND	ND	ND
	3,2SP	8,80E+02	2,80E+02	ND	5,05E+01	ND	3,26E+03	ND	ND	ND	ND
	3,3SP	2,00E+03	9,00E+03	ND	2,66E+02	ND	7,39E+03	ND	ND	ND	ND
	SP1	1,44E+03	1,98E+06	7,33E+03	3,69E+05	7,31E+05	3,28E+03	4,88E+03	4,90E+03	1,61E+02	ND
	SP2	8,70E+05	5,75E+05	8,90E+02	1,41E+05	2,20E+04	1,32E+04	5,28E+02	3,81E+03	ND	1,27E+03
	SP3	2,33E+05	1,80E+06	2,67E+03	2,14E+05	4,11E+04	4,52E+02	1,49E+03	2,08E+02	ND	6,91E+01
	SP4	9,10E+05	1,04E+06	2,51E+03	2,61E+05	3,54E+03	7,21E+05	ND	4,56E+03	7,25E+01	1,10E+03
	SP5	3,10E+05	2,71E+05	1,43E+04	2,64E+04	3,61E+04	1,00E+05	8,88E+02	4,62E+03	1,86E+03	1,91E+03
SP6	6,96E+04	1,17E+05	1,75E+04	6,92E+05	7,15E+03	3,33E+03	7,71E+02	ND	3,21E+02	2,50E+01	
SP7	4,08E+04	1,11E+04	5,55E+04	3,44E+03	9,22E+03	ND	ND	ND	4,09E+02	ND	
M8	2,92E+05	8,30E+05	3,80E+03	8,01E+04	1,05E+05	4,13E+05	1,51E+04	9,07E+03	1,65E+03	6,28E+02	
TAMB	5,40E+04	2,25E+03	ND	3,10E+03	9,88E+02	ND	ND	ND	ND	ND	
JAM	1,33E+05	5,70E+04	3,38E+01	6,40E+02	9,51E+06	1,17E+03	ND	4,00E+02	ND	ND	
Promedio positivos	1,67E+05 18/18	3,74E+05 18/18	1,16E+04 9/18	1,38E+05 13/18	8,74E+05 12/18	1,06E+05 12/18	3,94E+03 6/18	3,94E+03 7/18	7,47E+02 6/18	8,33E+02 5/18	

Tabla 10.

Tabla descriptiva de resultados obtenidos considerando el río de procedencia y el nombre del punto, Resultados en época lluviosa y seca de E.coli (EcoliW, EcoliD), Adenovirus humanos (HAdVW, HAdVD), Poliomavirus bovinos (BPyVW, BPyVD), Adenovirus porcino (PAdVW, PAdVD), Parvovirus de pollos (ChPVW, ChPVD), Valores no detectados (ND), Copias genómicas por litro (GC/L), Unidades formadoras de colonias por litro (Cfu/L). Con fines estadísticos y de cálculos el punto sobre el río monjas se agrupó junto con los del río Machángara, ya que ambos ríos poseen una alta influencia de la contaminación urbana.

Río	Nombre	EcoliW (Cfu/L)	EcoliD (Cfu/L)	HAdVW (GC/L)	HAdVD (GC/L)	BPyVW (GC/L)	BPyVD (GC/L)	PAdVW (GC/L)	PAdVD (GC/L)	ChPVW (GC/L)	ChPVD (GC/L)
Monjas	M7	2,27E+07	2,43E+07	7,27E+05	4,15E+05	2,62E+03	ND	4,23E+03	2,12E+03	1,69E+03	1,35E+02
	M1	8,80E+05	9,30E+05	9,25E+03	2,43E+06	ND	ND	1,51E+03	1,87E+03	ND	ND
Machángara	M2	2,25E+07	2,90E+07	2,48E+06	1,57E+06	1,61E+03	ND	7,32E+03	1,24E+04	1,28E+03	1,19E+04
	M3	1,96E+07	2,93E+07	3,78E+06	1,74E+06	3,03E+04	2,73E+02	8,95E+03	2,76E+03	3,46E+03	4,81E+02
	Promedio	1,64E+07	2,09E+07	1,75E+06	1,54E+06	1,15E+04	2,73E+02	5,50E+03	4,80E+03	2,14E+03	4,17E+03
	Positivos	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	¼	4/4	4/4	3/4	3/4
Guayllabamba	M5	1,10E+06	3,90E+06	1,11E+02	5,79E+05	ND	3,23E+03	1,25E+04	4,01E+03	ND	7,71E+03
	M6	1,60E+06	9,35E+05	3,02E+04	3,53E+05	2,04E+03	2,71E+03	7,92E+02	2,50E+03	5,34E+03	1,27E+02
	M9	2,92E+05	2,80E+03	3,49E+05	2,77E+05	7,53E+01	9,87E+03	3,78E+02	1,73E+03	7,37E+03	2,29E+02
	Promedio	9,97E+05	1,61E+06	1,89E+05	3,15E+05	1,06E+03	6,29E+03	5,85E+02	2,11E+03	6,35E+03	1,78E+02
	Positivos	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3

En vista de que *E. coli* no aporta información acerca del origen de la contaminación fecal, hasta el momento no ha sido posible cuantificar la dimensión de los aportes tanto humanos o de la crianza de animales, en la contaminación de la Cuenca Alta del río Guayllabamba.

La presencia de adenovirus humanos (HAdV, indicador viral específico de la contaminación humana), se detectó en 41 de 74 muestras evaluadas, representando un porcentaje de detección del 55,40%. La muestra con mayor concentración viral fue en el punto M3 (3,78E+06 GC/L), ubicado en las cercanías del barrio de La Floresta y La Vicentina, donde se concentra la contaminación fecal proveniente de las zonas con mayor densidad poblacional del sur y centro de la ciudad.

Este indicador se mantiene elevado tras su paso por zonas pobladas, debido al aporte constante del sistema de alcantarillado que vierte al ambiente aguas residuales sin un tratamiento previo. En contraste, los indicadores de contaminación animal (BPyV, PAdV y ChPV) no muestran un comportamiento constante y aparecen en casos puntuales (*Tabla 9*), esto puede ser debido a que granjas y haciendas lecheras no poseen conexión con ningún tipo de alcantarillado, los restos de heces de animales están en el ambiente y debido a la escorrentía superficial llegan a los cauces naturales.

Existen sectores donde los ríos que conforman la cuenca del río Guayllabamba, por su olor y apariencia se asemejan a una cloaca verdadera. A pesar de que las quebradas en la Cuenca del río Guayllabamba tradicionalmente han sido un desfogue de aguas residuales no se ha contemplado que, con el crecimiento de la población, los niveles de la contaminación humana en los ríos están llegando a niveles observados en aguas residuales crudas.

Podemos comparar los niveles obtenidos en la cuenca del Guayllabamba, con el rango de mediciones de HAdV de la planta de tratamiento de aguas residuales de Auckland en Nueva Zelanda ($1,87E+04$ GC/L - $4,6E+06$ GC/L), con una población cercana a la de Quito (Dong, Kim, & Lewis, 2010, pp. 800-809). Se puede notar que el 27% de todas las muestras (20/74) de todos los puntos analizados en las dos épocas en los ríos de la cuenca del Guayllabamba, se encuentran dentro de este rango.

El río Negro, con un caudal medio de 29 mil m^3/s , tras su paso por la ciudad de Manaus (2 millones de hab.) queda contaminado con niveles de HAdV de $1E+04$ GC/L a $1E+07$ GC/L (Vieira et al., 2016, pp. 57-69). A pesar de que el río Guayllabamba no es un río tan caudaloso como el río Negro, la falta de plantas de tratamiento de aguas residuales muestra que en ambos casos comprueba que los niveles superiores a $4 \log_{10}$ corresponden a aguas altamente contaminadas. Estos altos niveles muestran relación con los principales agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales en Manaus (Vieira et al., 2016, pp. 57-69), y pueden ser una causa recurrente también en los poblados asentados sobre la cuenca del Río Guayllabamba y la ciudad de Esmeraldas que

recibe, aunque diluidos, todas las aguas residuales sin tratamiento de las ciudades de la cordillera.

La contaminación fecal de origen animal es una fuente de contaminación más silenciosa y menos estudiada. Sin embargo, en la cuenca del río Guayllabamba puede estar siendo subestimada a pesar de llegar a valores que en otros contextos son considerados alarmantes.

En el caso de poliomavirus bovinos (BPyV) el punto JAM es el de más alta concentración en la época de invierno con $9,51E+06$ GC/L, este punto se encuentra en el cantón Mejía, en una zona que tradicionalmente se dedica a la crianza ganadera para producción lechera (Vizcarra, Lasso, & Tapia, 2015, p. 55).

A pesar de que los puntos muestreados a lo largo de los centros urbanos de la cuenca alta del río Guayllabamba poseen principalmente zonas residenciales, la presencia de este indicador puede ser atribuido a camales regulares y clandestinos y a un efecto de arrastre de corriente aguas arriba. Frente a esto se puede comprobar que el empleo de BPyV como indicador de la contaminación fecal bovina en los ríos es sensible y específico, en cualquier contexto geográfico. Otros casos en los que se ha comprobado la alta eficiencia y confiabilidad de este indicador es en el río Negro en Brasil ($1E+01$ GC/L - $1E+02$ GC/L), río Glafkos en Grecia ($1E+04$ GC/L), en el río Llobregat en Cataluña ($1E+03$ GC/L), logrando la identificación cuantificación de este indicador (Rusiñol et al., 2014, pp. 119-129).

Por otra parte, se determinó que los niveles más contaminados presentes en la cuenca del río Guayllabamba ($9,51E+06$ GC/L) son mayores a los encontrados en aguas residuales de granjas en Szolnok, Hungría ($2,4 E+06$ GC/L) (Rusiñol et al., 2014, pp. 119-129). Esta zona de 75000 habitantes se dedica principalmente de la ganadería y los desechos de las principales granjas y de la población son conducidas a una planta de tratamiento de aguas residuales con lodos activados. Este hecho revela la urgencia de considerar en la cuenca del Guayllabamba, la generación de normativas que impulsen la creación de normas adecuadas que fomenten la interconexión de efluentes de distintas granjas

mediante un alcantarillado único para residuos animales con la finalidad de disminuir la carga viral en ríos y las enfermedades transmitidas por el agua a los animales.

Con respecto al indicador de la contaminación fecal de cerdos, adenovirus porcino, fue detectado en 30 muestras de 74 evaluadas (40,5% de los sitios). El punto que presentó una mayor concentración de PAdV, fue M8 con $1,51E+04$ GC/L.

La concentración de PAdV en la cuenca del río Guayllabamba es menor que la observada en los indicadores bovinos en vista de que la crianza de vacas en la cuenca es de altura y principalmente para obtener leche y no carne como con los cerdos. La concentración de PAdV es inferior con al menos 3 logaritmos a la encontrada en Szolnok, Hungría (2.7 and $1.4 E+07$ GC/L), que si posee granjas que se dedican a gran escala a la crianza de porcinos, los efluentes de estas granjas son conducidos a plantas de tratamiento en donde después del tratamiento secundario son liberados al río Tisza (Rusiñol et al., 2014, pp. 119-129).

La contaminación fecal producida por la crianza de pollos fue evaluada mediante el indicador viral parvovirus de pollos, este indicador fue detectado en 24 de las 74 muestras analizadas (32.43% de las muestras). La muestra con mayor concentración se encontró en el río Machángara, M2 ($1,19E+04$ GC/L), este corresponde una zona altamente urbanizada del sur de Quito, en el sector de El Recreo. Al igual que en otras ciudades, los indicadores de pollos han sido encontrados con frecuencia en aguas residuales urbanas, debido a que son animales que han experimentado a través de los años procesos de domesticación. La concentración de ChPV encontradas en las aguas residuales urbanas encontrados por Carratala A. y colaboradores, en la ciudad de Barcelona, Cataluña ($2,65E+05$ GC/L) (Carratalà et al., 2012, pp. 7496-7499), son apenas un logaritmo mayores que los encontrados en la cuenca del río Guayllabamba.

5.4 Diferencias debido a la variable climática (Estación Lluviosa – Seca)

- Prueba de normalidad

Con la finalidad de determinar diferencias estadísticas entre época seca y época lluviosa se aplicó la correspondiente prueba de normalidad Shapiro-Wilk, en donde podemos observar en todos los casos un p value < 0.05 y el estadístico en la mayoría de los casos cercanos a cero, concluyendo que los datos no se ajustan a una distribución normal.

Esto plantea la necesidad de determinar las diferencias significativas mediante una prueba no paramétrica.

Tabla 11.

Resultado de las pruebas de normalidad aplicadas, Kolmogorov-Smirnov y Shapiro- Wilk, con un valor de significancia del 5%.

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	GI	p-value	Estadístico	GI	p-value
EcoliW	0,448	37	0,000	0,352	37	0,000
EcoliD	0,423	37	0,000	0,371	37	0,000
HAdVW	0,471	37	0,000	0,308	37	0,000
HAdVD	0,324	37	0,000	0,527	37	0,000
BPyVW	0,492	37	0,000	0,178	37	0,000
BPyVD	0,457	37	0,000	0,296	37	0,000
PAdVW	0,364	37	0,000	0,522	37	0,000
PAdVD	0,303	37	0,000	0,629	37	0,000
ChPVW	0,375	37	0,000	0,474	37	0,000
ChPVD	0,380	37	0,000	0,342	37	0,000

- Determinación de diferencias significativas entre época seca y época lluviosa

Lo resultados de la prueba no paramétrica con signo de valores pareados de Wilcoxon muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los indicadores evaluados con respecto a época seca y época lluviosa ($p > 0.05$) (Tabla 12). Esto quiere decir que los indicadores se mantienen

persistentes y en concentraciones similares sin importar la estacionalidad pluvial. El valor p más bajo ($p=0.078$) lo obtuvieron los indicadores de adenovirus humanos (HAdV), evidenciando que este indicador presenta un comportamiento distinto entre épocas climáticas, aunque no de manera significativa.

Al realizar el análisis por cuenca si existió diferencias significativas para HAdV únicamente en la cuenca del río San Pedro ($p=0.007$). En este río el promedio de la contaminación humana durante el periodo de época seca ($9,95E+04$) fue 17 veces mayor al de época lluviosa ($5,81E+03$), además se detectó este indicador específico de humanos en 4 puntos en época seca que en la época lluviosa no fueron detectados.

Tabla 12.

Resultados de la prueba no paramétrica de Wilcoxon para la determinación de diferencias significativas, con un grado de significancia del 5% a los resultados de la contaminación fecal obtenidas.

		<i>E. coli</i> W-D	HAdV W-D	BPyV W-D	PAdV W-D	ChPV W-D
Total	Estadístico Z	-0,641	-1,764	-0,283	-0,196	-0,341
	p – value	0,521	0,078	0,778	0,845	0,733
Pita	Estadístico Z	-1,883	-1,604	-1,753	-0,535	-1
	p – value	0,06	0,109	0,08	0,593	0,317
San Pedro	Estadístico Z	-0,414	-2,691	-0,596	-0,42	0
	p – value	0,679	0,007	0,551	0,674	1
Machángara	Estadístico Z	-1,826	-0,365	-1,604	-0,365	0
	p – value	0,068	0,715	0,109	0,715	1
Guayllabamba	Estadístico Z	0	-1,069	-1,604	0	0
	p – value	1	0,285	0,109	1	1

La baja de caudales es un factor que afecta los niveles de contaminación generando mayor concentración de materia fecal proveniente de las poblaciones que habitan a lo largo del cauce del río San Pedro. Este problema no se observa en el río Machángara que desde su inicio únicamente recibe los aportes del alcantarillado de Quito, que posee colectores que manejan el vertido de caudales constantes. Es por esto que en épocas secas los niveles promedio de adenovirus humanos ($1,0522E+06$) no mostraron diferencias con respecto a los

niveles en épocas lluviosas ($1,0538E+06$). Este hecho favorece a programas de manejo de descontaminación a futuro debido a que el sistema se encuentra interconectado y entre épocas no existe diferencias en los niveles de contaminación difusa.

La cuenca del río Guayllabamba posee características únicas por su ubicación, siendo una cuenca impactada por las labores agropecuarias, y por sectores altamente urbanizados. Poliomavirus bovinos (BPyV) posee una detección de 48% en épocas de lluvias mientras que muestran un 54% en épocas secas. Sin embargo, el promedio de la concentración del indicador BPyV durante época de lluvias ($2,84E+05$) fue 7,83 veces mayor que la época seca ($3,63E+04$). Esto demuestra claramente que este aumento puede deberse a la escorrentía superficial de los terrenos destinados al pastoreo de vacas. Los indicadores Porcino y Aviares no mostraron diferencias en sus valores promedio en vista de que su crianza no se realiza al aire libre como la crianza de ganado bovino. LA crianza porcina y aviar están más relacionadas a los centros urbanos, lo que limita la entrada por escorrentía.

En países que poseen las 4 estaciones del año, los factores climáticos son extremos en distintas épocas. Esto ha revelado que la concentración de virus cambie de acuerdo a parámetros climáticos. Un estudio mostró la asociación entre la disminución de la concentración de los virus en ríos y con la radiación y temperaturas de las épocas secas de verano en el río Moselle, que cruza a través de Alemania, Luxemburgo y Francia (Skraber, Gassilloud, Schwartzbrod, & Gantzer, 2004, pp. 2927-2933). Mientras que, en una investigación realizada en el río Milwaukee, Wisconsin, que posee un área rural destinada a la ganadería y una zona altamente poblada a orillas del lago Michigan, tanto virus humanos como bovinos presentaron mayores concentraciones en épocas de lluvia, atribuyendo este efecto al aumento de la escorrentía superficial (Corsi et al., 2014, pp. 849-860).

Los parámetros climáticos en la cuenca del Guayllabamba son totalmente diferentes. Las faltas de estaciones marcadas hacen que con independencia de los meses del año se registren niveles altos y bajos de precipitación, con una

variación promedio en las precipitaciones de 167 mm entre la época seca y lluviosa. Los niveles de radiación en el Ecuador son altos durante todo el año por su ubicación geográfica y las temperaturas no cambian drásticamente. Estos factores mencionados pueden contribuir a la ausencia de diferencias significativas entre época seco y lluviosa.

La falta de diferencias estadísticamente significativas provocada por la estacionalidad pluvial en la evaluación de indicadores virales en zonas urbanas como agrícolas ha sido documentada en varias investigaciones previas, (Choi & Jiang, 2005; Corsi, Borchardt, Spencer, Hughes, & Baldwin, 2014, pp. 7426-33), (Corsi et al., 2014, pp. 849-860) y (Rusiñol et al., 2014, pp. 119-129).

Con la finalidad de elaborar planes efectivos de descontaminación y plantas de tratamiento de aguas residuales con tratamientos efectivos, es necesario conocer el efecto que tiene las condiciones ambientales como las lluvias sobre la presencia contaminación fecal en los ríos. Se debe considerar que en épocas lluviosas existe una contaminación proveniente de la escorrentía superficial que no se encuentra conectada al alcantarillado, pero de todas maneras requiere tratamiento. La protección y respeto de los bosques de ribera permitirá contener la contaminación que llega a los ríos por medio de la escorrentía superficial.

5.5 Patrones espaciales de la contaminación fecal en la cuenca

- Análisis de Altitud

Para determinar la correlación existente entre la altitud y la presencia de cada uno de los indicadores se aplicó la prueba no paramétrica de Rho de Spearman. Los resultados indican que si existe una correlación estadística ($p\text{-value} < 0.01$) entre todos los indicadores y la altura (Tabla 13). Los valores de correlación son negativos en vista de que la contaminación incrementa conforme disminuye la altura, es decir debido al paso de los ríos por zonas con impactos antropogénicos.

E. coli, es el indicador que muestra la mayor correlación estadística con respecto a la altura (Coeficiente de correlación= -0.718), seguido por adenovirus humanos

(- 0.682). Estos resultados comprueban que al disminuir la altitud los ríos acumulan la contaminación fecal recibida a lo largo del cauce, y sobre todo la correlación entre la contaminación y la aparición de poblados en la cuenca que crecen conforme disminuye las altitudes.

Tabla 13.

Resultado de la prueba no paramétrica de Rho de Spearman para determinar la correlación existente entre la altura y los niveles de contaminación encontrados en los puntos de estudio.

		<i>E. coli</i>	HAdV	BPyV	PAdV	ChPV
Rho de Spearman	Coefficiente de correlación	-0,718**	-0,682**	-0,482**	-0,656**	-0,601**
	p-value	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N. muestras	74	74	74	74	74

Nota: Correlación significativa en el nivel 0,01 unilateral. (**)

La provincia de Pichincha es la segunda con mayor población del país, según el Instituto nacional de estadísticas y censos (INEC, 2010) Se considera que para el año 2018 la población de la provincia será de 3,11 millones de habitantes. Esta provincia tiene distribuidas zonas pobladas en alturas que van desde los 4790 m.s.n.m hasta los 500 m.s.n.m, que conforme disminuye la altitud se puede ver un incremento de la población hasta la ciudad de Quito (2850 m.s.n.m) y Sangolquí (2500 m.s.n.m) que son los sectores más poblados. Los niveles más altos de *E. coli*, HAdV, PAdV y ChPV detectados se encuentran en este rango altitudinal en que se encuentran Quito y Sangolquí (Figura 15).

La producción de porcinos y aves se encuentra en su mayoría en lugares donde habitan seres humanos, esto se puede ver reflejado en la mayor correlación que presentan los indicadores frente a la altura -0.656, (Figura 15). La provincia de Pichincha según el último censo de producción avícola realizado por el ministerio de agricultura y ganadería (MAG) es la que posee mayor cantidad de granjas que se dedican a esta actividad, por lo que es la que más desechos genera (MAGAP, 2016). En cuanto a la industria porcina Pichincha esta por detrás de los principales productores que son Guayas y Santo Domingo.

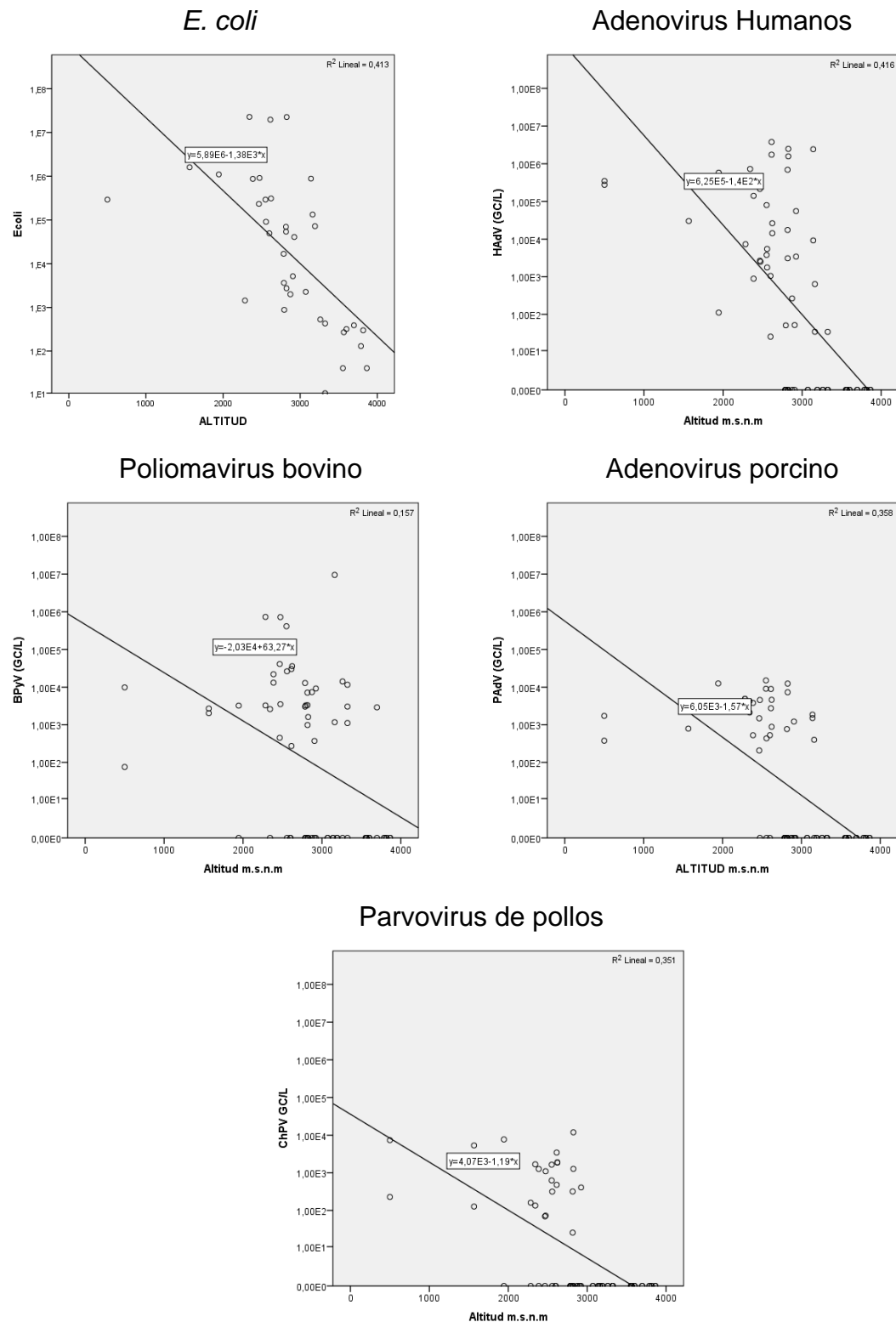


Figura 15. Diagramas de dispersión de los valores de concentración de indicadores de contaminación obtenidos frente a la altura en metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) que se encuentra cada punto muestreado.

Los indicadores de BPyV son los que menos se correlacionaron con la altura, con un coeficiente de correlación de -0,482. Pichincha es una provincia ganadera por excelencia y todos sus cantones se dedican a la producción de leche. Machachi, en el cantón Mejía, realiza la mayor producción en haciendas de la zona sobre los 2600 hasta los 3300 m.s.n.m, en el páramo andino, alcanzando una producción de 40 litros de leche por hectárea al día (Vizcarra, Lasso, & Tapia, 2015, pp. 183). Esto justifica que sé que en este rango de altura y en esta zona se encuentre el mayor grado de contaminación (Figura 15).

- **Aporte de cada indicador considerando ríos y usos de suelos**

Los criterios de clasificación, clases u rangos para evaluar el estado de la contaminación se construyeron en base a trabajos previos (Kavka, Kasimir, & Farnleitner, 2002; Kirschner et al., 2009), con algunas adaptaciones al contexto local (*Tabla 14*). Tanto para los niveles de concentración de indicadores bacterianos como virales, se consideró: (Clase I) o No detectado (Azul), son aquellos puntos que no generaron ninguna señal de amplificación en la reacción de qPCR o ninguna Cfu/L. (Clase II) o concentración baja (verde), son aquellos menores a 100 CG/L o de Cfu/L; (Clase III) Moderada (Amarillo), son aquellas muestras que poseen rangos entre 100 y 10 000 CG/L o de Cfu/L, considerando el límite establecido en la normativa nacional. A partir de 10 000 CG/L o de Cfu/L las muestras adquieren niveles de contaminación fecal, (Clase IV) Crítica (naranja), (Clase V) Fuerte (rojo) y (Clase VI) Excesivo (violeta), estos son niveles con alta contaminación y observados en aguas residuales de alcantarilla (Olaolu, Akpor, & Akor, 2014b; Vieira et al., 2016).

Tabla 14.

Criterios de clasificación adoptados para el análisis de los niveles de contaminación en la cuenca del río Guayllabamba y colores establecidos según la contaminación fecal encontrada.

Clasificación de la contaminación fecal		Clases					
		I	II	III	IV	V	VI
Parámetros	Unidades	No Detectado	Baja	Moderada	Crítica	Fuerte	Excesiva
Indicadores	(Cfu/L) y						
Bacteriano y	GC/L	ND	≤ 1E+02	>1E+02 - 1E+04	> 1E+04 - 1E+05	> 1E+05 - 1E+06	> 1E+06
Virales							

Adaptado de: (Kavka, Kasimir, & Farnleitner, 2002; Kirschner et al., 2009)

Escherichia Coli

Espacialmente *E. coli* se encuentra presente desde lugares muy cercanos al inicio de los ríos en zonas altas, donde ya se observan niveles de contaminación moderada que conforme llegan a zonas pobladas aumentan (Figura 16). El impacto generado por las ciudades es notorio, donde Quito y Sangolquí constituyen el principal foco de contaminación de los causes. Después del paso de los ríos por las ciudades, el agua adquiere niveles de contaminación críticos, fuertes y excesivos. Estos niveles de contaminación se mantienen varios kilómetros aguas abajo de la confluencia de todas las subcuencas que conforman el río Guayllabamba. Este hecho se puede comprobar en el punto M9 que es el punto analizado más alejado y a pesar de que recibe aportes de muchos afluentes que incrementan el caudal, la contaminación es fuerte y el agua no es apta para ningún tipo de usos establecidos en el TULSMA (MAE, 2015, pp. 1-35)

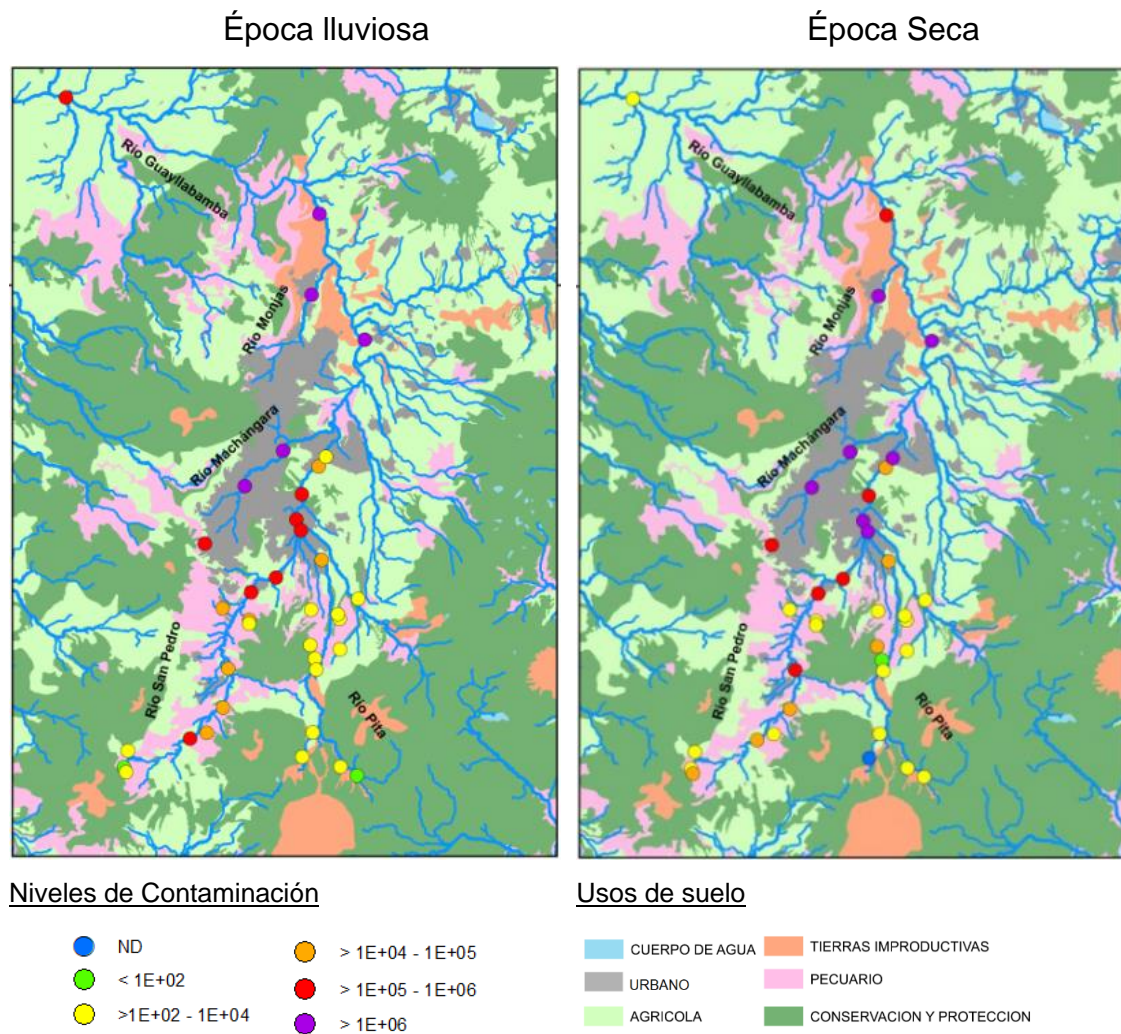


Figura 16. Mapas de niveles de contaminación fecal según su uso de suelo evaluado con indicadores bacterianos *E.coli*.

Las zonas de uso urbano son las que presentan mayor concentración de *E. coli* (*Figura 16*), sin embargo, las zonas de uso agrícola y pecuario también se encuentran altamente contaminadas.

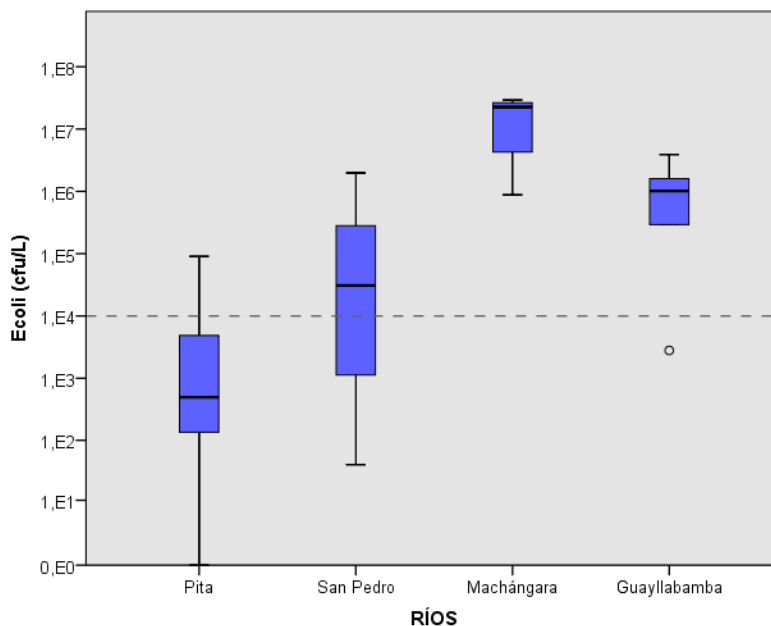


Figura 17. Diagrama cajas y bigotes de los resultados asociados a niveles de *E.coli* en los ríos estudiados. La línea punteada marca el límite de coliformes fecales en las descargas de aguas municipales a cuerpos receptores establecidos en el TULSMA. Las cajas aportan información de la mediana y la distribución de las concentraciones en los diferentes cuartiles, los bigotes corresponden a valores máximos (Arriba) y valores mínimos (Abajo).

El río Pita se encuentra menos impactado a lo largo de su cauce especialmente en las zonas más elevadas (Figura 17). Únicamente existen valores extremos en Santa Clara y 3.5PI que sobrepasan el límite de coliformes fecales establecidos para descarga en un cuerpo de agua dulce, y uso en el riego, (10000 NMP/L). Estos dos puntos corresponden a los de menor altitud en este río y son cercanos a lugares poblados. En el caso de 3.5PI se encuentra aguas abajo de la parroquia de Píntag y el punto Santa Clara es cercano a la ciudad de Sangolquí. El río San Pedro cuenta con niveles altos de *E. coli* conforme llega a zonas pobladas. Sin embargo, desde los páramos de los Ilinizas, Cotopaxi y zonas cercanas a la parroquia El Chaupi, ya existe presencia de coliformes fecales en valores moderados.

Los ríos Machángara y Monjas muestran valores críticos, fuertes y excesivos, que son equiparables a la concentración de *E.coli* presente en agua residual

cruda > 10^7 Cfu/L (Venegas, Diez, Blanch, Jofre, & Campos, 2015, pp. 801-810). En un estudio realizado en París, Francia, se realizó el análisis del agua cruda que llega a las plantas de tratamiento provenientes del sistema de alcantarillado de la ciudad de París, donde habitan 10 millones de personas. Los resultados estuvieron en rangos de $1E+07$ Cfu/L y $8E+08$ Cfu/L, sorprendentemente los valores de M2 y M3 del río Machángara, son equiparables a los obtenidos en una alcantarilla de una ciudad aproximadamente 5 veces más grande (Garcia-Armisen & Servais, 2007, pp. 512-518).

En la cuenca del río Sena, también se ha determinado que riachuelos cercanos a las áreas destinadas al pastoreo de animales, presentan una concentración de *E.coli* superior a las zonas agrícolas y bosques, esto es debido a la escorrentía superficial y a la lixiviación de materia fecal (Garcia-Armisen & Servais, 2007, pp. 512-518). Esta situación también se puede observar en el río San Pedro en épocas de invierno, en donde los valores de *E. coli* son más frecuentes y altos que en la época seca.

E. coli es un indicador que no debe subestimarse y debería mantenerse como un indicador de la contaminación fecal, ya que aporta información que engloba adecuadamente todos los aportes de contaminación microbiológica. Sin embargo, al no ser específico de origen no da la información suficiente para poder establecer los responsables, en este aspecto se vuelve necesario la evaluación con trazadores de la contaminación para completar la información en la gestión de una cuenca (Bofill-Mas et al., 2013).

- **Contaminación de origen humano**

Adenovirus Humano (HAdV)

El patrón espacial de adenovirus humanos muestra que en los páramos del Pasochoa, Cotopaxi, Illinizas, donde aún no hay poblados, no se detectaron Adenovirus humanos (Puntos azules). Sin embargo, tanto en época seca y época lluviosa los niveles aumentan conforme atraviesa las zonas urbanas y tras su paso se mantienen en niveles elevados (Figura 18).

En los mapas se puede observar que en varios puntos la contaminación varía de acuerdo a las épocas seca y lluviosa. La cantidad de puntos en rojo con contaminación fuerte aparecen con mayor frecuencia en época seca (Figura 18), esto puede estar relacionado con los efectos de la disminución de caudales.

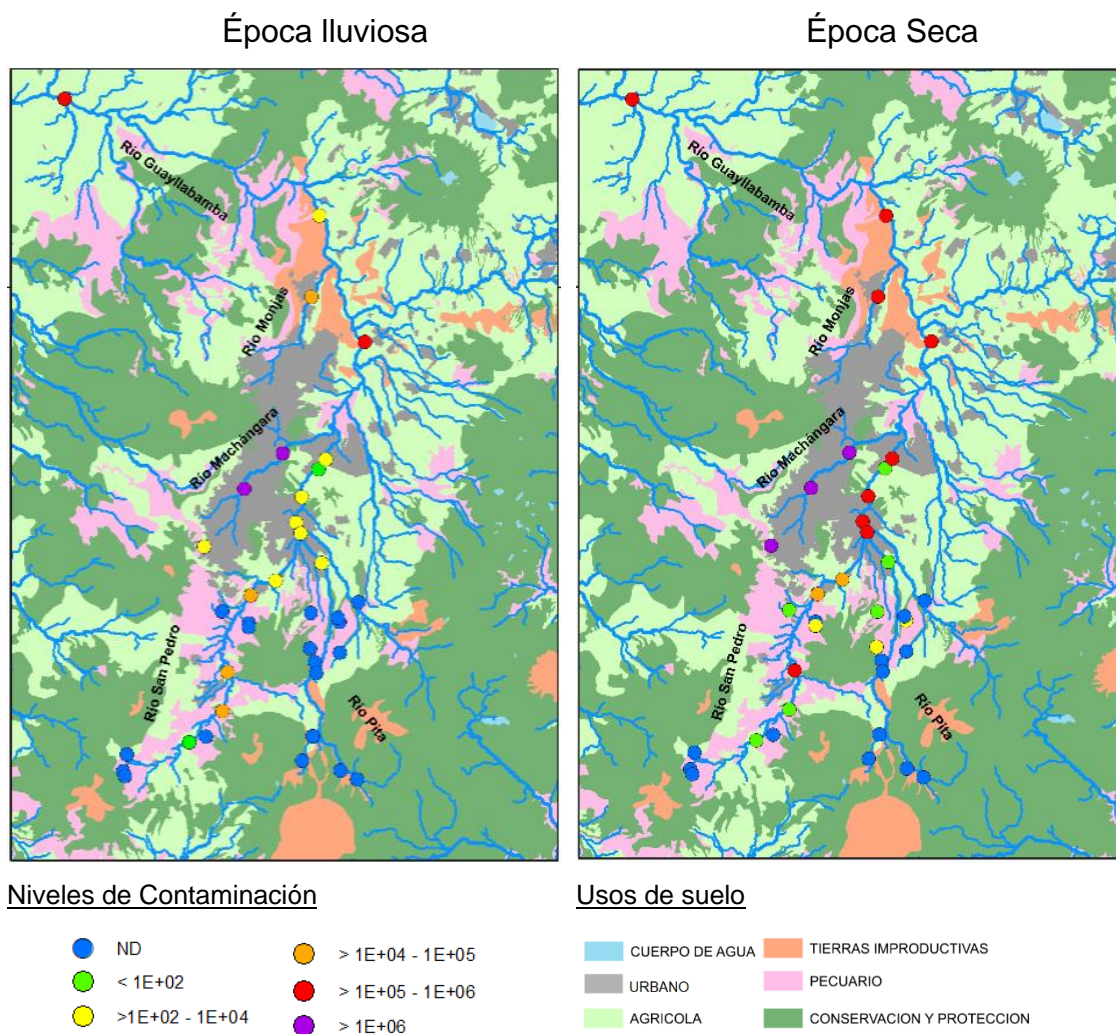


Figura 18. Mapas de niveles de contaminación fecal según su uso de suelo evaluado con indicadores HAdV

Las zonas de uso pecuario y agrícola poseen altas concentraciones de virus humanos, debido al retroceso de la frontera agrícola a causa de la expansión de las zonas urbanas que rodean a Machachi, y el valle de los Chillós. Provocando drásticamente un cambio en el entorno de los espacios rurales históricamente destinados a la producción agropecuaria y trayendo consigo todos los problemas

de contaminación ambiental que conlleva la expansión de urbanizaciones sin una debida planificación.

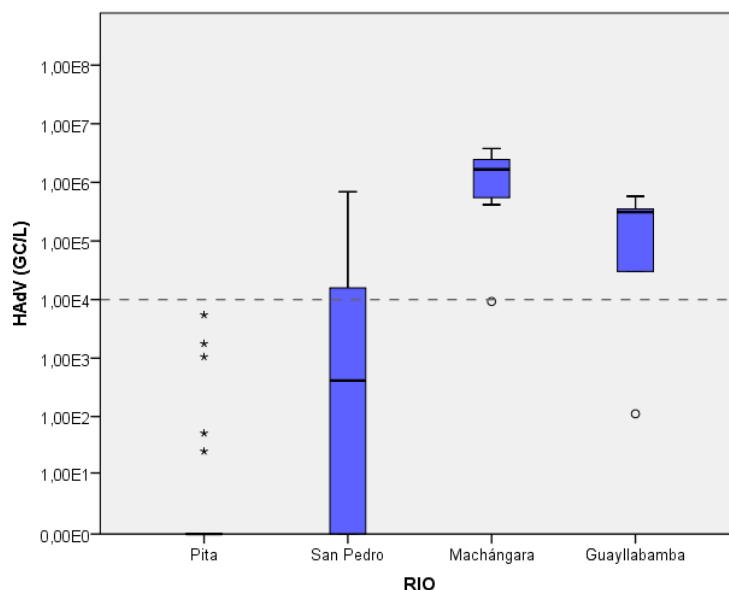


Figura 19. Diagrama cajas y bigotes de los resultados asociados a niveles de HAdV en los ríos estudiados. La línea punteada marca el límite de coliformes fecales en las descargas de aguas municipales a cuerpos receptores establecidos en el TULSMA. Las cajas aportan información de la mediana y la distribución de las concentraciones en los diferentes cuartiles, los bigotes corresponden a valores máximos (Arriba) y valores mínimos (Abajo).

El río Pita muestra bajos niveles de contaminación fecal humana en lugares puntuales cercanos a las zonas más pobladas del cantón Rumiñahui, este sector hasta la actualidad tampoco cuenta con mecanismos de tratamiento de aguas residuales urbanas por lo que las aguas de las alcantarillas llegan a los ríos y quebradas. El río San Pedro presenta niveles altos de contaminación fecal humana desde sus inicios debido a su paso por zonas pobladas como El Chaupi, Aloasí, Machachi, El rosal, Tambillo, Uyumbicho, Amaguaña, Sangolquí, Conocoto, Tumbaco y Cumbayá, antes de unirse con el río Machángara. A diferencia de lo observado con los indicadores bacterianos, en páramos HAdV no es detectado, debido a que en estos lugares no existen todavía poblados, pero si puede existir crianza de ganado y fauna endémica de la zona.

El río Machángara atraviesa zonas altamente pobladas de Quito, por lo que es la subcuenca más impactada por HAdV del estudio (Figura 19). El punto ubicado

sobre el río Monjas muestra niveles críticos y fuertes tanto en invierno y verano, se considera que este río recibe el 20% de las aguas residuales de la ciudad de Quito (EPMAPS, 2014, p. 25). El río Guayllabamba posee una alta concentración de adenovirus a pesar de que los caudales aumentan. Los aportes provenientes de Cayambe, Guayllabamba, Pacto, Nanegal y otras parroquias pueden estar contribuyendo en el aumento de HAdV se mantenga varios kilómetros tras su paso por la ciudad de Quito, Sangolquí y parroquias aledañas.

Contaminación Animal

En cuencas complejas como la del Guayllabamba, una característica permanente es la diversidad de actividades que se pueden encontrar en pocos kilómetros. Actividades industriales, agropecuarias, urbanas y cada una de ellas son aportes importantes en los ríos. En el sector rural existe una limitada conexión al alcantarillado por lo que todo tipo de desechos acaban esparcidos en el ambiente (SENAGUA, 2015, p. 15).

Poliomavirus Bovino (BPyV)

La detección de BPyV es intermitente, sin guardar ninguna relación entre época lluviosa y seca (Figura 20). Esto puede deberse por que los efluentes de granjas carecen de conexiones a la red de alcantarillado, llegando a los ríos por efectos de la lixiviación y escorrentía.

La concentración más elevada de este indicador se encuentra en zonas de uso pecuario, lo cual es consistente en vista de que en la cuenca la principal actividad es la crianza de vacas para la producción lechera. Sin embargo, en la cuenca alta del río Guayllabamba, al igual que en muchas zonas rurales del Ecuador, existen lugares en donde se combina espacios destinados a la agricultura con la crianza de ganado. De igual manera, en las zonas agrícolas los excrementos de animales domésticos y ganado son comúnmente utilizados como abono orgánico, introduciendo gran cantidad de virus a la tierra que en periodos de lluvia llegan a los cauces por efectos de la escorrentía superficial (Rusiñol et al., 2016, pp. 34-45)

Época Lluviosa

Época Seca

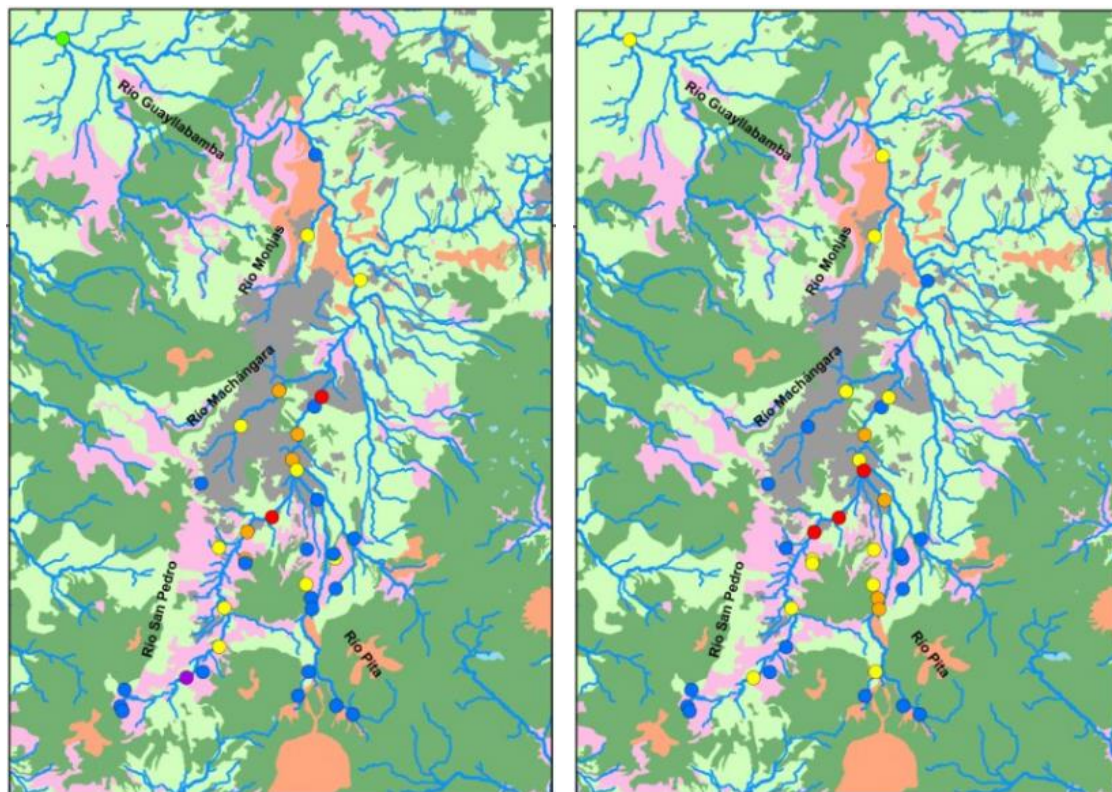
Niveles de ContaminaciónUsos de suelo

Figura 20. Mapas de niveles de contaminación fecal según su uso de suelo evaluado con indicadores BPyV.

La presencia de este indicador en altas concentraciones en zonas urbanas se puede deber a dos razones, paso de los ríos desde las zonas ganaderas y a la presencia de camales que se encuentran dentro de zonas urbanas como el camal municipal de Quito y del cantón Rumiñahui.

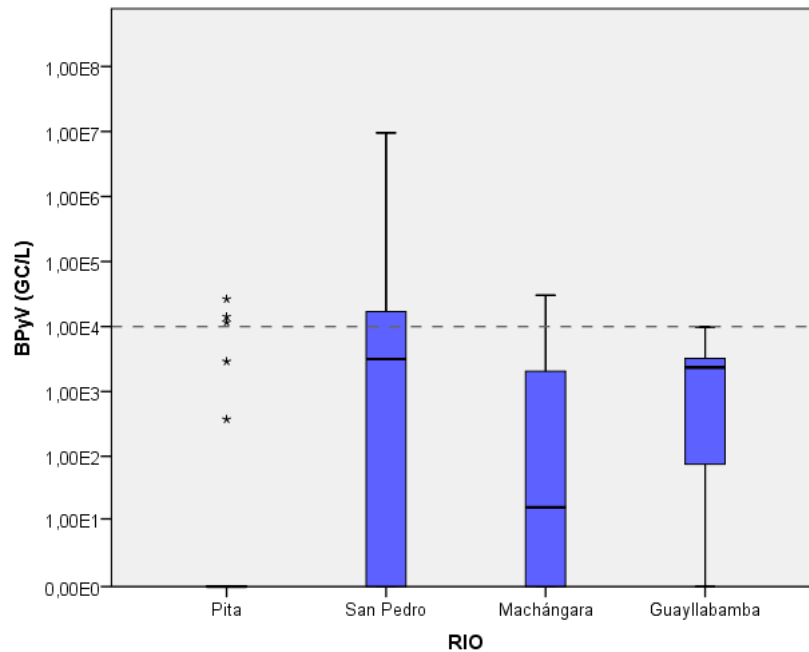


Figura 21. Diagrama cajas y bigotes de los resultados asociados a niveles de BPyV en los ríos estudiados. La línea punteada marca el límite de coliformes fecales en las descargas de aguas municipales a cuerpos receptores establecidos en el TULSMA. Las cajas aportan información de la mediana y la distribución de las concentraciones en los diferentes cuartiles, los bigotes corresponden a valores máximos (Arriba) y valores mínimos (Abajo).

El río Pita posee bajos niveles del indicador, por lo que esto comprueba que la mayor cantidad de la actividad pecuaria destinada a la producción ganadera se encuentra en el lado del río San Pedro (Figura 21). Esta industria está destinada relacionada con la producción de lácteos a gran escala, principalmente en el cantón Mejía y Rumiñahui (Vizcarra et al., 2015, pp.1-183). Otro aspecto que puede explicar la presencia de BPyV en varios puntos urbanizados del río San Pedro es el camal metropolitano de Sangolquí que no cuenta con una planta de tratamiento de los efluentes y todo es descargado a los ríos (Buenaño Davalos, 2015, pp. 1-155).

A pesar de que el río Machángara cruza por un suelo predominantemente urbano, la presencia del indicador se mantiene posiblemente debido a las actividades realizadas por el camal metropolitano y camales clandestinos que se

ubican a lo largo de la ciudad, que no cumplen con ninguna normativa de tratamiento de los efluentes, descargándolos al alcantarillado o directamente a los ríos. A pesar de que el camal de Quito si posee una planta de tratamientos de aguas residuales cuando ésta llega a sus niveles máximos, en días de mayor faenado, los efluentes exceden la capacidad de tratamiento y son liberados al alcantarillado sin ningún tratamiento (Cantos & Erazo, 2008, pp. 6-10) (Jacome, 2017).

Adenovirus Porcino (PAdV)

La detección de este indicador comienza a partir de zonas cercanas a Quito y Valle de los chillos (Figura 22). Esto demuestra que la producción de cerdos no guarda ninguna relación con la de ganado vacuno, que se realiza principalmente en zonas altas, pero si guarda relación con el establecimiento de poblados. En general, los niveles de este indicador no son tan altos y esto puede deberse a que esta no es una zona de producción porcina masiva.

Los desechos provocados por la crianza de cerdos en el río Pita son más bajos considerando que recién se comienza a detectar la presencia del indicador en 3.5PI y Santa Clara que ya se encuentran cerca de la ciudad de Sangolquí. En el río San Pedro los niveles del indicador aparecen especialmente en lugares cercanos a las ciudades y lugares poblados. El valor más alto de este indicador se encuentra en el río Machángara esto sugiere una estrecha relación entre la presencia de porcinos con la de humanos.

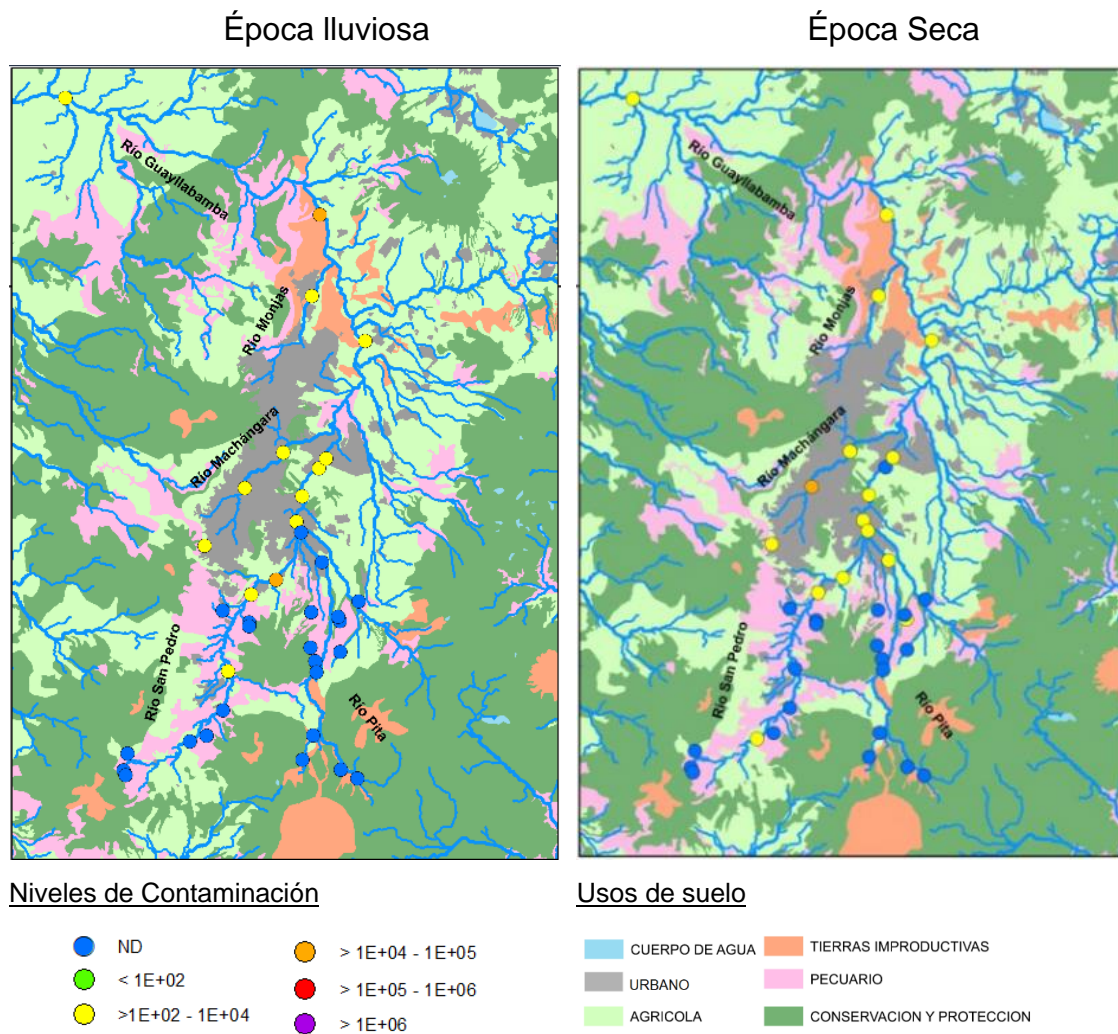


Figura 22. Mapas de niveles de contaminación fecal según su uso de suelo evaluado con indicadores PAdV.

Al igual que los indicadores bovinos, la presencia de PAdV en zonas urbanas puede deberse a camales municipales que también expenden carne de cerdo, por lo que, si los mecanismos de evacuación de aguas residuales no presentan un adecuado tratamiento, la sangre, heces y orina llegan a los ríos incrementando los niveles de contaminación. La presencia de indicadores específicos de porcinos en áreas destinadas al uso agrícola se puede deber a que uno de los principales abonos que se emplea es el estiércol de cerdo (Moreta, 2013, pp. 1-83).

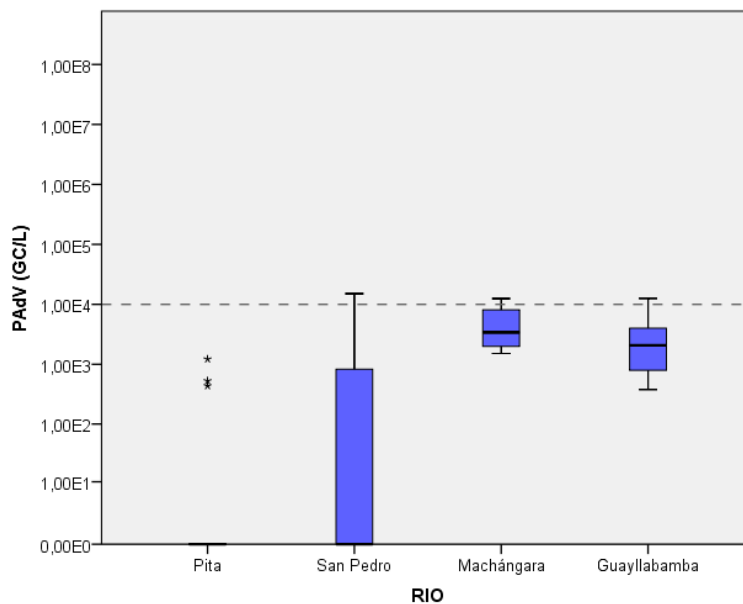


Figura 23. Diagrama cajas y bigotes de los resultados asociados a niveles de PAdV en los ríos estudiados. La línea punteada marca el límite de coliformes fecales en las descargas de aguas municipales a cuerpos receptores establecidos en el TULSMA. Las cajas aportan información de la mediana y la distribución de las concentraciones en los diferentes cuartiles, los bigotes corresponden a valores máximos (Arriba) y valores mínimos (Abajo).

Parvovirus Aviar (ChPV)

El indicador de contaminación fecal específica de pollos (ChPV) es el que se detectó en menor cantidad en la cuenca alta del Guayllabamba. En lugares de mayor altura en donde no existen poblaciones, no se detectó este indicador (Figura 24). Esto se debe a que la domesticación de estos animales ha hecho que deban estar al cuidado del ser humano compartiendo el mismo espacio a diferencia de la producción bovina.

La provincia de Pichincha posee la mayor cantidad de criaderos de aves en el país (MAGAP, 2016). Esta puede ser la razón de que este indicador esté presente tanto en el uso de suelo urbano, agrícola y pecuario. La agricultura es una actividad que emplea excrementos de aves como fertilizante, sin embargo, si estos provienen de animales enfermos existe el riesgo de contaminación de

alimentos, y de que los patógenos se esparzan por las aguas de ríos y por el riego (Mondaca & Campos, 2005, pp.1-5).

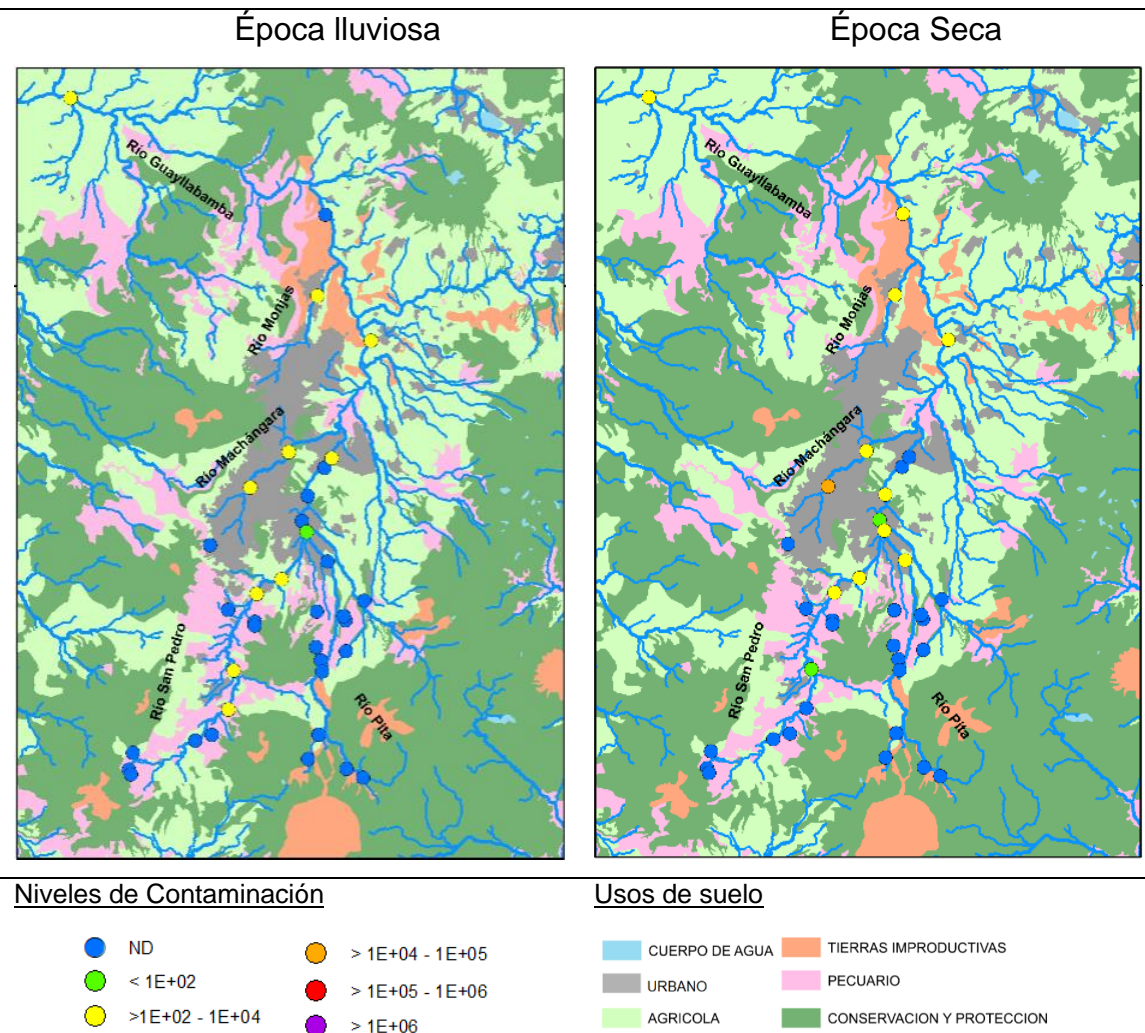


Figura 24. Mapas de niveles de contaminación fecal según su uso de suelo evaluado con indicadores ChPV.

El río Pita posee niveles indetectables de este indicador debido a que es un río que no se encuentra tan impactado por la mano del hombre. El río San Pedro posee niveles indetectables, bajos y moderados de este indicador, mientras que un río urbano como el Machángara es el que presenta mayores niveles de ChPV, M2 en verano alcanza niveles críticos. El río Guayllabamba posee bajos niveles, pero persiste a lo largo de su cauce.

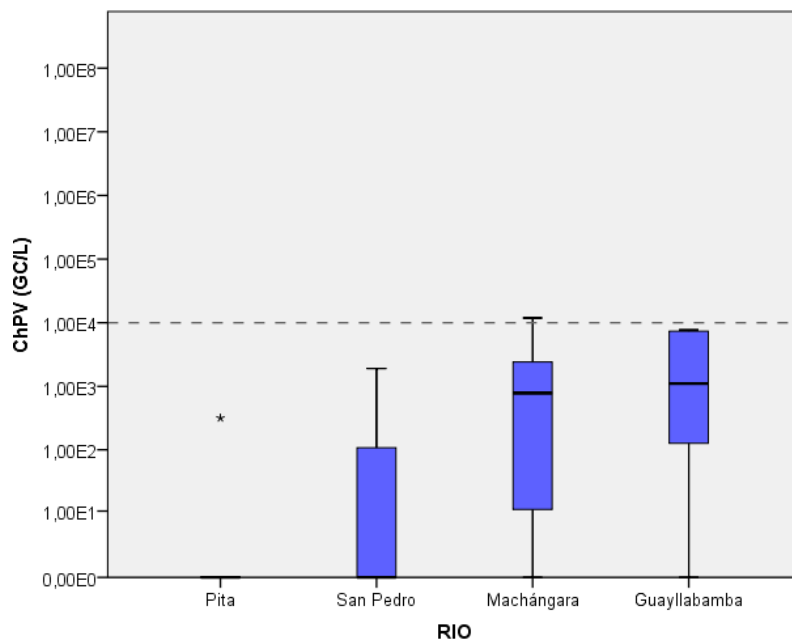


Figura 25. Diagrama cajas y bigotes de los resultados asociados a niveles de ChPV en los ríos estudiados. La línea punteada marca el límite de coliformes fecales en las descargas de aguas municipales a cuerpos receptores establecidos en el TULSMA. Las cajas aportan información de la mediana y la distribución de las concentraciones en los diferentes cuartiles, los bigotes corresponden a valores máximos (Arriba) y valores mínimos (Abajo).

Los virus patógenos excretados por pollos han sido estudiados debido a que las aves son reservorios de enfermedades que tienen la capacidad de cruzar las barreras de las especies, en el caso del brote de una enfermedad de este tipo los desechos fecales vertidos al medio ambiente pueden ser considerados un vehículo transmisor (Cabral, 2010, pp. 3657-3703). Los excrementos de aves también son empleados como fertilizantes de suelos, introduciendo patógenos a diferentes ambientes (Estrada, 2005, pp. 11-50).

5.6 Correlación entre indicadores bacterianos y virales

Se aplicó la prueba no paramétrica Rho de Spearman para determinar si existe algún nivel de correlación entre indicadores bacterianos e indicadores virales

Los niveles de correlación existentes entre los indicadores bacterianos y HAdV son los más altos, $\rho = 0.831$ (Figura 26). Esto se puede explicar debido que la mayor influencia en la contaminación microbiológica de la cuenca proviene de la

presencia de seres humanos, esta es la que causa mayor impacto en todos los niveles ecológicos y ambientales.

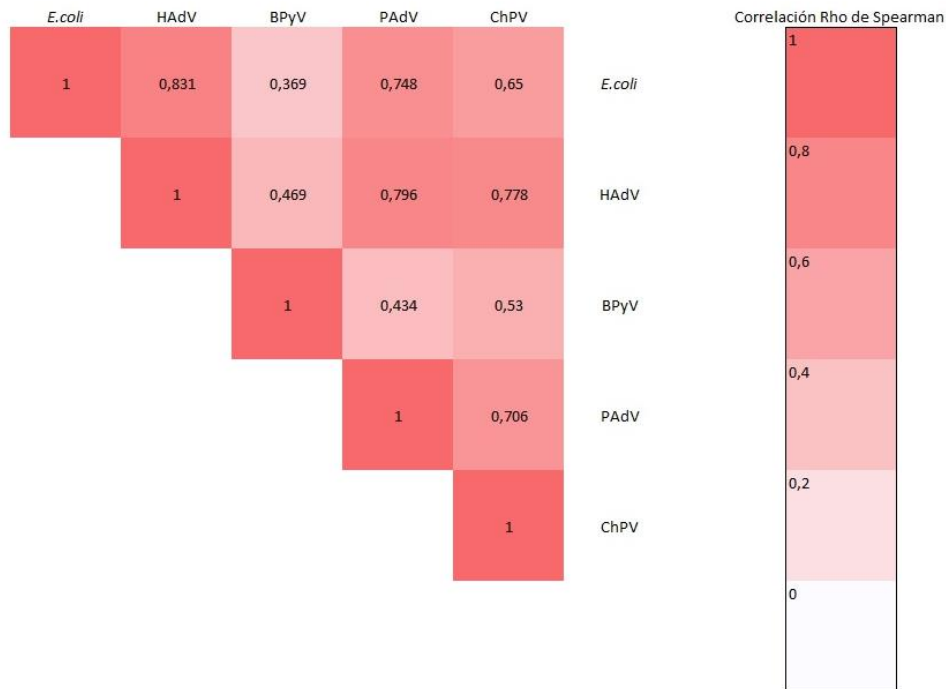


Figura 26. Resultados de los valores de correlación entre indicadores aplicando la prueba no paramétrica de Rho de Spearman. (n= 74)

El indicador de contaminación fecal bovino, BPyV, muestra la menor correlación frente al resto de indicadores (Figura 26) (BPyV- *E. coli* 0.369, BPyV- HAdV 0.469, BPyV- PAdV 0.434 y BPyV- ChPV 0.530). La principal razón es la lixiviación de cantidades de material fecal desde los campos de pastoreo que llegan hasta los causes por acción de la escorrentía superficial y no por la acción de un sistema de alcantarillado como si ocurre en el resto de indicadores. La falta de correlación existente es un factor que también se da debido a que BPyV proviene de un origen diferente al del humano, porcino y aviar.

Existe una gran asociación entre la presencia de humanos y animales domésticos, por esto la correlación entre los niveles de *E. coli* con respecto a ChPV y PAdV se mantienen altas (0.748 y 0.650), a pesar de presentar un origen

diferente. La contaminación microbiológica generada por pollos y cerdos podría pasar por desapercibidas si únicamente es analizada con *E. coli*.

Los indicadores bacterianos no constituyen la mejor alternativa para predecir la contaminación generada por la industria ganadera en la cuenca alta del río Guayllabamba. Esto justifica aún más la importancia de emplear trazadores específicos de la contaminación que permitan llegar a conocer la fuente de la contaminación y tomar medidas específicas en cada caso. Aumentar la importancia de esto porque de aquí se saca el agua potable para zonas urbanas. Si no se realiza el análisis mediante indicadores específicos de la contaminación se podría tener una idea equivocada de la fuente de contaminación, por ejemplo, se puede atribuir la contaminación del río a una población cuando la principal responsabilidad la tiene la industria ganadera, porcina o avícola asentada en la zona.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

La contaminación microbiológica en los ríos que conforman la cuenca del río Guayllabamba es excesiva y equiparable a valores observados en sistemas de aguas residuales tanto para *E.coli* (valor promedio de 2,26E+06) y HAdV (valor promedio de 2,25E+05). Esta realidad se da principalmente en contextos urbanos como el río Machángara y Monjas, como también el río San Pedro a su paso por la ciudad de Sangolquí y Cumbayá. Estos resultados revelan que el principal aporte de la cuenca es de origen humano.

Existen lugares en donde la contaminación de origen animal es excesiva. BPyV (valor promedio de 1,60E+05) presenta altos niveles de contaminación en zonas poco pobladas y destinadas al uso pecuario que coinciden con captaciones para agua potable.

El río Pita se caracteriza por tener un bajo impacto de contaminación fecal hasta su llegada a zonas urbanas. El río San Pedro presenta niveles considerables de contaminación especialmente bovina y humana. En casi todo su trayecto los ríos Machángara y Monjas se caracterizan por poseer los niveles de contaminación más altos de la cuenca debido a que acumula las aguas residuales urbanas de la ciudad de Quito. El río Guayllabamba es la confluencia de todos los ríos estudiados por lo que presenta altos niveles de todos los indicadores analizados, incluso luego de recibir aportes de cuencas más limpias.

En general no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre época seca y lluviosa de los indicadores estudiados. Sin embargo, en algunos ríos se pudo observar el incremento de indicadores virales humanos (HAdV) por efecto de la disminución de caudales en época seca. Para otros indicadores como los de virus bovinos BPyV el factor de escorrentía superficial fue notorio en épocas lluviosas.

En general los indicadores no obtuvieron correlaciones altas entre sí, esto es debido a que cada uno es específico con respecto a su origen en la cuenca.

La contaminación humana es la más preponderante en la cuenca, además presentó la mayor correlación con *E. coli* (0.831).

La presencia de porcinos y pollos se encuentra espacialmente relacionada con la de humanos, esto se debe a que la crianza de estos animales se encuentra relacionada a procesos de domesticación. La correlación entre HAdV y PAdV es de 0.796 y HAdV con ChPV es de 0.778.

A pesar de que la contaminación bovina es elevada en la cuenca la correlación entre HAdV y BPyV (0.469) es la más baja al igual que con *E. coli* (0.369). Esto revela la baja especificidad de los indicadores bacterianos al medir distintos tipos de orígenes y la necesidad de aplicar trazadores de contaminación que pueden determinar el verdadero responsable de la contaminación en zonas específicas.

6.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar mejoras en los programas de saneamiento planteados por los gobiernos municipales y provinciales de la cuenca, con el objetivo que cuenten con mecanismos de tratamiento y monitoreo efectivo de la calidad de los ríos considerando los aportes de las actividades tanto urbanas como agropecuarias.

Se recomienda realizar un estudio a profundidad en la cuenca, que identifique y cuantifique las distintas fuentes de contaminación tanto químicas como microbiológicas previo a la inversión en plantas de tratamiento y mecanismos de remediación. Esto es fundamental para determinar la infraestructura y procesos necesarios para descontaminar una cuenca compleja como la del río Guayllabamba.

Los indicadores de virus bovinos destacan la importancia de implementar planes de mitigación, ordenamiento territorial y control de la contaminación específico para los problemas presentados en cada zona.

Se debe considerar el aporte de contaminación animal presente en ríos urbanos, que por la falta de herramientas de monitoreo en la cuenca puede estar siendo subestimada. Además, el monitoreo de indicadores animales puede establecer si los mecanismos de descontaminación realizados por las industrias de

procesamiento de cárnicos y lácteos realizan los procesos de descontaminación adecuados.

Se recomienda a las autoridades del ramo ambiental pertinente, incluir el uso de indicadores virales específicos de huésped en las normativas correspondientes, con la finalidad de establecer los verdaderos responsables de la contaminación en los recursos hídricos y estrategias eficientes de control.

REFERENCIAS

- Ahmed, W., Neller, R., & Katouli, M. (2005). *Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and Escherichia coli and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4461–4468. Recuperado el 10 de julio del 2017 de <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4461-4468.2005>
- APHA. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Recuperado el 15 de julio del 2017 de https://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf.
- Asamblea Nacional. (2008). Constitución Política de la República del Ecuador, 1–54. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de <http://www.wipo.int/edocs/lexdocs/laws/es/ec/ec030es.pdf>
- Ballesté, E., & Blanch, A. R. (2011). *Bifidobacterial diversity and the development of new microbial source tracking indicators. Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 3518–3525. Recuperado el 8 de noviembre del 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3126448/>.
- Banco del Estado del Ecuador. (2014). Macro Programa de Saneamiento Ambiental Nacional. Recuperado el 12 de diciembre del 2017 de <http://www.bde.fin.ec/sites/default/files/BDE2015/LOTAIP2014/DOCUMENTO%20CONCEPTUAL%20PROSANEAMIENTO2.pdf>
- Barba, L. (2002). *Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición luz*. (1.ª ed.). Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- Bitton, G. (2011). *Wastewater Microbiology* (4.ª ed.). New Jersey, Estados Unidos: Editorial John Wiley & Sons.
- Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Calgua, B., Rusiñol, M., Maluquer de Motes, C., & Girones, R. (2011). *Cost-effective Method for Microbial Source*

Tracking Using Specific Human and Animal Viruses. Journal of Visualized Experiments, 5(58), 5–9. Recuperado el 20 de agosto de 2017 de <https://doi.org/10.3791/2820>

Bofill-mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., & Girones, R. (2013). *Quantification of Human and Animal Viruses to Environmental Samples. BioMed Research International*. Recuperado el 15 de septiembre de 2017 de <https://doi.org/10.1155/2014/675857>

Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., & Girones, R. (2013). *Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. BioMed Research International*. Recuperado el 10 de agosto de 2017 de <https://doi.org/10.1155/2013/192089>

Bonjoch, X., Balleste, E., & Blanch, a R. (2004). *Multiplex PCR with 16S rRNA Gene-Targeted Primers of. Society*, 70(5), 3171–3175. Recuperado el 11 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.3171>

Botteldoorn, N., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Werbrouck, H., Haesebrouck, F., Donné, E., Herman, L. (2006). *Real-time reverse transcription PCR for the quantification of the mntH expression of Salmonella enterica as a function of growth phase and phagosome-like conditions. Journal of Microbiological Methods*, 66(1), 125–135. Recuperado el 20 de octubre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.11.003>

Brown, K. I., Graham, K. E., Boehm, A. B., Brown, K. I., Graham, K. E., & Boehm, A. B. (2017). Risk-based threshold of gull-associated fecal marker concentrations for recreational water. Recuperado el 15 de agosto del 2017 de <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00473>

Brunkard, J. M., Ailes, E., Roberts, V. A., Hill, V., Hilborn, E. D., Craun, G. F., CDC. (2011). *Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water---United States, 2007--2008. Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington,*

D.C. : 2002), 60(12), 38–68. Recuperado el 30 de mayo del 2017 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937977>

Buenaño Davalos, M. G. (2015). Propuesta de una planta de tratamiento de aguas residuales de una empresa envasadora de leche del Canton Rumiñahui, para que cumpla con la Norma Técnica Ambiental Recuperado el 29 de noviembre del 2017 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/10534>.

Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). *Enterococci in the environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 76(4), 685–706. Recuperado el 11 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>

Cabral, J. P. S. (2010). *Water microbiology. Bacterial pathogens and water. International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. Recuperado el 22 de diciembre del 2017 de <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>

Calgua, B., Fumian, T., Rusiñol, M., Rodriguez-Manzano, J., Mbayed, V. A., Bofill-Mas, S., Girones, R. (2013). *Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. Water Research*, 47(8), 2797–2810. Recuperado el 25 de Octubre de. 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.043>

Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-mas, S., Clemente-casares, P., & Hundesa, A. (2008). *Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples*, 153, 79–83. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.003>

Cantalupo, P. G., Calgua, B., Zhao, G., Hundesa, A., Wier, A. D., Katz, J. P., & Grabe, M. (2011). *Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations*, 2(5), 1–11. Recuperado el 30 de octubre del 2017 de

<https://doi.org/10.1128/mBio.00180-11>

- Cantos, C. R. V., & Erazo, A. R. M. (2008). Evaluacion de los impactos ambientales y sus medidas de mitigacion, derivados del camal metropolitano de Quito. Recuperado el 25 de noviembre del 2017 de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3174>
- Carratalà, A., Rusinol, M., Hundesa, A., Biarnes, M., Rodriguez-Manzano, J., Vantarakis, A., Bofill-Mas, S. (2012). *A Novel Tool for Specific Detection and Quantification of Chicken / Turkey Parvoviruses To Trace Poultry Fecal Contamination*, 78(20), 7496–7499. Recuperado el 12 de enero del 2018 de <https://doi.org/10.1128/AEM.01283-12>
- Carvajal, L. (2016). Gestión y conservación de las cuencas de los ríos Guayllabamba y Blanco: aplicación de un índice multimétrico basado en la información existente sobre Macroinvertebrados Acuáticos. Recuperado el 17 de noviembre del 2017 de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12501>.
- Choi, S., & Jiang, S. C. (2005). *Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7426–33. Recuperado el 15 de agosto del 2017 de <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7426-7433.2005>
- CONAGUA México. (2007). Manual de agua potable, alcantarillado y saneamiento: desinfección para sistemas de agua potable y saneamiento, 36–38. Recuperado el 8 de septiembre del 2017 de [ftp://ftp.conagua.gob.mx/Mapas/libros pdf 2007/Desinfecci%F3n para Sistemas de Agua Potable y Saneamiento.pdf](ftp://ftp.conagua.gob.mx/Mapas/libros%20pdf%202007/Desinfecci%F3n%20para%20Sistemas%20de%20Agua%20Potable%20y%20Saneamiento.pdf)
- Consejo Metropolitano del DMQ. (2008). Norma Técnica de Calidad Ambiental, 13–25. Recuperado el 8 de septiembre del 2017 <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Corsi, S. R., Borchardt, M. A., Spencer, S. K., Hughes, P. E., & Baldwin, A. K. (2014). *Human and bovine viruses in the Milwaukee River watershed: Hydrologically relevant representation and relations with environmental variables*. *Science of The Total Environment*, 490, 849–860. Recuperado el 8 de agosto del 2017 de <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2014.05.072>
- Cortez, C., Arreola, M. G., & Escarpulli, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 31(4). Recuperado el 11 de noviembre del 2017 <http://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2011/ei114f.pdf>
- da Cruz E Sousa, R., & Ríos-Touma, B. (2017). *Stream restoration in Andean cities: learning from contrasting restoration approaches*. *Urban Ecosystems*, 1–10. Recuperado el 16 de Diciembre del 2017 <https://doi.org/10.1007/s11252-017-0714-x>
- De Bievre, B., Coello, X., De Keizer, O., & Maljaars, P. (2008). Modelo Hidrológico de la Hoya de Quito, Manejo Integrado de los Recursos Hídricos en la Hoya de Quito, 64. Recuperado el 15 de septiembre del 2017 http://infoaguaguayllabamba.ec/images/PDF/agua_cuenca/06ModeloHidrologico.pdf
- De Guzman, A., de los Reyes, V. C., Sualdito, M. N., & Tayag, E. (2015). *Availability of safe drinking-water: the answer to cholera outbreak? Nabua, Camarines Sur, Philippines, 2012*. *Western Pacific Surveillance and Response Journal: WPSAR*, 6(3), 12–6. Recuperado el 2 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.5365/WPSAR.2015.6.1.005>
- Domanska-Blicharz, K., Jacukowicz, A., Lisowska, A., & Minta, Z. (2012). *Genetic characterization of parvoviruses circulating in turkey and chicken flocks in Poland*. *Archives of Virology*, 157(12), 2425–2430.

<https://doi.org/10.1007/s00705-012-1446-0>

Dong, Y., Kim, J., & Lewis, G. D. (2010). *Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. Journal of Applied Microbiology, 108(3)*, 800–809. Recuperado el 2 de septiembre del 2017 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04477.x>

Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento (EPMAPS). (2011). *Estudios de actualización del Plan Maestro Integrado de Agua Potable y Alcantarillado para el DMQ*. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de https://www.aguaquito.gob.ec/sites/default/files/documentos/plan_maestro_agua_potable.pdf

EPA. (2001). *Parameters of Water Quality Intepretation and Standards*. Wxford, Irlanda. Recuperado el 26 de noviembre del 2017 de https://www.epa.ie/pubs/advice/water/quality/Water_Quality.pdf

EPMAPS. (2011). *Estudios de actualización del Plan Maestro Integrado de Agua Potable y Alcantarillado para el DMQ*. Recuperado el 13 de septiembre del 2017 de <http://www.planificacion.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2016/05/DISE%91OS-DEFINITIVOS-DE-LAS-OBRAS-DE-INTERCEPCION-Y-TRATAMIENTO-DE-LAS-AGUASRESIDUALES-PARA-QUITO-Y-PARROQUIAS-ANEXAS.pdf>

EPMAPS. (2014). *Programa para la descontaminación de los ríos de Quito*. Recuperado el 12 de septiembre del 2017 de http://www.aguaquito.gob.ec/downloads/1vision_general_de_proyecto.pdf

Estrada, M. (2005). Manejo y procesamiento de la gallinaza. *Lasallista De Investigación, 2(1)*, 43–48. Recuperado el 25 de noviembre del 2017 <http://www.lasallista.edu.co/fxcul/media/pdf/Revista/vol2n1/gallinaza>.

pdf

- FAO. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. Roma: Italia. Recuperado el 7 de agosto del 2017 de <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>.
- FAO. (2011). El estado de los recursos de tierras y aguas del mundo para la alimentación y la agricultura. Roma: Italia. Recuperado el 18 de noviembre del 2017 de <http://www.fao.org/docrep/015/i1688s/i1688s00.pdf>
- FAO. (2015). Contribución del agua a la seguridad alimentaria y la nutrición. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de <http://www.fao.org/3/a-av045s.pdf>
- FLACSO-Ecuador. (2011). Perspectivas del ambiente y cambio climático en el medio urbano: Municipio del distrito metropolitano de Quito. Recuperado el 15 de noviembre del 2017 de https://www.flacso.org.ec/biblio/shared/biblio_view.php?bibid=124087&tab=opac
- FONAG. (2009). Plan de manejo integrado de los recursos hídricos en la cuenca alta del río guayllabamba. Recuperado el 8 de noviembre del 2017 de <http://www.fonag.org.ec/aguafondo/pmrhg050110.pdf>
- Fong, T., & Lipp, E. K. (2005). *Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments : Health Risks , Detection , and Potential Water Quality Assessment Tools*, 69(2), 357–371. Recuperado el 12 de diciembre del 2017 de <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357>
- Forouzanfar, M. H., Afshin, A., Alexander, L. T., Biryukov, S., Brauer, M., Cercy, K., Zhu, J. (2016). *Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. *The Lancet*, 388(10053),

1659–1724. Recuperado el 29 de septiembre del 2017
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8)

Furukawa, T., & Suzuki, Y. (2013). *A Proposal for Source Tracking of Fecal Pollution in Recreational Waters by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Microbes and Environments*, 28(4), 444–449. Recuperado el 12 de agosto del 2017 de <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13075>

Garcia-Armisen, T., & Servais, P. (2007). *Respective contributions of point and non-point sources of E. coli and enterococci in a large urbanized watershed (the Seine river, France). Journal of Environmental Management*, 82(4), 512–518. Recuperado el 21 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.01.011>

Gaur, R., Gupta, V. K., Sharma, G. D., & Tuohy, M. G. (2016). *The handbook of microbial bioresources*. Recuperado el 15 de diciembre del 2017
<https://doi.org/10.1079/9781780645216.0000>

GBD Diarrhoeal Diseases Collaborators, G. D. D. (2017). *Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. The Lancet. Infectious Diseases*, 17(9), 909–948. Recuperado el 25 de agosto del 2017
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30276-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30276-1)

Gonzales-Gustavson, E., Cárdenas-Youngs, Y., Calvo, M., da Silva, M. F. M., Hundesa, A., Amorós, I., Girones, R. (2017). *Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa. Journal of Microbiological Methods*, 134, 46–53. Recuperado el 14 de octubre del 2017
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.01.006>

- Griffith, J. F., Layton, B. A., Holden, P. A., Jay, J. A., Mcgee, C. D., Weisberg, S. B., Weisberg, S. B. (2013). *The California Microbial Source Identification Manual : A Tiered Approach to Identifying Fecal Pollution Sources to Beaches* *The California Microbial Source Identification Manual : A Tiered Approach to Identifying Fecal Pollution Sources to Beaches*. Los Angeles, Estados Unidos. Recuperado el 24 de noviembre del 2017 de https://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/beaches/cbi_projects/docs/sipp_manual.pdf
- Hagedorn, C., Blanch, A. R., & Harwood, V. J. (2011). *Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies*. New York, Estados Unidos: Springer-Verlag New York
- Haznedaroglu, B. Z., Yurtsever, D., Lefkowitz, J. R., & Duran, M. (2007). *Phenotypic characterization of Escherichia coli through whole-cell fatty acid profiling to investigate host specificity*. *Water Research*, 41(4), 803–809. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.041>
- Hernroth, B. E., Girones, R., & Allard, A. K. (2002). *Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel , Mytilus edulis : the First Scandinavian Report*, 68(9), 4523–4533. Recuperado el 26 de marzo del 2017 <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4523>
- Hjelms, H., Hellmr, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenka, O., Seidel, M., Schultz, A. C. (2017). *Evaluation of methods for the concentration and extraction of viruses from sewage in the context of metagenomic sequencing*. *PLoS ONE*, 12(1), 1–17. Recuperado el 25 de septiembre del 2017 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170199>
- Hughes, B., Beale, D., Dennis, P., Cook, S., & Ahmedb, W. (2017). *Cross-*

Comparison of Human Wastewater-Associated Molecular Markers in Relation to Fecal Indicator Bacteria and Enteric Viruses in Recreational Beach. Applied Environmental Microbiology, 83(8), 1–16. Recuperado el 1 de diciembre del 2017 de <http://aem.asm.org/content/83/8/e00028-17.full>

Hundesda, A., Bofill-mas, S., Maluquer, C., Motes, D., Rodriguez-manzano, J., Bach, A., Girones, R. (2010). *Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool*, 163, 385–389. Recuperado el 11 de noviembre del 2017 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.029>

Hundesda, A., Motes, C. M. De, Albinana-gimenez, N., Rodriguez-manzano, J., Girones, R. R., Bofill-mas, S., & Su, E. (2009). *Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment*, 158, 130–135. Recuperado el 29 de octubre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.006>

ICPDR. (2009). *The Danube River Basin. Facts and Figures*. Recuperado el 2 de noviembre del 2017 de https://www.icpdr.org/main/sites/default/files/nodes/documents/icpdr_facts_figures.pdf

INEC. (2010). Base de Datos-Censo de Población y Vivienda 2010 – a nivel de manzana | Instituto Nacional de Estadística y Censos. Recuperado el 5 de diciembre del 2017 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/base-de-datos-censo-de-poblacion-y-vivienda-2010-a-nivel-de-manzana/>

INEC. (2013). Censo de Información Ambiental Económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales 2013. Recuperado el 8 de noviembre del 2017 de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Consejos_Provinciales_2015/Documen

to_Tecnico_GAD_2015.pdf

- ISO. (1995). *Water quality—Detection and enumeration of bacteriophages. ISO 10705-1, 2000*. Geneva, Suiza: *ISO Central Secretariat*
- Jacome, E. (2017). El 36% de la carne sale de camales clandestinos | El Comercio. Recuperado el 2 de enero del 2018 de <http://www.elcomercio.com/actualidad/carne-camales-clandestinos-quito-normativa.html>
- Janet, M., Garzón, G., Gil, M. J., Adriana, Soto, M., Usma, J. I., & Darío Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos *Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments* Contaminantes emergentes em águas, efeitos e possíveis tratamentos, 7(2), 52–73. Recuperado el 15 de octubre del 2017 de <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v7n2/v7n2a05.pdf>
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A. R., & Muniesa, M. (2016). *Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. Water (Switzerland)*, 8(5), 1–21. Recuperado el 18 de octubre del 2017 <https://doi.org/10.3390/w8050199>
- Julian, T. R. (2016). *Environmental transmission of diarrheal pathogens in low and middle income countries. Environmental Science. Processes & Impacts*, 18(8), 944–55. Recuperado el 13 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1039/c6em00222f>
- Kavka, G., Kasimir, G., & Farnleitner, A. (2002). *Microbiological water quality of the River Danube (km 2581 - km 15): Longitudinal variation of pollution as determined by standard parameters. Proceedings of the 36th International Conference of IAD*, 415–421. Recuperado el 22 de agosto del 2017 de http://www.oen-iad.org/conference/docs/8_microbial/kavka.pdf
- Kelsey, R., Webster, L., Kenny, J., Stewart, R., & Scott, G. (2008). *Spatial and*

temporal variability of ribotyping results at a small watershed in South Carolina. Water Research, 42(8–9), 2220–2228. Recuperado el 2 de agosto del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.038>

Kirschner, A., Reischer, G., Jakwerth, S., Savio, D., Ixenmaier, S., Toth, E. Farnleitner, A. (2017). *Multiparametric monitoring of microbial faecal pollution reveals the dominance of human contamination along the whole Danube River. Water Research, 124, 543–555.* Recuperado el 11 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.052>

Kirschner, A., Kavka, G., Velimirov, B., Mach, R., Sommer, R., & Farnleitner, A. (2009). *Microbiological water quality along the Danube River: Integrating data from two whole-river surveys and a transnational monitoring network. Water Research, 43(15), 3673–3684.* Recuperado el 21 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.034>

Lamendella, R., Santo Domingo, J., Kelty, C., & Oerther, D. (2008). *Bifidobacteria in feces and environmental waters. Applied and Environmental Microbiology, 74(3), 575–584.* Recuperado el 3 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1128/AEM.01221-07>

Larios-Meño, J., González, C., Yennyfer, T., & Olivares, M. (2015). LAS AGUAS RESIDUALES Y SUS CONSECUENCIAS EN EL PERÚ. Recuperado el 23 de septiembre del 2017 de <http://www.usil.edu.pe/sites/default/files/revista-saber-y-hacer-v2n2.2-1-19set16-aguas-residuales.pdf>

Liu, J., Health, I., Platts-mills, J. A., Health, I., Juma, J., Kabir, F., Ahmed, S. (2017). *Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015., 388(10051), 1291–1301.* Recuperado el 9 de noviembre del 2017 de

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31529-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31529-X)

- MAE. (2015). Anexo 1 del libro vi del texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente: norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, 1–37. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu112180.pdf>
- MAE. (2015). Libro ix del texto unificado de legislación secundaria del ministerio del ambiente. Artículo, 1–184. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/06/Texto-Unificado-de-Legislacion-Secundaria-del-Ministerio-del-Ambiente.pdf>
- MAGAP. (2016). Censo Nacional Agropecuario, censos sectoriales: Avícola, Florícola y Censo de Invierno. Recuperado el 30 de diciembre del 2017 de <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/productos/censos-y-encuestas>
- Manyi-Loh, C. E., Mamphweli, S. N., Meyer, E. L., Makaka, G., Simon, M., & Okoh, A. I. (2016). *An overview of the control of bacterial pathogens in cattle manure. International Journal of Environmental Research and Public Health, 13*(9). Recuperado el 3 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.3390/ijerph13090843>
- McQuaig, S., Griffith, J., & Harwood, V. J. (2012). *Association of fecal indicator bacteria with human viruses and microbial source tracking markers at coastal beaches impacted by nonpoint source pollution. Applied and Environmental Microbiology, 78*(18), 6423–6432. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1128/AEM.00024-12>
- Meals, D. W., Harcum, J. B., & Dressing, S. (2013). *Monitoring for Microbial Pathogens and Indicators Introduction*. Recuperado el 5 de noviembre del 2017 de <https://www.epa.gov/polluted-runoff-nonpoint-source-pollution/nonpoint-source-monitoringtechnical-notes>.

- Meschke, J. S., & Boyle, D. (2007). *Shellfish and Microbial Source Tracking. Microbial Source Tracking*. Washington, Estados Unidos: *Emerging issues in food safety*.
- Michaud, D., Gabric, S., Hommann, K., & Shegay, A. (2015). *Water and wastewater services in the Danube region: a state of the sector*. Recuperado el 26 de noviembre del 2017 de http://www.danube-water-program.org/media/publications/SoS_Report.pdf
- Mondaca, M. A., & Campos, V. (2005). Riesgo De Enfermedades Transmitidas Por El Agua En Zonas Rurales. *Agua Potable Para Comunidades Rurales, Reuso Y Tratamiento Avanzado de Aguas Residuales Domésticas*. Recuperado el 28 de octubre del 2017 de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd57/riesgo.pdf>
- Moreta, M. (2013). Diseño de un Biodigestor de Estiércol Porcino para una granja Agrícola Ubicada en el barrio la Morita, Parroquia de Tumbaco Para el Año 2012-2013. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1–82. Recuperado el 9 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Nappier, S. P., Aitken, M. D., & Sobsey, M. D. (2006). *Male-specific coliphages as indicators of thermal inactivation of pathogens in biosolids*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2471–2475. Recuperado el 14 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2471-2475.2006>
- Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., & Gantzer, C. (2010). Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), 8019–8025. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1128/AEM.00917-10>
- Olaolu, T. D., Akpor, O. B., & Akor, C. O. (2014). *Pollution indicators and pathogenic microorganisms in wastewater treatment: Implication on*

receiving water bodies. International Journal of Environmental Protection and Policy, 2(6), 205–212. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.11648/j.ijepp.20140206.12>

OMS. (2016). OMS | Saneamiento. *WHO*. Recuperado el 15 de septiembre del 2017 de <http://www.who.int/topics/sanitation/es/>

ONU. (2006). El Agua: una responsabilidad compartida, 2° informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos en el mundo, resumen ejecutivo. Recuperado el 6 de noviembre del 2017 de <http://unesdoc.unesco.org/images/0014/001444/144409S.pdf>

ONU. (2016). Informe de las Naciones Unidas Sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo 2016: *AGUA Y EMPLEO*. Recuperado el 9 de diciembre del 2017 de <http://unesdoc.unesco.org/images/0024/002441/244103s.pdf>

Ordóñez, M. (2011). Influencia del uso del suelo y la cobertura vegetal natural en la integridad ecológica de los ríos altoandinos al noreste del Ecuador. Recuperado el 14 de diciembre del 2017 de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/552>.

Owa, F. D. (2013). *Water Pollution: Sources, Effects, Control and Management. Mediterranean Journal of Social Sciences MCSER Publishing*, 4, 2039–9340. Recuperado el 4 de octubre del 2017 de <https://doi.org/10.5901/mjss.2013.v4n8p65>

PNUD. (2016). Estrategia de urbanización sostenible. Recuperado el 5 de diciembre del 2017 de <http://www.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56865.pdf>

Prince, A. M., & Andrus, L. (1992). *PCR: how to kill unwanted DNA. BioTechniques*, 12(3), 358–60. Recuperado el 14 de octubre del 2017 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1571142>

QIAGEN. (2014). *QIAamp ® Viral RNA Mini Handbook Sample & Assay*

Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. Recuperado el 27 de noviembre del 2017 de <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>.

Reischer, G. H., Haider, J. M., Sommer, R., Stadler, H., Keiblinger, K. M., Hornek, R., Farnleitner, A. H. (2008). *Quantitative microbial faecal source tracking with sampling guided by hydrological catchment dynamics*. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2598–2608. Recuperado el 7 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01682.x>

Richard, R. L., Ithoi, I., Majid, M. A. A., Wan Sulaiman, W. Y., Tan, T. C., Nissapatorn, V., & Lim, Y. A. L. (2016). *Monitoring of waterborne parasites in two drinking water treatment plants: A study in Sarawak, Malaysia*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(7). Recuperado el 27 de septiembre del 2017 de <https://doi.org/10.3390/ijerph13070641>

Ríos-Touma, B., Acosta, R., & Prat, N. (2014). *The Andean Biotic Index (ABI): revised tolerance to pollution values for macroinvertebrate families and index performance evaluation*. *Rev. biol. trop* [online]. Vol.62, suppl.2. Recuperado el 7 de septiembre del 2017 de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442014000600017&lng=en&nrm=iso

Ríos-Touma, B., & Guerrero-Latorre, L. (2016). *Ecological and microbiological status of the Upper Guayllabamba River Basin, historic trends, biodiversity threats and health risks*. Research Project submitted and approved by Universidad de Las Américas, Ecuador. *Technical Proposal.*, 1–10.

Ríos Touma, B., Prat, N., & Terneus, E. (2004). Estudio de las condiciones de referencia de las cuencas de los ríos pita , san pedro y machangara.

Barcelona, España: Universidad de Barcelona.

- Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Hundesa, A., Vieira, C., Kern, A., Eriksson, I., Girones, R. (2014). *Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas*. *Water Research*, 59, 119–129. Recuperado el 3 de diciembre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.013>
- Rusiñol, M., Moriarty, E., Lin, S., Bofill-Mas, S., & Gilpin, B. (2016). *Human-, Ovine-, and Bovine-Specific Viral Source Tracking Tools to Discriminate Between the Major Fecal Sources in Agricultural Waters*. *Food and Environmental Virology*, 8(1), 34–45. Recuperado el 22 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9223-3>
- Secretaría de ambiente del DMQ. (2013). Consultoría: "Fortalecer la Gestión Integral Forestal en el DMQ, en el marco de las Políticas y Lineamientos Estratégicos para la Conservación y el Desarrollo Sostenible que se lidera desde la Secretaría de Ambiente" Recuperado el 19 de septiembre del 2017 de http://www.quitoambiente.gob.ec/ambiente/phocadownload/patrimonio_natural/DIAGNOSTICO%20FORESTAL%20DMQ%202013.pdf.
- SENAGUA. (2015). Estrategia Nacional de Agua Potable y Saneamiento Recuperado el 19 de septiembre del 2017 de www.agua.gob.ec/wp-content/uploads/.../07/REVISTA-SENAGUA.compressed.pdf.
- SENPLADES. (2016). Diseño definitivo de las obras de intercepción y tratamiento de las aguas residuales de Quito y parroquias anexas, 1–20. Recuperado el 23 de noviembre del 2017 de https://portal.compraspublicas.gob.ec/sercop/wp-content/uploads/2017/05/Acta_Lotti_Fiscalizacion_Vindobona_opt.pdf
- Shakir, E., Zahraw, Z., & Al-Obaidy, A. H. M. J. (2017). *Environmental and health risks associated with reuse of wastewater for irrigation*. *Egyptian*

Journal of Petroleum, 26(1), 95–102. Recuperado el 17 de septiembre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.01.003>

Skraber, S., Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., & Gantzer, C. (2004). *Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome*. *Water Research*, 38(12), 2927–2933. Recuperado el 14 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.041>

Tornevi, A., Bergstedt, O., & Forsberg, B. (2014). *Precipitation Effects on Microbial Pollution in a River: Lag Structures and Seasonal Effect Modification*. *PLoS ONE*, 9(5), e98546. Recuperado el 28 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098546>

UNESCO. (2009). *El agua en un mundo en constante cambio*, 16. Recuperado el 16 de septiembre del 2017 de <http://www.unesco.org/>

UNESCO. (2016). *Agua Sociedad y Cooperación*. Recuperado el 10 de diciembre del 2017 de <http://unesdoc.unesco.org/images/0023/002350/235029s.pdf>

UNESCO. (2017). *Aguas residuales: El recurso desaprovechado*. Recuperado el 15 de diciembre del 2017 de <http://unesdoc.unesco.org/images/0024/002476/247647s.pdf>

Vasco, G., Trueba, G., Atherton, R., Calvopiña, M., Cevallos, W., Andrade, T., Eisenberg, J. N. S. (2014). *Identifying etiological agents causing diarrhea in low income Ecuadorian communities*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3), 563–569. Recuperado el 14 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0744>

Venegas, C., Diez, H., Blanch, A. R., Jofre, J., & Campos, C. (2015). *Microbial source markers assessment in the Bogotá River basin (Colombia)*. *Journal of Water and Health*, 13(3), 801–810. Recuperado el 11 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.2166/wh.2015.240>

- Vidal, X. (2016). OBRAS DE INTERCEPCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES PARA QUITO Y PARROQUIAS. Recuperado el 15 de agosto del 2017 de http://www.aguaquito.gob.ec/downloads/1vision_general_de_proyecto.pdf.
- Vieira, C. B., de Abreu Corrêa, A., de Jesus, M. S., Luz, S. L. B., Wyn-Jones, P., Kay, D., Miagostovich, M. P. (2016). *Viruses Surveillance Under Different Season Scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. Food and Environmental Virology*, 8(1), 57–69. Recuperado el 23 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9226-8>
- Vierheilig, J., Frick, C., Mayer, R. E., Kirschner, A. K. T., Reischer, G. H., Derx, J., Farnleitner, A. H. (2013). *Clostridium perfringens is not suitable for the indication of fecal pollution from ruminant wildlife but is associated with excreta from nonherbivorous animals and human sewage. Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 5089–5092. Recuperado el 16 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1128/AEM.01396-13>
- Villacís, B., & Carrillo, D. (2011). Estadística Demográfica en el Ecuador: Diagnóstico y Propuestas. Recuperado el 18 de noviembre del 2017 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Libros/Demografia/documentofinal1.pdf>.
- Vizcarra, R., Lasso, R., & Tapia, D. (2015). La Leche del Ecuador. *Centro De La Industria Láctea Del Ecuador*, 183. Recuperado el 1 de diciembre del 2017 de http://www.pichincha.gob.ec/phocadownload/publicaciones/la_leche_del_ecuador.pdf
- Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., Lev, O. (2015). *Emerging pollutants in the Esmeraldas*

watershed in Ecuador: discharge and attenuation of emerging organic pollutants along the San Pedro–Guayllabamba–Esmeraldas rivers. Environ. Sci.: Processes Impacts, 17(1), 41–53. Recuperado el 12 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1039/C4EM00394B>

Wazny, K., Zipursky, A., Black, R., Curtis, V., Duggan, C., Guerrant, R., Bhutta, Z. A. (2013). *Setting Research Priorities to Reduce Mortality and Morbidity of Childhood Diarrhoeal Disease in the Next 15 Years. PLoS Medicine*, 10(5). Recuperado el 6 de noviembre del 2017 de <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001446>

WHO. (2005). *Water Recreation and Disease: Viruses. Water Recreation and Disease*. Recuperado el 30 de noviembre del 2017 de http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/recreadis.pdf

WHO. (2008). Faecal pollution and water quality. Recuperado el 10 de septiembre del 2017 de http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1-chap4.pdf

WHO. (2011). *Technical guidance on water-related disease surveillance Technical guidance on water*. Recuperado el 15 de septiembre del 2017 de <http://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/technical-guidance-on-water-related-disease-surveillance-2011>

WHO, & UNICEF. (2017). JMP launch version July 12 2017. Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene - 2017 Update and SDG Baselines. Recuperado el 10 de noviembre del 2017 de <http://www.wipo.int/amc/en/%0Ahttp://www.who.int/about/>

Wiggins, B. A., Cash, P. W., Creamer, W. S., Scott, E., Garcia, P. P., Gerecke, T. M., Stevens, E. N. (2003). *Use of Antibiotic Resistance Analysis for Representativeness Testing of Multiwatershed Libraries Use of Antibiotic Resistance Analysis for Representativeness Testing of Multiwatershed Libraries*, 69(6), 3399–3405. Recuperado el 1 de agosto del 2017 de <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3399>

Wong, K., Fong, T. T., Bibby, K., & Molina, M. (2012). *Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. Environment International, 45*(1), 151–164. Recuperado el 12 de agosto del 2017 de <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.02.009>

Wu, J., Rees, P., & Dorner, S. (2011). *Variability of E. coli density and sources in an urban watershed. Journal of Water and Health, 9*(1), 94–106. Recuperado el 13 de diciembre del 2017 de <https://doi.org/10.2166/wh.2010.063>

ANEXOS

Anexo 1

Procedimiento detallado de extracción de ADN

1. Pipetear 560 ul de buffer AVL en un tubo de 1.5 ml de tubo de microcentrífuga, si la muestra es mayor a 140 ul se debe incrementar la cantidad de buffer AVL proporcionalmente y se debe de emplear un tubo más grande.
2. Colocar 140 ul de la muestra en el buffer AVL y mezclar por pulse-vortexing por 15 s, para mejorar el proceso de lysis, es necesario realizar una mezcla a fondo hasta conseguir una mezcla homogénea.
3. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por un tiempo de 10 min.
4. Transcurrido este tiempo añadir 560 ul de etanol (96-100 %) a la muestra y mezclar por pulse-vortexing por 15 s.
5. A continuación, centrifugar por 20 s para sedimentar la materia orgánica existente que pueda inhibir los siguientes procesos.
6. Cuidadosamente aplicar 630 ul de la solución obtenida en el paso 5 a la columna QIAmp mini column (en 2 ml collection tube), sin mojar los bordes, cerrar las tapas y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. Colocar la columna dentro de un tubo de colección limpio y descartar el tubo que contiene el filtrado.
En el caso de que la solución no haya atravesado por completo toda la membrana es necesario centrifugar de nuevo a máxima revolución hasta que pase toda la solución.
7. Cuidadosamente abra la columna y repita el paso 6.
8. Cuidadosamente abrir las columnas y colocar 500 ul de buffer AW1, cerrar la tapa y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. Colocar la columna en un tubo limpio de 2 ml y descartar el tubo que contiene el filtrado.
No es necesario colocar más volumen de buffer si el volumen inicial de la muestra era superior a 140 ul.

9. Cuidadosamente abrir la columna y añadir 500 ul del buffer AW2. Cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad (20 000xg o 14 000 rpm) por 3 min. Continuar al paso 11 y si no se desea mantener el buffer AW2 seguir al paso 10.
10. Colocar la columna en un tubo nuevo y descartar el anterior con el filtrado y finalmente centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.
11. Colocar la columna en un tubo de 1.5 ml limpio, descartar el tubo antiguo con el filtrado, cuidadosamente abra la columna y adicionar 60 ul de buffer AVE, cerrar la tapa e incubar a temperatura ambiente por 1 min. A continuación, centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 min. Una sola elución de 60 ul tiene aproximadamente un porcentaje de recuperación del 90%, si se realiza dos eluciones de 40 se puede incrementar en un 10% más el porcentaje de recuperación.

El ARN viral es estable por un año cuando es almacenado a -30, -15 y -70°C

- El volumen final de la extracción está entre los 80 y 100 ul

Anexo 2

Tabla con Secuencia de estándares empleados en qPCR, Gblocks

Virus	Secuencia
HAdV	ATGATGCCGCAATGGTCTTACATGCACATCGCCGGGCAGGACG CCTCGGAGTATCTGAGCCCGGGCACACACACACACCTGGTGCA ATTTGCCCGCGCCACCGATACGTAATTCAGCCTGGGGAACAAG TTCAGAAATCCCCTGCGATTCTGCGCAGTCGACCGCGAGGAC ACCGCTTATTCTTACAAAGTGCCTTTACGCTGGCCGTGGGCGA CAACCGGGTGTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCG GCGTGCTGGATCG
PAdV	TCCCCGGATGTCATGGACAACGTCAACCCCTTCAACCACCACGGCT CCTGGGCAACGGCCGCTACTGCAAGTTCCACATCCAGGTGCCGAAA AGTTCTTTGCCCTCAAGAGCCTGCTGCTCCTGCCGGGGGCGACCGGCC AACGTCACCAACCTGCCATCTCCATTCCCAGCCGCAACTGGCCGCAT CAGCATCCAGTTCGACTCCTCCGTGGCCTGCACACCCATGGACACAGA GATGGCCTCTTTCTCACAGCTGCAGACATTGTGGGCATGATTACCAAG CCAGACAGTGGGCACATGGCTTTTCGTGGGCTCCCAAGTACTTCAAT GTCACTCTAAGAAAGAGAGTGGTTAAGAACCATATCCTGTTAGACA TTGCTGAACCTCTCTTTTCAAATCTTATGCCAGATTGGAAGGCCAGG CCATGACTGGAGATAAATCC
BPyV and Ch/TyPV	GAAAAGGTATTCGCCCTCTGCTGGTCAAGGCTCAGCAATATGTGAGGATTTCAA AGCCCCCTATCATCCCACAGTACCCAGGTGCTAGATCCTACCCTCAAGGGAATTC TAGACAAAGATGGTGTGTATCCTGTTGAGTGTGGTGCCAGATCCAAGTAAAA ATGAACCGCTTCTTGATGAGAATGGCGTAGGCCCGCAGACTGGTGAAGAACCCA TACCCCATGGCCAGCATACTCACACCCATGGACACGGTAATTGGAATTGTGATC TATATGGGCTGAAAATAAGCCGCCATTGTGTCTGTCTTATGCGTGACATGGATC AGCGTGCACTTTAGTCCACGAGATTGGCAACAAGTAAATAATTATTTCGAGA TGGCGCCCACGCGCCACACACAGTACACGTGAAAATCTTTAACCTGCAAGTCA TCCAGAAAACCGTAACAGATAGCTGACAGGAACAATCCAAATATTTGCAGATCA GGAAGG

Anexo 3

Tabla con descripción detallada de los usos de suelo

Río	Nombre	COBERTURA	USO	DESCRIPCIÓN	CRITERIO
Pita	1,1PI	Eriales	Tierras improductivas	Afloramiento rocoso, mina y grava	Improductivo
	1,2PI	Eriales	Tierras improductivas	Afloramiento rocoso, mina y grava	Improductivo
	1,3PI	Eriales	Tierras improductivas	Afloramiento rocoso, mina y grava	Improductivo
	1,4PI	Agropecuario	Agrícola y conservación	50% Pasto Cultivado - 50% PARAMO	Agrícola
	2,1PI	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	2,2PI	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	2,4PI	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	3,1PI	Bosques	Forestal	Bosque Plantado	Agrícola
	3,2PI	Bosques	Forestal	Bosque Plantado	Agrícola
	3,4PI	Bosques	Forestal	Bosque Plantado	Agrícola
	3,5PI	Antrópico	Antrópico	Área Urbana	Antrópico
	SANTA CLARA	Antrópico	Antrópico	Área Urbana	Antrópico
San Pedro	1,1SP	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	1,3SP	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	1,4SP	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	2,1SP	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	2,5SP	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	3,1SP	Bosques	Conservación	Bosque Natural	Conservación
	3,2SP	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	3,3SP	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	SP1	Antrópico	Antrópico	70% Área Urbana/ 30% Frutales	Antrópico
	SP2	Antrópico	Antrópico	70% Área Urbana/ 30% pasto cultivado	Antrópico
	SP3	Antrópico	Antrópico	Área Urbana	Antrópico
	SP4	Antrópico	Antrópico	Área Urbana	Antrópico
	SP5	Antrópico	Antrópico	Área Urbana	Antrópico
	SP6	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
	SP7	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario
M8	Agropecuario	Agropecuario mixto	70% Pasto cultivado/ 30% cultivos	Agrícola	
TAMB	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario	
JAM	Agropecuario	Pecuario	Pasto Cultivado	Pecuario	
Machángara – Monjas	M1	Agropecuario	Agrícola	Cultivos de ciclo corto	Agrícola
	M2	Antrópico	Antrópico	Área Urbana	Antrópico
	M3	Antrópico	Antrópico	Área Urbana	Antrópico
	M7	Antrópico	Antrópico	Área Urbana	Antrópico
Guayllabamba	M5	Agropecuario	Agrícola	Cultivos de ciclo corto	Agrícola
	M6	Eriales	Tierras improductivas	Área Erosionada	Improductivo
	M9	Agropecuario	Agrícola	Cultivos de ciclo corto	Agrícola

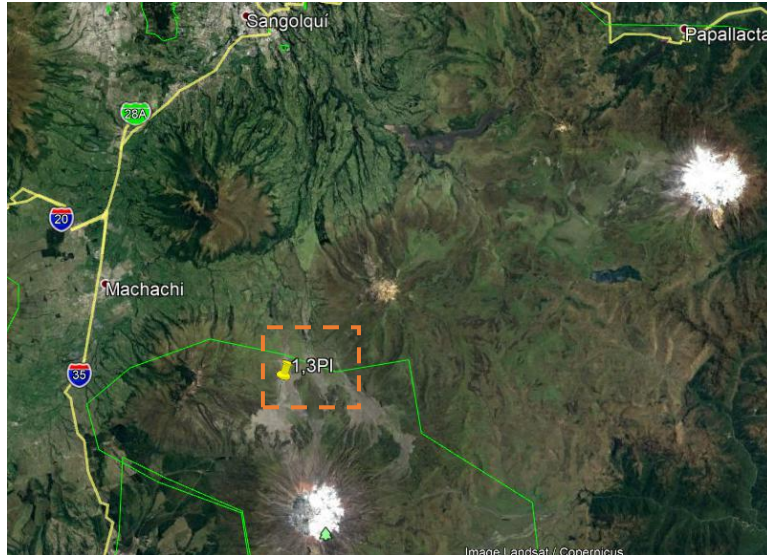
Anexo 4

Porcentajes de recuperación por medio de floculación con leche descremada

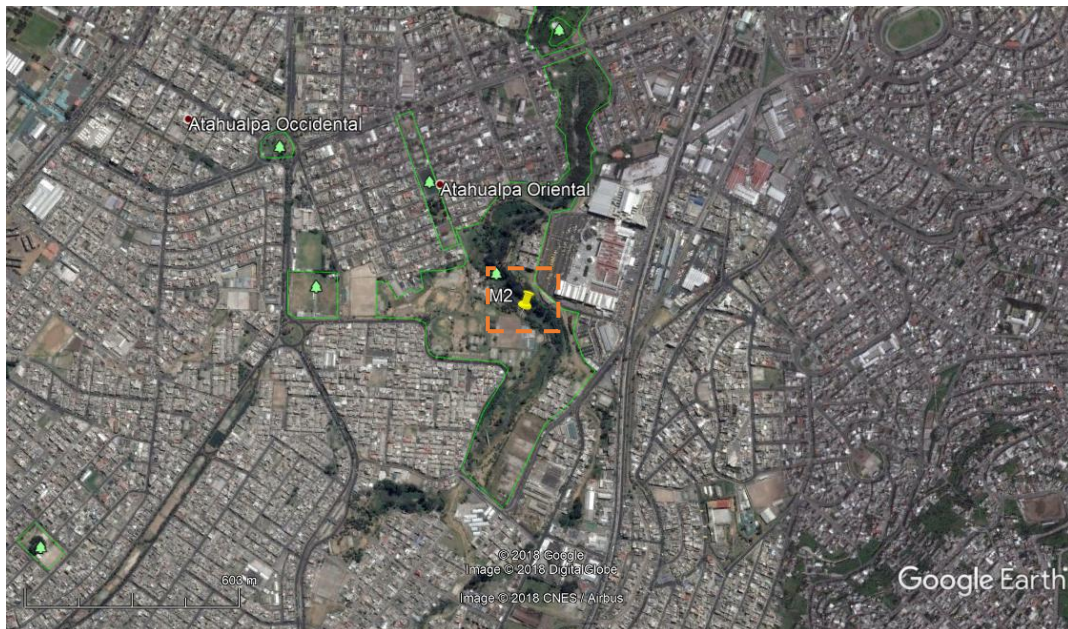
Porcentajes de Recuperación		
Muestra	Época Lluviosa	Época Seca
1,1PI	1,5%	5,5%
1,2PI	4,5%	3%
1,3PI	1,1%	0%
1,4PI	1%	8,2%
2,1PI	1,15%	40%
2,2PI	2%	0%
2,4PI	0,75%	0%
3,1PI	1,3%	0%
3,2PI	2%	0%
3,4PI	0,5%	57%
3,5PI	1,95%	0,7%
1,1SP	3,7%	0%
1,3SP	0,4%	2%
1,4SP	1,15%	11,5%
2,1SP	0,1%	55%
2,5SP	0,7%	0%
3,1SP	1,05%	6%
3,2SP	1,25%	17%
3,3SP	0,1%	0%
SP1	0%	4%
SP2	41%	57%
SP3	1,2%	6%
SP4	50,95%	11,5%
SP5	11,35%	20%
SP6	1,95%	0%
SP7	0,7%	22%
M1	3,3%	30,5%
M2	0%	3%
M3	155,9%	45,1%
M5	5,8%	12,76%
M6	109%	3,7%
M7	0,2%	0%
M8	115,05%	15,5%
TAMB 1	2%	112%
JAM	6%	103%
SANTA CLARA	5,2%	11%

Anexo 5

Imágenes satelitales de puntos que obtuvieron resultados relevantes considerando su concentración y su ubicación geográfica.

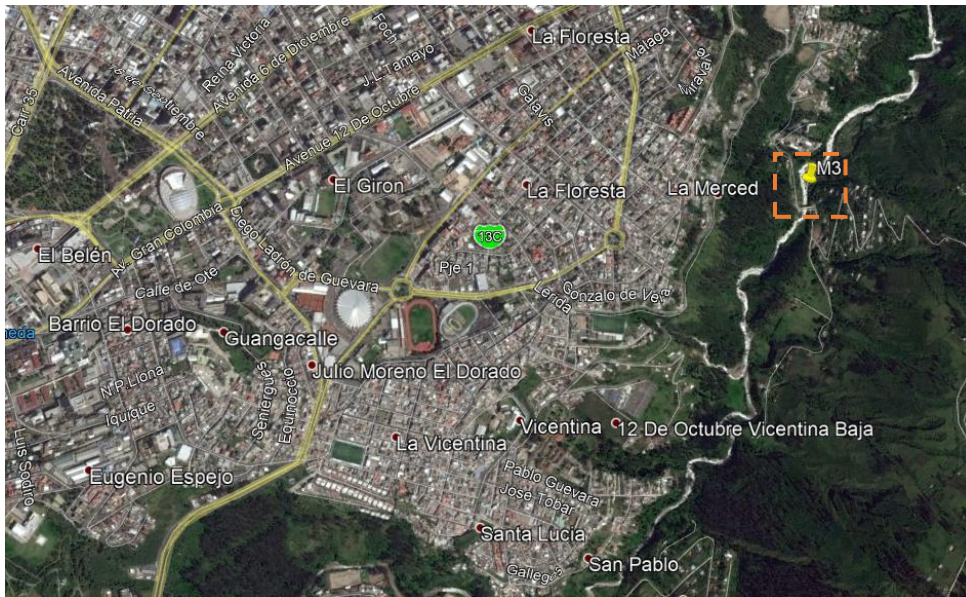


Anexo 5.1. El punto 1,3PI es un punto en el cual la baja concentración de contaminantes y la ausencia de *E. coli* puede ser explicada por la amplia distancia de este punto con lugares poblados, además de la protección que puede implicar que se encuentre dentro del parque nacional Cotopaxi.



Anexo 5.2. El punto M2 fue el punto que presentó la concentración más elevada de *E. coli* y ChPV, este punto se encuentra rodeado por una zona altamente

urbanizada en el sur de la ciudad de Quito acarrando la contaminación generada por la zona más densamente poblada de la ciudad

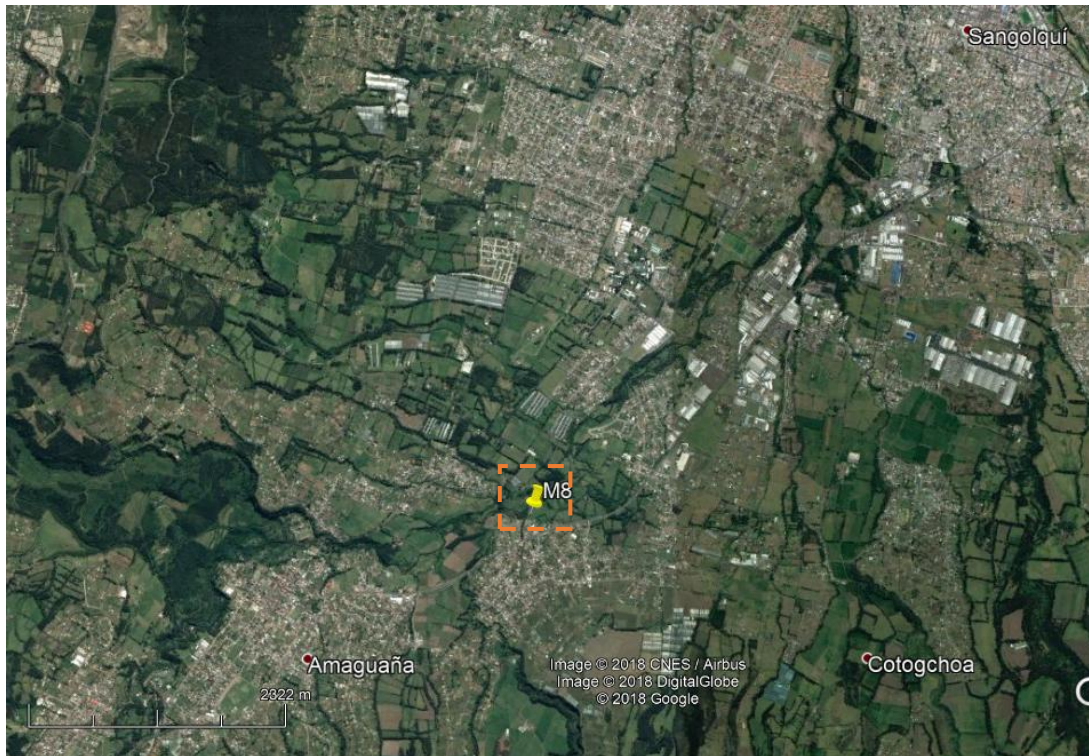


Anexo 5.3. El punto M3 es el que presenta la mayor concentración de HAdV en la cuenca, este punto se encuentra recibiendo aportes constantes de aguas residuales del sur, centro y parte del norte de la ciudad de Quito. Al pasar cerca de esta parte del río se puede experimentar el deterioro de esta subcuenca.



Anexo 5.4 El punto JAM se encuentra en sobre el río San Pedro, en este punto la principal fuente de contaminación proviene de la crianza de bovinos. Esta

actividad es ampliamente realizada en la zona por la gran producción lechera existente en el cantón Mejía.



Anexo 5.5. La mayor contaminación fecal generada por la crianza de cerdos, fue identificada en el punto M8 sobre el río San Pedro.

