



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LA CONTAMINACIÓN FECAL HUMANA EN BAHÍA  
CONCEPCIÓN Y SU POTENCIAL IMPACTO EN LA SALUD HUMANA DE LA  
POBLACIÓN COSTERA**

FERNANDO GONZALO LAGOS CABRERA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

Diciembre 2022

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

**DISTRIBUCIÓN ESTACIONAL DE LA CONTAMINACIÓN FECAL HUMANA EN BAHÍA  
CONCEPCIÓN Y SU POTENCIAL IMPACTO EN LA SALUD HUMANA DE LA  
POBLACIÓN COSTERA**

Por

FERNANDO GONZALO LAGOS CABRERA

Profesor guía

Dr. RODRIGO RENÉ GONZÁLEZ SALDÍA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

DICIEMBRE, 2022

**Universidad de Concepción**

## **Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas**

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor Guía:

Dr. Rodrigo González Saldía  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Marcus Sobarzo Bustamante  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

Dr. Renato Quiñones Bergeret  
Dir. Centro Interdisciplinario Investigación Acuícola (INCAR)  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

Coordinadora Seminario de Título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat  
Departamento de Oceanografía  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción, Concepción

## **AGRADECIMIENTOS**

Al finalizar esta larga etapa universitaria me es imposible no sentir un gran sentimiento de agradecimiento a distintas personas queridas que, sin su apoyo incondicional y palabras de aliento, nada de esto sería posible.

Agradecer de manera especial a mi madre Patricia Lagos por ser un pilar fundamental durante todo este periodo, por sus consejos, risas y consuelos desde el comienzo de esta hermosa vida universitaria. A mi abuela Blanca Fuentealba, quien siempre me ha dado mucho más de lo que he pedido, sea apoyo, consejo, o su amor incondicional. Mi tío Eduardo Lagos, quien me ha inspirado y enseñado a como ser un buen profesional y buen hombre. En definitiva, por todas las alegrías, sueños, cuidados y guía para llegar a esta meta, gracias.

También quisiera agradecer a mi profesor tutor, Dr. Rodrigo González S., por toda su energía y paciencia invertida en mí desde el ingreso a la carrera hasta la fecha, y por creer en mis capacidades e incentivar me a crecer en la ciencia.

Difícil es encontrar las palabras y terminar de agradecerle a mi pareja Ingrid Aravena por su infinito amor y creer en mí, por apoyarme, darme energías y aliento cada vez que lo necesitaba en esta dura etapa final. A mis inseparables amigos Pablo, Rodrigo y Nicolás, y a mis hermanos cófrades de la Tuna Universidad de Concepción, por las siempre oportunas e interminables charlas, el aguante y la comprensión de cada uno durante esta epopeya universitaria.

Finalmente, agradecer al proyecto VRID asociativo 218.112.110-1.0, de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, Universidad de Concepción, y al Programa de Observación Costera para la Docencia e Investigación en Ciencias del Mar, Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Concepción, por financiar la presente tesis con respecto a la facilitación de datos, muestras y también por los reactivos suministrados durante todo el periodo experimental.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>Pág.</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
METODOLOGÍA	17
PROGRAMA DE MUESTREO	17
DETERMINACIÓN DE HMTDNA POR QPCR	19
Extracción de ADN Total	19
Cuantificación del HmtDNA	19
OBTENCIÓN DE DATA METEOROLÓGICA	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	20
RESULTADOS	21
DETERMINACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL Y SUS PATRONES DE DISTRIBUCIÓN EN BAHÍA CONCEPCIÓN	21
Parámetros fisicoquímicos	21
Distribución de la contaminación fecal humana y biomasa microbiana viva en la columna de agua y borde costero de Bahía Concepción	21

RELACIÓN ENTRE LA VARIABILIDAD ESTACIONAL DE LA CONTAMINACIÓN FECAL HUMANA EN BAHÍA CONCEPCIÓN Y LA INCIDENCIA DE ENFERMEDADES TALASOGÉNICAS (HEPATITIS A) DE LA POBLACIÓN HUMANA COSTERA	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág</b>
	.
<b>Figura 1.-</b> Emisarios submarinos que descargan en bahía Concepción.	18
<b>Figura 2.-</b> Área de estudio. a) Estaciones de muestreo zona de barrido del borde costero (Cochohue, Playa el Morro, Bellavista, Lirquén, Cerro Verde Bajo, Playa Negra, Interportuaria, A-21, Tumbes). (Google Earth. 2021). b) Estaciones de muestreo para columna de agua (E1, E2, E3, E4, E5, E6). (Google Earth. 2021).	20
<b>Figura 3.-</b> Correlación (Log-Log) entre los coliformes fecales (CF) y el ADN mitocondrial humano (HmtDNA) determinados en columna de agua y zona de barrido de Bahía Concepción entre el invierno 2018 y primavera 2019.	25
<b>Figura 4.-</b> Correlación (Log-Log) entre biomasa microbiana viva (ATP) y los coliformes fecales determinados en Bahía Concepción (columna de agua y zona de barrido) entre el invierno 2018 y primavera 2019.	25
<b>Figura 5.-</b> Correlación (Log-Log) entre coliformes fecales (CF) y HmtDNA determinados en Bahía Concepción durante el periodo 2018-2019 para: a) columna de agua; b) zona de barrido	26
<b>Figura 6.-</b> Promedios estacionales de coliformes fecales de todos los datos obtenidos..	26
<b>Figura 7.-</b> Promedios estacionales de coliformes fecales para la zona de barrido y columna de agua. Destacado en rojo el límite de la Norma Chilena N°1333.	26
<b>Figura 8.-</b> Concentración de coliformes fecales por puntos de muestreo de columna de agua y zona de barrido por estaciones del año; a) invierno 2018; b) primavera 2018; c) verano 2019; d) otoño 2019; e) primavera 2019. El límite máximo permitido por NCh.1333 corresponde a línea roja horizontal.	28



<b>Figura 9.-</b> Comparación de porcentajes de puntos de muestreo por sobre NCh.1333 entre zona de barrido y columna de agua durante el periodo invierno 2018 y primavera 2019	30
<b>Figura 10.-</b> Régimen de vientos anuales acumulados para el año 2018 (a) y 2019 (b), Carriel Sur, Concepción, Chile (DGAC).	31
<b>Figura 11.-</b> Densidad de puntos de casos de hepatitis A año 2015 y emisarios submarinos en las comunas costeras de la provincia de Concepción, región del Biobío, Chile. (MINSAL 2017).	35
<b>Figura 12.-</b> Promedio estacional número de casos de hepatitis A para la región del Biobío según información reportada por MINSAL 2019.	36
<b>Figura 13.-</b> Promedio estacional ( $\pm$ desviación estándar) del número de casos de hepatitis A en función del promedio estacional de HmtDNA ( $\pm$ desviación estándar) para todos los datos obtenidos.	36
<b>Figura 14.-</b> Correlación entre promedio estacional del número de casos de hepatitis A ( $\pm$ desviación estándar) para la región del Biobío, y el logaritmo del promedio ( $\pm$ desviación estándar) de coliformes fecales estacionales en zona de barrido.	37

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág</b>
<b>Tabla 1.-</b> Emisarios submarinos presentes en Bahía Concepción, de acuerdo con Superintendencia de Servicios Sanitarios de Chile (SISS-Chile) y su población asociada (CENSO 2017).	18
<b>Tabla 2.-</b> Coordenadas y rótulos de los puntos de muestreo utilizados en columna de agua y zona de barrido del borde costero de Bahía Concepción.	19
<b>Tabla 3.-</b> Parámetros fisicoquímicos (promedios $\pm$ desviación estándar), por estaciones del año, para Bahía Concepción durante el periodo de muestreo comprendido entre 2018-2019.	23
<b>Tabla 4.-</b> Promedios estacionales ( $\pm$ desviación estándar), de coliformes totales, fecales, ADN mitocondrial humano (HmtDNA) y biomasa microbiana viva (ATP), para todos los datos y disgregado por estaciones del año para la zona de barrido del borde costero y la columna de agua de Bahía Concepción.	26
<b>Tabla 5.-</b> Distribución de casos de hepatitis A, según región de residencia. Chile, SE 1 – 52, años 2018 y 2019 y mediana 2014 - 2018. Obtenida de BOLETÍN EPIDEMIOLOGICO TRIMESTRAL: HEPATITIS A, SE 1 – 52, AÑO 2019 (MINSAL 2019).	34

## RESUMEN

La contaminación fecal del océano costero es una problemática mundial y una de las principales preocupaciones, tanto para salud humana, como para la sustentabilidad de los ecosistemas. Bahía Concepción, región del Biobío (Chile), es un interesante caso de estudio puesto que está rodeada de una importante población humana que descarga ahí sus aguas residuales (102.313 habitantes). Se realizaron 5 campañas durante los años 2018 y 2019, para evaluar el grado y distribución de la contaminación fecal en esta bahía y su impacto sobre la salud humana. Se obtuvieron muestras de la columna de agua y de la zona de barrido de las olas en las playas, para la determinación de colimetría total y fecal, cuantificación del ADN mitocondrial humano (HmtDNA) y la biomasa microbiana viva (ATP). Además, se determinaron los parámetros fisicoquímicos del agua de mar (pH, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto), y las condiciones meteorológicas durante el periodo de estudio (viento). Los resultados mostraron una correlación significativa entre los coliformes fecales y el ADN mitocondrial humano (Log-Log;  $r^2=0,279$ ; valor- $p < 0,001$ ) que indican que el área de estudio recibe permanentemente una fuerte carga de material fecal humano, con valores de colimetría fecal promedio aproximadamente 33 veces sobre la Norma chilena NCh. 1333. Además, los microorganismos alóctonos contaminantes que se descargan a la bahía, pueden llegar a representar aproximadamente un tercio de la biomasa microbiana viva presente en este ecosistema. El análisis de la distribución estacional de este tipo de contaminación muestra que en general la zona de barrido presenta valores de colimetría fecal más altos que la columna de agua, con la excepción del verano de 2019, donde, en promedio toda la bahía se encuentra contaminada hasta 84 veces sobre NCh.1333. Esto sugiere que el borde costero, recibe el aporte de material fecal humano a través de fuentes difusas distintas a la contaminación que existe en la columna de agua, como por ejemplo el río Andalién, y los esteros que desaguan en la bahía (Collén, Bellavista, Lirquén, Penco).

En el caso del verano de 2019, todo el borde costero se encuentra fuertemente contaminado, posiblemente debido al importante incremento de la población flotante durante el verano que visitan esta área.

Los resultados también muestran una fuerte correlación entre el promedio estacional de los casos de hepatitis A de la población humana costera, con los promedios estacionales de HmtDNA ( $r^2=0,9158$ ; valor  $p= 0,011$ ) y colimetría fecal ( $r^2= 0,8381$ ; valor  $p=0,0290$ ). De lo anterior se desprende que la fuerte contaminación fecal humana de Bahía Concepción podría tener una incidencia en los casos de HAV en la población humana costera. Finalmente, el aumento significativo de esta contaminación durante el verano, indica la importancia del diseño de los sistemas sanitarios en áreas que reciben una

alta afluencia de turistas, de tal manera que permita el cuidado de la salud de la población y la sustentabilidad de las actividades económicas del borde costero.

## ABSTRACT

Fecal pollution of the coastal ocean is a worldwide problem and one of the main concerns both for human health and the sustainability of ecosystems. Concepción Bay, Biobio region (Chile), is an interesting case study since it is surrounded by a significant human population that discharges its wastewater into the bay (102,313 inhabitants). 5 field campaigns were carried out during 2018 and 2019, to evaluate the degree and distribution of fecal pollution in this bay and its impact on human health. Samples were obtained from the water column and from the swash zone, for the determination of total and fecal colimetry, quantification of human mitochondrial DNA (HmtDNA) and live microbial biomass (ATP). In addition, the physicochemical parameters of seawater (pH, temperature, salinity, dissolved oxygen), and the meteorological conditions during the study period (wind) were determined. The results of the total data show a significant correlation between fecal coliforms and human mitochondrial DNA (Log-Log;  $r^2=0.279$ ; p-value  $<0.001$ ), indicating that the study area permanently receives discharges of human fecal material, with average values of fecal colimetry approximately 33 times above the Chilean norm NCh. 1333. Also, the polluting allochthonous microorganisms that are discharged into the bay can represent approximately one third of the living microbial biomass present in this ecosystem. The analysis of the seasonal distribution of this type of pollution shows that, in general, the coastline presents higher fecal colimetry values than the water column, except for the summer of 2019, when, on average, the pollution of entire bay was up to 84 times over NCh.1333. This suggests that the coastline receives the contribution of human fecal material through diffuse sources other than the contamination produced by the discharges into the water column, such as the Andalién river, and the creeks that drain into the bay (Collén, Bellavista, Lirquén, and Penco creek, between others).

In the case of the summer of 2019, the entire bay is heavily polluted, possibly due to the significant increase in the floating population during this season.

The results also show a strong correlation between the seasonal average of hepatitis A cases of the coastal human population, with the seasonal averages of HmtDNA ( $r^2=0.9158$ ; p-value= 0.011) and fecal colimetry ( $r^2= 0.8381$ ; p-value=0.0290). From the above it can be deduced that the strong human fecal pollution of Bahía Concepción could have an incidence in the cases of HAV in the coastal human population. Finally, the significant increase in this pollution during the summer indicates the importance of designing sewerage system in areas that receive a high influx of tourists, in such a way

that it allows the health care of the human population and the sustainability of the economic activities in the coastal zone.

## INTRODUCCIÓN

La salud humana se encuentra íntimamente relacionada con la salud del ecosistema, pero a pesar de que el deterioro de la calidad de agua y sostenibilidad de los océanos afecta a billones de personas, esta relación océano-salud humana se encuentra relativamente poco estudiada (Borja et al. 2020). Los ecosistemas marinos, que brindan a la humanidad un sin número de servicios, se ven diariamente impactados por actividades y desechos antropogénicos, dentro de los cuales se encuentran los efluentes de aguas residuales con o sin tratamiento, alterando la salud de los océanos y afectando potencialmente la salud humana (Bagi & Skogerbø 2022).

Para detectar y prevenir la contaminación y polución de los cuerpos de agua, se utilizan distintos métodos de monitoreo de calidad del agua, donde mediante el uso de indicadores, se ha descrito que las zonas costeras son las que reciben el mayor impacto de la descarga de aguas residuales con poco o nulo tratamiento (Devlin et al. 2021; Graves et al. 2021). Son estas descargas, al provenir de distintas fuentes, las que componen un verdadero “cocktail” de contaminantes que se incorporan al mar (Devlin et al. 2021). En éstas podemos encontrar microbios, nutrientes (nitratos y fosfatos), residuos farmacéuticos, microorganismos patógenos, los cuales tienen un impacto tanto en la salud humana como en la salud del ecosistema (Borja et al. 2020).

La contaminación fecal humana de los cuerpos de agua (medio marino y agua dulce), ha provocado un aumento de las enfermedades talasogénicas, vale decir, enfermedades infecciosas directamente relacionadas con la descarga de aguas residuales a sistemas de agua (Shuval et al. 2003; Belkin & Colwell 2006; González-Saldía et al. 2019). Si bien la utilización de bacterias indicadoras de contaminación fecal como *E. coli* es una técnica ampliamente usada y aceptada, es importante conocer la fuente de origen de contaminación, para ello, el monitoreo de fuentes de contaminación fecal (Faecal Source Tracking, FST) o de fuentes de contaminación microbiana (Microbial Source Tracking, MST) surge para resolver la incógnita (Harwood et al. 2014). Es de importancia crucial determinar si la fuente de la contaminación fecal de las aguas es de origen humano o animal, debido a que las primeras presentan patógenos potencialmente dañinos específicos humanos, como el virus de la hepatitis A u otros (Karkman et al. 2019). Cabe destacar también que, la abundancia de genes de

resistencia a antibióticos (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) se explicaría por la contaminación fecal humana con bacterias resistentes, en vez de una selección por la presión de los antibióticos presentes en las aguas residuales o zonas de descargas de éstas (Karkman et al. 2019). Estudios han descrito que a pesar de que las plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTPs) logran disminuir significativamente la carga química y microbiana durante el tratamiento de estas, grandes cantidades de bacterias resistentes a antibióticos logran transportarse hacia el medio acuático (Osińska et al. 2017). Se ha demostrado también que la remoción incompleta de antibióticos y genes de resistencia antimicrobiana presentes en las aguas residuales, incluso posterior al tratamiento, afectó severamente el cuerpo de agua receptor de estas descargas, y además favorece la propagación o diseminación de patógenos potencialmente dañinos para la salud humana y animal (Rodríguez-Mozaz et al. 2015). Para determinar si la procedencia u origen de la fuente de contaminación es humana se utilizan sustancias químicas (fármacos, cafeína, etc) o marcadores moleculares, por ejemplo, ADN mitocondrial Humano (HmtDNA por sus siglas en inglés, Human mitochondrial DNA) (Harwood et al. 2014, González-Saldía et al. 2019).

Actualmente se ha enfatizado en determinar si existe una distribución estacional de la contaminación fecal en distintas bahías alrededor del mundo, así, Zi-lin Wei (2021) determinó que existe una mayor presencia de virus entéricos humanos en las estaciones cálidas, atribuidas a la descarga de aguas residuales y a la cantidad de bañistas que co-contribuyen a su dispersión y abundancia. Méry Ndione (2022), estableció que los factores ambientales que impulsan la abundancia de bacterias indicadoras fecales (FIB) son la temperatura del agua en verano, mientras que en invierno son la lluvia y nutrientes disueltos. Del mismo modo se destaca la importancia en la vigilancia de la calidad de agua de las costas para disminuir el grave impacto en salud humana y marina, la economía adyacente a la bahía y sus recursos hidrobiológicos, sobretodo en playas de uso recreativo, buscando además impulsar políticas de monitoreo, optimización del diseño de plantas de tratamiento de aguas y sus descargas, y brindar información actualizada para mejorar la toma de decisiones para salvaguardar la salud pública y socioeconómica de la población costera. (Cuitiva 2012; Cacciabue et al. 2014; Sojobi et al. 2021; Kongprajug et al. 2021; Wei et al. 2021; Victoria et al. 2022)

Se ha reportado recientemente la presencia del virus de la hepatitis A en moluscos de importancia ambiental (*Perumytilus purpuratus*; y comercial (choro zapato, cholga y almejas) en la región del Biobío, Chile, atribuida al impacto antropogénico de las descargas de material fecal humano en la zona costera (González-Saldía et al. 2019; Sanhueza & Cachicas 2020). Para esta zona también se ha descrito una correlación espacio-temporal entre la Colimetría Fecal, el ADN mitocondrial humano, y

ATP para dicha bahía, y una concordancia temporal con los máximos de hepatitis A, lo que evidencia el problema para la salud pública de este tipo de contaminación (González-Saldía et al. 2019). Así también se han reportado, de acuerdo con el Ministerio de Salud (MINSAL), máximos de Hepatitis A en la región del Biobío para los años 2018 y 2019 atribuidas al impacto de descargas de emisarios submarinos ubicados en la zona, fallas en la recolección y tratamiento de aguas residuales, afloramiento de aguas servidas y consumo de mariscos crudos (MINSAL 2019).

Bahía Concepción es una bahía semicerrada abierta al norte en la costa de la región del Biobío. La bahía se encuentra dentro de una gran área oceanográfica perteneciente al Sistema de la Corriente de Humboldt (SCH). El SCH, se caracteriza por presentar grandes eventos de surgencia y una permanente zona mínima de oxígeno, así como ser una de las zonas de mayor productividad primaria en el mundo (Daneri et al. 2000; González-Saldía et al. 2019). Bahía Concepción presenta una forma casi rectangular de 10 x 16 km, poco profunda (alrededor de 48m de profundidad máxima) y con una suave pendiente de norte a sur. En la zona norte se encuentra conectada a mar abierto a través de la Boca Chica (1,8 km de ancho y 15 m de profundidad) y Boca Grande (5 km de ancho y 44 m de profundidad). Esta bahía recibe el aporte de dos emisarios submarinos, ubicados frente a las comunas de Penco y Tomé (SISS-Chile). Estos sistemas de tratamiento de aguas residuales descargan en el orden de toneladas de material fecal a la bahía al día e impactan potencialmente la salud de la población humana costera. No obstante, existen muy pocos estudios sistemáticos que permitan determinar cuál es el grado de contaminación fecal de esta bahía (Seguel et al. 2001; Bertin 2011; González-Saldía et al. 2019). Cabe destacar que la normativa chilena (Norma Chilena NCh N°1333.Of78. Modificada 1987, Requisitos de Calidad de Agua para diferentes usos. Chile.) establece que para aguas recreacionales de uso directo el número máximo de coliformes fecales / 100mL debe ser menor o igual a 1000 NMP (Número Más Probable). Además, el DECRETO 144/2009 Establece normas de calidad primaria para la protección de las aguas marinas y estuarinas aptas para actividades de recreación con contacto directo. En el artículo 3, Tabla 1 para aguas marinas o estuarinas que se utilicen para actividades de recreación con contacto directo establece un valor máximo permitido de coliformes fecales de 1000 NMP/100mL. Asimismo, en el artículo 4, Tabla 2 del mismo decreto se establece que, en caso de que los valores de coliformes fecales sean >1000 NMP/100mL, determinará una situación de emergencia ambiental.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el grado y variabilidad estacional de la dispersión de la contaminación fecal humana en Bahía Concepción y su potencial impacto en la salud humana de la población costera.

## **HIPÓTESIS:**

La variabilidad estacional de la contaminación fecal humana en Bahía Concepción se correlaciona significativamente con los casos de hepatitis A de la población humana costera.

### **Objetivo general**

Evaluar el grado y variabilidad estacional de la dispersión de la contaminación fecal humana en bahía Concepción y su potencial impacto en las enfermedades talasogénicas (hepatitis A) de la población humana costera.

### **Objetivos específicos**

- 1.- Determinar los patrones de distribución de la contaminación fecal humana en la zona de barrido y columna de agua de la Bahía Concepción bajo la influencia estacional (verano, otoño, invierno y primavera)
- 2.- Determinar si existe una relación entre la variabilidad estacional de la contaminación fecal humana en Bahía Concepción y la incidencia de enfermedades talasogénicas (hepatitis A) de la población humana costera.





## METODOLOGÍA

### *Programa de muestreo*

El área de estudio corresponde a la Bahía Concepción, región del Biobío, Chile, es una bahía semicerrada abierta al norte, que presenta una forma casi rectangular de 10x16km, poco profunda (alrededor de 48m de profundidad máxima). Esta área recibe el aporte de dos emisarios submarinos (Fig. 1; Tabla 1; SISS-Chile), uno ubicado frente a la comuna de Penco ( $36^{\circ}44'00''\text{S } 72^{\circ}59'00''\text{O}$ ) y otro frente a la comuna de Tomé ( $36^{\circ}37'02''\text{S } 72^{\circ}57'27''\text{O}$ ).

Tabla 1.- Emisarios submarinos presentes en Bahía Concepción, de acuerdo con Superintendencia de Servicios Sanitarios de Chile (SISS-Chile) y su población asociada (CENSO 2017).

Comuna	% población servida al alcantarillado	Descargas ( $\text{m}^3/\text{mes}$ )	Año de construcción	Tamaño población al 2017
Tomé	100	191.761	1994	54.946
Penco-Lirquén	100	211.064	1993	47.367

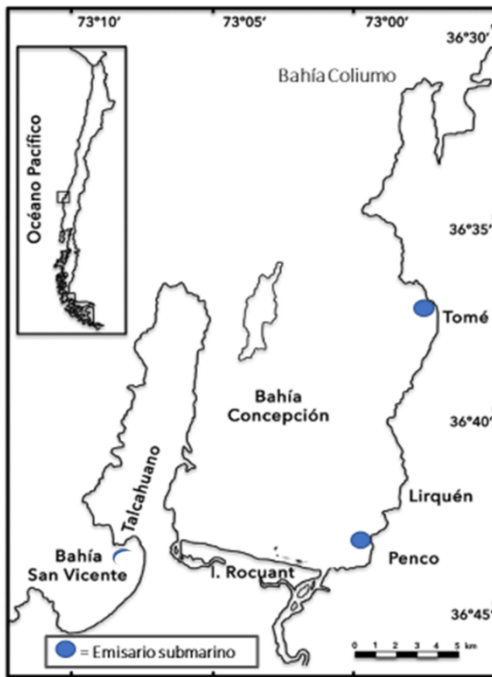


Figura 1. Emisarios submarinos que descargan en bahía Concepción.

Para evaluar el grado de contaminación fecal y determinar sus patrones de distribución se realizaron 5 campañas estacionales (13 muestreos y 147 muestras analizadas en total), durante el 2018 y 2019. En

cada campaña se tomaron muestras en 6 estaciones de columna de agua (Fig.2a; Tabla 2) y 9 estaciones del borde costero de la Bahía Concepción (Fig. 2b; Tabla 2). En la columna de agua se obtuvieron muestras de los estratos 0, 10 y 20 m, utilizando botellas Niskin de 10L y en el borde costero las muestras fueron obtenidas de la zona de barrido de la ola (zona swash) La temperatura y salinidad de las estaciones de muestreo fueron determinadas utilizando Star-Oddi Data Logging System, el pH mediante un pHmetro Hanna-HI98128 y el oxígeno por el método de Winkler. Las muestras se llevaron al Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de Organismos Marinos del Departamento de Oceanografía de la Universidad de Concepción, y se analizaron en no más de 3 horas posterior a su obtención. El número más probable (MPN) de coliformes totales y fecales en el agua (APHA, 2005) se determinó mediante el protocolo PRT-712.03-005 (ISP, 2010). Además, se prefiltraron submuestras de 0,5 L y 1 L de cada muestra a través de tamices de nytex de 100  $\mu\text{m}$  y luego se filtraron (presión de vacío  $\leq 100$  mmHg) en filtros de membrana de polietersulfona y éster de celulosa mixto (Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ ) para futuros análisis de HmtDNA y biomasa microbiana viva (ATP), respectivamente. El ATP se cuantificó mediante un ensayo de bioluminiscencia (Holm-Hansen y Both, 1966; Karl, 1980) utilizando un medidor de ATP Turner Design Model TD 20/20.

Tabla 2: Coordenadas y rótulos de los puntos de muestreo utilizados en columna de agua y zona de barrido del borde costero de Bahía Concepción.

	Estaciones	Latitud	Longitud
Columna de agua	E1	36°43.370 S	73°01.340 W
	E2	36°42.260 S	73°00.070 W
	E3	36°40.060 S	72°59.690 W
	E4	36°37.380 S	72°58.281 W
	E5	36°36.340 S	72°59.370 W
	E6	36°41.068 S	73°3.0258 W
Zona de barrido	Cocholgue	36°35.352 S	72°58.457 W
	El Morro	36°43.201 S	73°06.173 W
	Bellavista	36°38.095 S	72°57.253 W
	Lirquén	36°42.202 S	72°58.374 W
	Cerro Verde Bajo	36°43.453 S	72°58.376 W
	P. Negra	36°44.112 S	73°01.063 W
	Interportuaria	36°44.135 S	73°00.301 W
	A-21	36°71.768 S	73°10.742 W
	Tumbes	36°64.697 S	73°08.532 W

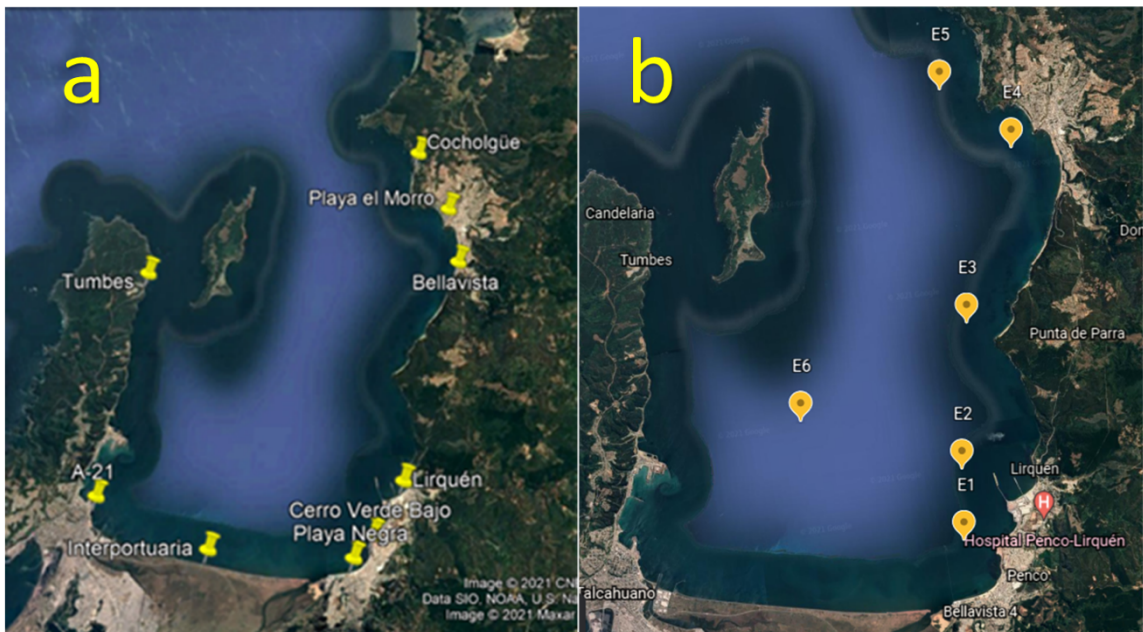


Figura 2. Área de estudio. a) Estaciones de muestreo zona de barrido del borde costero (Cocholgue, Playa el Morro, Bellavista, Lirquén, Cerro Verde Bajo, Playa Negra, Interportuaria, A-21, Tumbes). (Google Earth. 2021). b) Estaciones de muestreo para columna de agua (E1, E2, E3, E4, E5, E6). (Google Earth. 2021).

***Determinación de HmtDNA por qPCR:***

a) Extracción de ADN total

El ADN total se extrajo de filtros con 0,25 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 20 mM pH 5,2, EDTA 50 mM, SDS al 10% (P / V) y proteinasa K (10 mg ml<sup>-1</sup>), seguido por incubación a 50 °C durante 10 min y posterior congelación durante 15 min. Este procedimiento se repitió tres veces. La mezcla de lisis se extrajo con fenol saturado y cloroformo-alcohol isoamílico (24,1). Los ácidos nucleicos se precipitaron con 2,5 volúmenes de etanol al 95% (vol / vol) a -20 °C, se incubó a -20 °C durante la noche y se centrifugó a 21.000 g durante 20 min. El sedimento de ADN se enjuagó dos veces con etanol al 70%, se secó y se disolvió en 100 µL de agua estéril. La concentración y pureza del ADN se estimó mediante Nanodrop 2000. La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis (100 V, 45 min) en gel de agarosa al 1%, teñido con RedGel.

b) Cuantificación del HmtDNA.

Los ensayos de qPCR basados en TaqMan se realizaron en un Rotor Gene 6000 Corbett. Cada reacción contenía 10 µL de Universal PCR Master Mix 2 × (Taq enzima polimerasa, dNTPs 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, tampón Taq), 1,2 µL de ADN extraído, 4 µL de cada cebador (HcytB-F = 5'-CCTCCA AATCACCACAGGACTAT-3' y HcytB-R = 5'-CGTGAAGGTAGCGGAT GATTC -3) y 0,8 µL de sonda Taqman (HProbe = 5'-FAM-CAATCG CCCACATCACTCGAGACGT-TAMRA-3' ; Baker-Austin et al., 2010), en un volumen de reacción de 20 µL. Se generaron curvas estándar utilizando diluciones en serie de 10 veces (10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> copias µL<sup>-1</sup>) de copias de ADN obtenidas de la amplificación por PCR de HmDNA. Número de copias (N) de ampliaciones de PCR, se estimaron según Kapoor et al. (2013), usando la ecuación  $N = [D / (AL \times 660)] \times 6.022 \times 10^{23}$ , donde D (g µL<sup>-1</sup>) es una concentración de ADN de amplificación de PCR y AL (en pares de bases) es la longitud de la ampliación. El límite de cuantificación (LOQ) se determinó en el rango lineal entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>8</sup> copias µL<sup>-1</sup> (rango r<sup>2</sup> de 0,96 a 0,99), correspondiente a 105 a 1011 copias 100 mL<sup>-1</sup>. Las eficiencias de amplificación por PCR estuvieron en el rango de 0,80 a 0,98 y el análisis de datos de la qPCR se realizó mediante el software Rotor Gene 1.7.

***Obtención de data meteorológica***

Junto con lo anterior, se complementó los datos de dirección de viento medidos durante las campañas, con la información meteorológica (viento, precipitación) disponible para la zona de acuerdo con la Dirección General de Aeronáutica Civil para la estación Carriel Sur, Concepción Ap.

(cod nacional 360019) de los años 2018 y 2019 en las fechas donde fueron realizadas las campañas antes nombradas.

Para determinar si existe una relación entre el régimen estacional de vientos dominantes, la distribución de la contaminación fecal humana en Bahía Concepción y la incidencia de casos de hepatitis A en la población humana costera, se realizaron análisis de dispersión y estadísticos (t-student) de los resultados obtenidos de coliformes fecales, biomasa microbiana viva (ATP), HmtDNA, y datos meteorológicos en la bahía, en conjunto con datos obtenidos del Ministerio de Salud (MINSAL 2019) y del número de casos reportados de hepatitis A para la población humana de la región del Biobío.

### ***Análisis estadísticos***

Se realizaron análisis estadísticos de los resultados obtenidos en el período de estudio asociado a las correlaciones entre los parámetros microbiológicos y bioquímicos. En un primer paso, se analizó la homogeneidad de la varianza de los datos mediante la prueba estadística de Bartlett y la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Luego, se determinaron las correlaciones entre coliformes fecales (CF), ADN mitocondrial humano (HmtDNA), biomasa microbiana viva (ATP), y número de casos de hepatitis A de la población humana de la región del Biobío, obteniendo el coeficiente de determinación y valor p. Además, para determinar su significancia, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Todos estos análisis se realizaron mediante MINITAB Statistical software.

## RESULTADOS

### 1.- Determinación de la contaminación fecal y sus patrones de distribución en Bahía Concepción.

#### a) Parámetros fisicoquímicos

De la totalidad de datos obtenidos durante el periodo de muestreo, los parámetros fisicoquímicos determinados en la columna de agua y la zona de barrido mostraron un rango de temperatura entre los 12 y 15 °C, de pH entre los 7 y 8,3 y el oxígeno entre 5,01 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup> y 6,37 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>. Los promedios de las mediciones de parámetros fisicoquímicos, tanto de zona de barrido como de columna de agua de Bahía Concepción por estación se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros fisicoquímicos (promedios ± desviación estándar) por estaciones del año, para Bahía Concepción durante el periodo de muestreo comprendido entre 2018-2019.

PROMEDIO PARAMETROS FISICO-QUIMICOS				
	pH	Temperatura °C	Oxígeno mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	Salinidad (PSU)
Invierno 2018	8,35 ± 0,30	12,73 ± 0,56	5,70 ± 1,16	31,00 ± 2,48
Primavera 2018	7,13 ± 0,08	13,48 ± 0,70	6,37 ± 1,05	32,41 ± 1,80
Verano 2019	7,43 ± 0,20	14,57 ± 0,94	5,84 ± 1,17	34,47 ± 0,60
Otoño 2019	7,87 ± 0,45	15,67 ± 1,37	5,01 ± 1,80	32,80 ± 0,30
Primavera 2019	7,42 ± 0,33	14,00 ± 0,86	5,54 ± 0,83	31,75 ± 0,09

El mayor valor promedio de pH fue determinado en invierno del 2018, la temperatura máxima promedio se registró en verano del 2019, y la concentración de oxígeno disuelto promedio tuvo su máximo durante verano 2019.

#### b) Distribución de la contaminación fecal humana y biomasa microbiana viva en la columna de agua y borde costero de Bahía Concepción

De acuerdo con los resultados de todos los datos obtenidos de los muestreos de colimetría total y fecal, biomasa microbiana viva (ATP), HmtDNA, el análisis estadístico muestra una correlación significativa (Log-Log;  $r^2=0,2789$ ; valor- $p<0,001$ ) entre la colimetría fecal y los valores HmtDNA lo que sugiere que, al menos, aproximadamente el 28% de la contaminación fecal de la bahía correspondería a contaminación fecal humana (Figura 3). Así también, el análisis de biomasa microbiana viva (ATP) y coliformes fecales muestran una correlación significativa ( $r^2=0,298$ ; valor- $p=0,000$ ) lo cual sugiere que la biomasa microbiana viva del total de las mediciones corresponde

aproximadamente en un 30% a bacterias entéricas (Fig. 4). El análisis de regresión de los datos de HmtDNA y coliformes fecales para la columna de agua y la zona de barrido por separado también muestran correlaciones significativas (Log-Log; valor- $p < 0,001$ ) en ambos casos, no obstante, poseen coeficientes de determinación muy similares ( $r^2 = 0,3726$   $r^2 = 0,3691$ ) para columna de agua y zona de barrido respectivamente), y mayores que el obtenido para el análisis de todos los datos (Fig. 5a, Fig. 5b).

El análisis por estación del año de la data total muestra un incremento significativo del promedio tanto los coliformes totales como fecales (valor- $p = 0,009$ ; valor- $p = 0,005$ ) durante el verano de 2019 (Tabla 4). De manera análoga, el análisis por separado del borde costero y columna de agua muestra que la primera presenta valores promedio significativamente mayores de coliformes totales durante el invierno 2018 (valor- $p = 0,04$ ), primavera 2018 (valor- $p = 0,004$ ) y otoño 2019 (valor- $p = 0,003$ ), en comparación a la columna de agua (Tabla 4). Así también, para los coliformes fecales se tiene que los resultados promedio de borde costero son significativamente mayores en las estaciones de primavera 2018 (valor- $p = 0,03$ ) y otoño 2019 (valor- $p = 0,006$ ), en comparación a la columna de agua (Tabla 4). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre columna de agua y zona de barrido para los coliformes fecales durante la estación de verano, puesto que ambas zonas muestran valores similares (Tabla 4).

El incremento significativo (valor- $p < 0,005$ ) del promedio de la colimetría fecal en el borde costero y columna de agua de Bahía Concepción durante el verano de 2019, se observa claramente en la Figura 6. Este incremento llegó a ser hasta 84 veces el valor máximo permitido por la norma chilena NCh.1333. de 1000 NMP/100mL (Fig. 6). Al separar los componentes en borde costero y columna de agua podemos observar (Fig. 7) que en general el total de las estaciones se encuentra por sobre la norma establecida (1000 NMP/100mL), para coliformes fecales en aguas con uso recreacional con contacto directo y que, además, existe una tendencia de valores menores en la columna de agua que en el borde costero, siendo significativamente menor solo para primavera 2018 y otoño 2019.



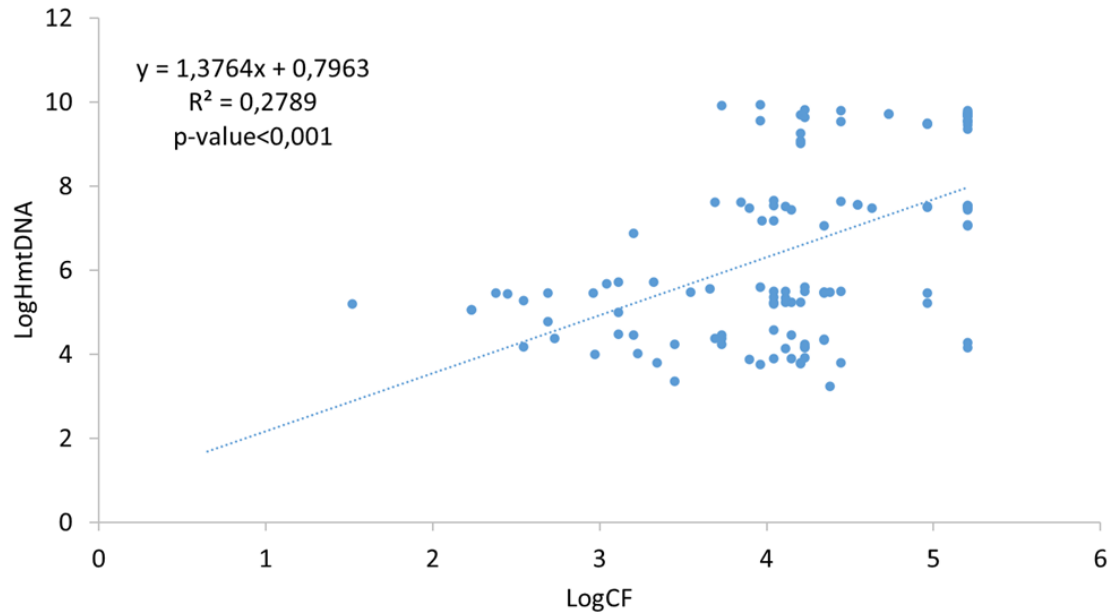


Figura 3: Correlación (Log-Log) entre los coliformes fecales (CF) y el ADN mitocondrial humano (HmtDNA) determinados en columna de agua y borde costero de Bahía Concepción entre el invierno 2018 y primavera 2019.

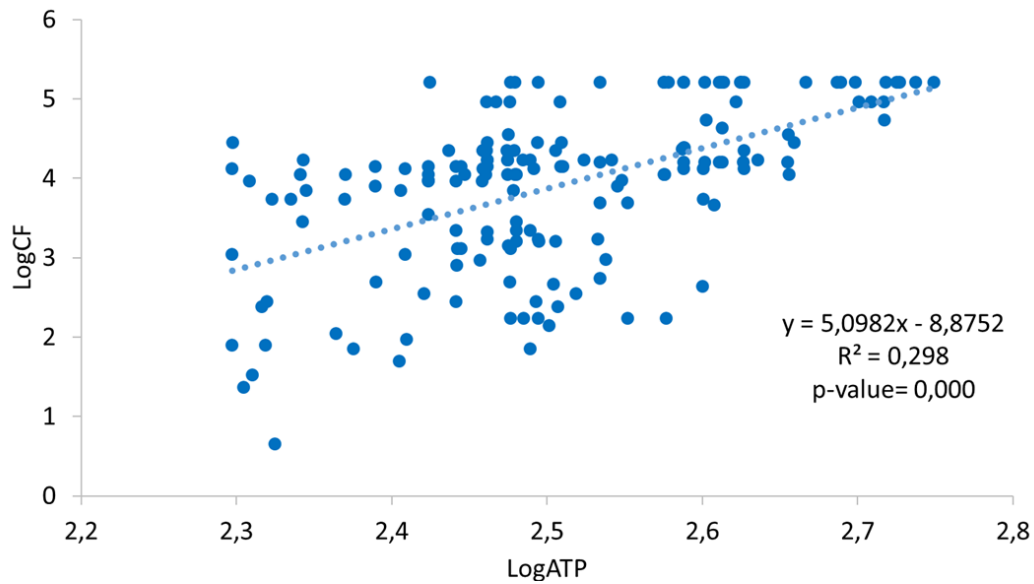


Figura 4: Correlación (Log-Log) entre biomasa microbiana viva (ATP) y los coliformes fecales determinados en Bahía Concepción (columna de agua y zona de barrido) entre el invierno 2018 y primavera 2019.

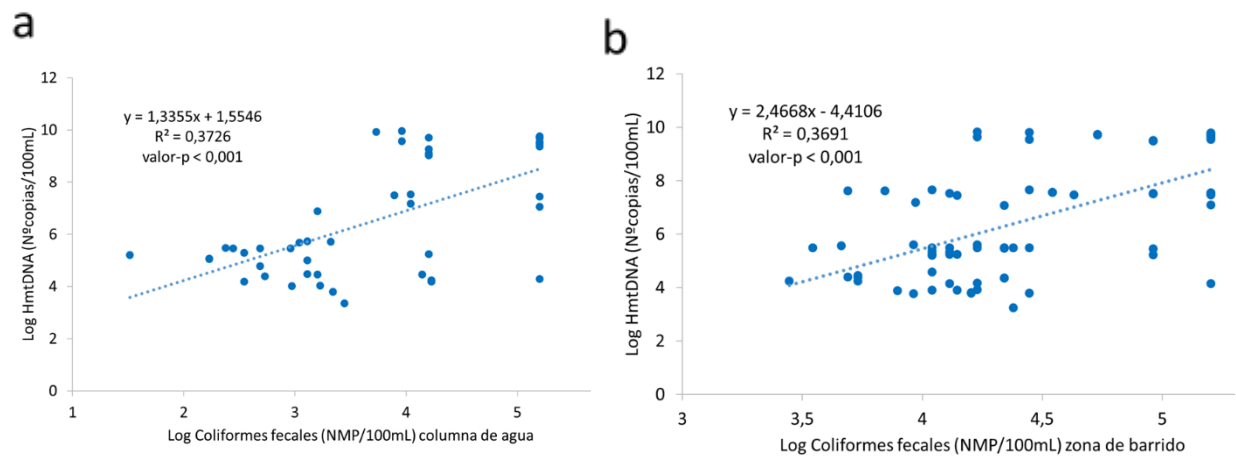


Figura 5: Correlación (Log-Log) entre coliformes fecales (CF) y HmtDNA determinados en Bahía Concepción durante el periodo 2018-2019 para: a) columna de agua; b) zona de barrido.

Tabla 4: Promedios estacionales ( $\pm$  desviación estándar), de coliformes totales, fecales, ADN mitocondrial humano (HmtDNA) y biomasa microbiana viva (ATP), para todos los datos y disgregado por estaciones del año para la zona de barrido del borde costero y la columna de agua de Bahía Concepción.

	Coliformes Totales (NMP/100mL)		Coliformes Fecales (NMP/100mL)		HmtDNA (N°copias/100mL)		ATP (pmol/L)	
	TOTAL	Playa	TOTAL	Playa	TOTAL	Playa	TOTAL	Playa
INVIERNO 2018	33.663 $\pm$ 59.018	65.045 $\pm$ 73.060 *	18.898 $\pm$ 39.306	27.162 $\pm$ 37.590	5,21E+08 $\pm$ 1,54E+09	9,42E+06 $\pm$ 1,59E+07	308,48 $\pm$ 105,74	349,92 $\pm$ 128,03
		Columna de agua 14.833 $\pm$ 40.731		Columna de agua 13.939 $\pm$ 40.749		Columna de agua 8,47E+08 $\pm$ 1,93E+09		Columna de agua 283,62 $\pm$ 85,07
PRIMAVERA 2018	37.165 $\pm$ 59.011	89.000 $\pm$ 71.420 *	24.593 $\pm$ 46.119	59.000 $\pm$ 62.710 *	1,43E+09 $\pm$ 2,83E+09	7,16E+08 $\pm$ 1,41E+09	312,82 $\pm$ 58,16	332,02 $\pm$ 59,53
		Columna de agua 6.063 $\pm$ 6.527		Columna de agua 3.948 $\pm$ 5.424		Columna de agua 2,01E+09 $\pm$ 3,57E+09		Columna de agua 301,30 $\pm$ 56,15
VERANO 2019	86.475 $\pm$ 70.811 *	108.000 $\pm$ 64.987	84.625 $\pm$ 72.554 **	104.889 $\pm$ 69.274	1,33E+09 $\pm$ 2,08E+09	6,98E+08 $\pm$ 1,80E+09	333,15 $\pm$ 52,58	332,72 $\pm$ 58,46
		Columna de agua 73.560 $\pm$ 73.129		Columna de agua 72.467 $\pm$ 74.051		Columna de agua 1,82E+09 $\pm$ 2,24E+09		Columna de agua 333,41 $\pm$ 58,46
OTOÑO 2019	38.779 $\pm$ 63.823	95.778 $\pm$ 76.166 *	14.478 $\pm$ 32.129	31.378 $\pm$ 48.880 *	1,19E+09 $\pm$ 2,03E+09	9,18E+08 $\pm$ 2,69E+09	321,03 $\pm$ 62,69	314,89 $\pm$ 73,52
		Columna de agua 4.580 $\pm$ 5.951		Columna de agua 4.339 $\pm$ 6.070		Columna de agua 5,10E+08 $\pm$ 7,39E+08		Columna de agua 324,71 $\pm$ 57,69
PRIMAVERA 2019	29.282 $\pm$ 52.355	41.444 $\pm$ 46.025	25.206 $\pm$ 52.660	31.244 $\pm$ 48.784	6,10E+08 $\pm$ 1,71E+09	7,81E+08 $\pm$ 2,17E+09	309,30 $\pm$ 61,59	288,03 $\pm$ 75,62
		Columna de agua 21.984 $\pm$ 56.040		Columna de agua 21.582 $\pm$ 56.199		Columna de agua 3,82E+08 $\pm$ 9,31E+08		Columna de agua 322,06 $\pm$ 49,98

\* Correlaciones significativas  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$

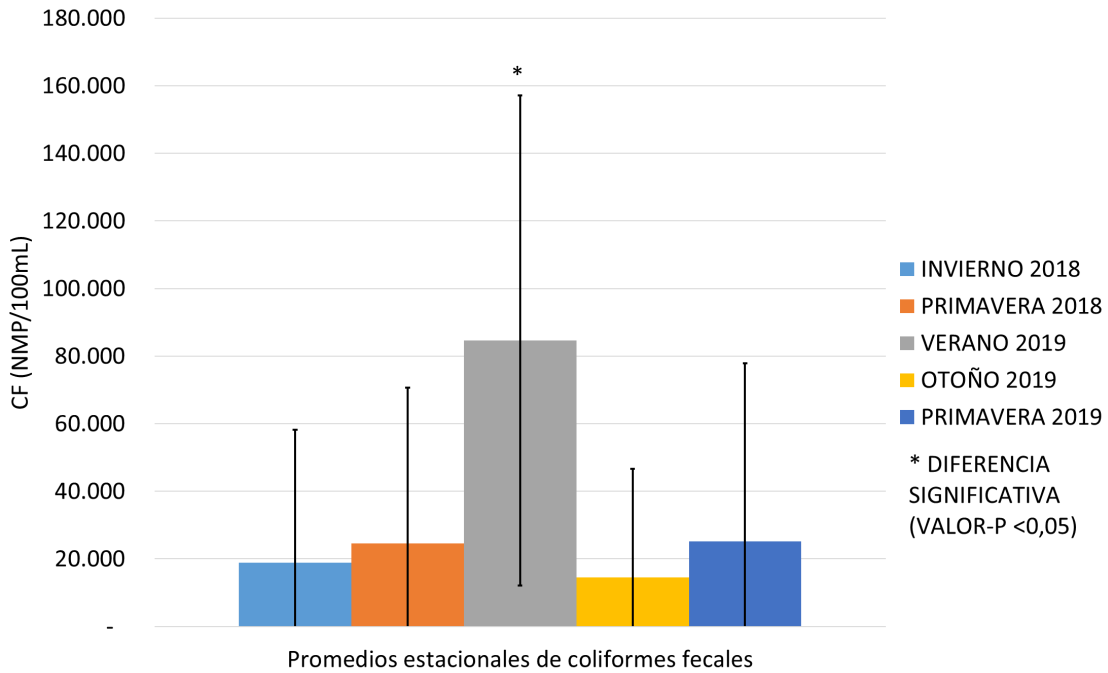


Figura 6.- Promedios estacionales de coliformes fecales de todos los datos obtenidos.

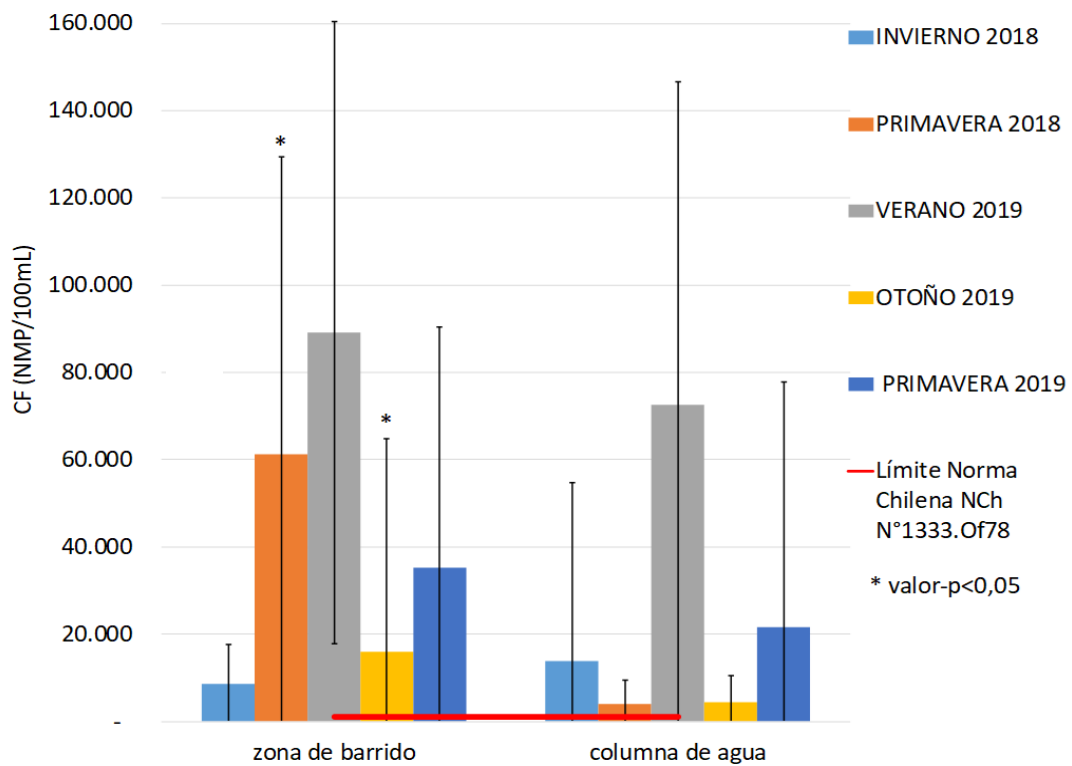
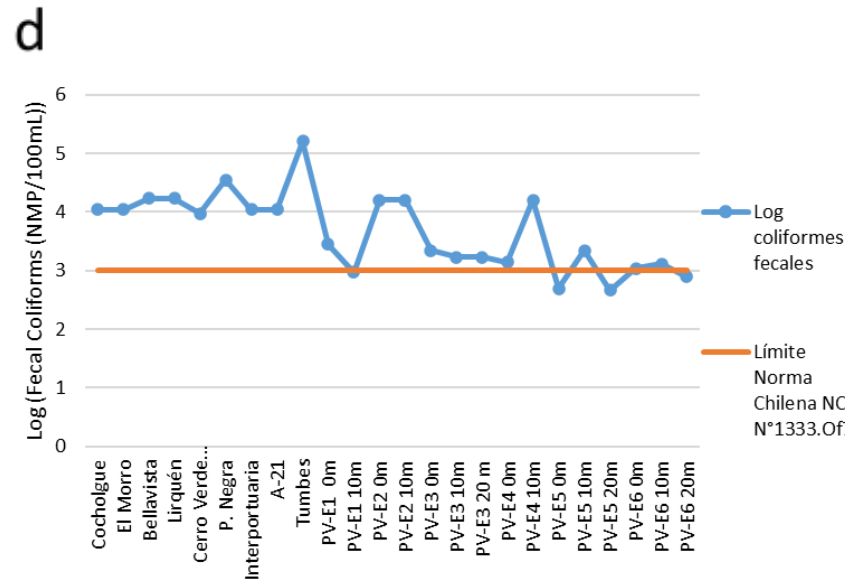
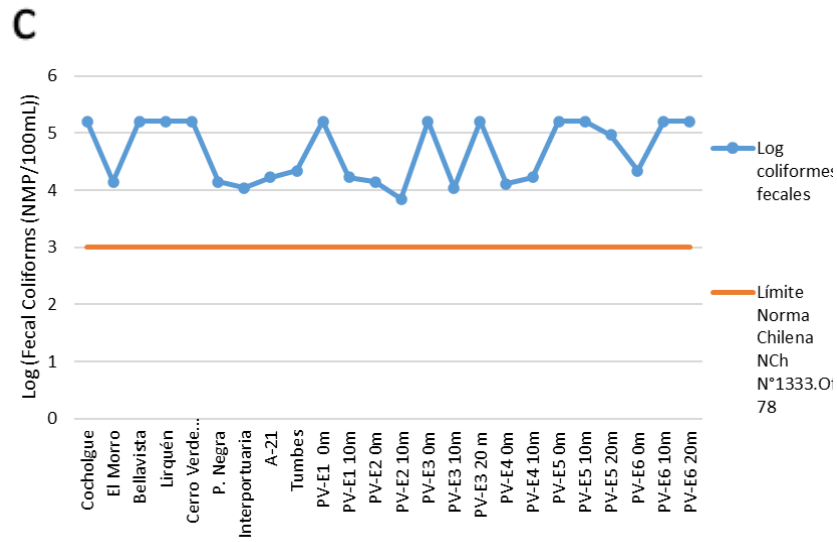
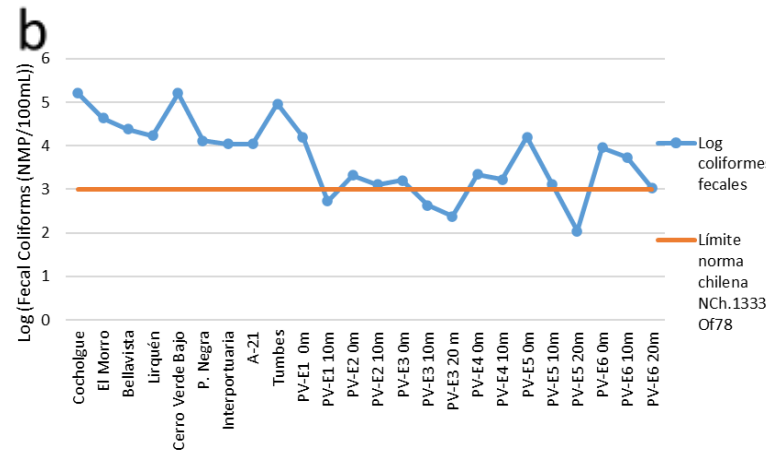
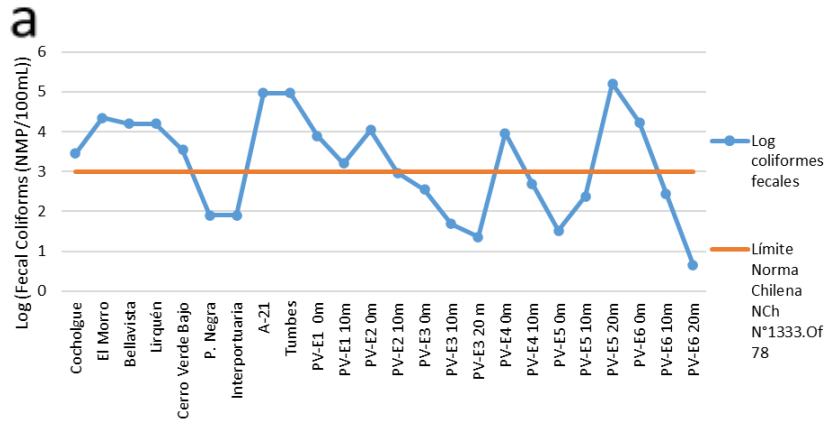


Figura 7.- Promedios estacionales de coliformes fecales para la zona de barrido y columna de agua. Destacado en rojo el límite de la Norma Chilena N°1333.

El análisis de los puntos de muestreo de columna de agua y zona de barrido por separado muestra que existe variabilidad entre la columna de agua y la zona de barrido con respecto a los puntos de muestreo y la norma NCh.1333 (Fig. 8; a, b, c, d, e). El detalle de este análisis muestra que, para la estación de invierno de 2018, 13/24 puntos de muestreo se encuentran por sobre la norma NCh.1333. Del mismo modo, para primavera de 2018 se observa que 20/24 puntos de muestreo se encuentran por sobre NCh.1333, donde los correspondientes al borde costero presentan valores de hasta dos órdenes de magnitud mayores que en la columna de agua, estando así muy por sobre el límite permitido (1000NMP/100mL). Cabe destacar el caso de la estación de verano de 2019 donde tenemos que la totalidad de los puntos de muestreo (24/24) tanto en columna de agua como borde costero se encuentran por sobre el límite de la NCh.1333, estando todas ellas entre 1 a 2 órdenes de magnitud mayor que el límite permitido, en algunos casos llegando al límite máximo de detección del método de colimetría por fermentación en tubos ( $>160.000$  NMP/100mL). La estación de otoño de 2019 muestra 21/24 puntos sobre NCh.1333, siendo significativamente mayores (valor- $p < 0,006$ ), los valores en la zona de barrido en comparación a la columna de agua, donde si bien es una disminución de los resultados en comparación a la estación de verano de 2019, casi la totalidad de los puntos de muestreo se encuentran por sobre la norma. De manera similar durante la estación de primavera de 2019 se observan 12/24 puntos sobre NCh.1333 donde los puntos de muestreo en la zona de borde costero muestran valores entre 1 a 2 órdenes de magnitud por fuera del límite máximo de la norma, lo cual no se observa en la columna de agua. En resumen, para todas las campañas realizadas siempre existe un mayor porcentaje de las muestras del borde costero por sobre la NCh.1333 en comparación con las muestras provenientes de la columna de agua (Fig. 9), con la sola excepción de la campaña de verano de 2019 donde el 100% de los puntos de muestreo tanto en el borde costero como columna de agua fueron observados sobre NCh.1333.

Los datos meteorológicos disponibles por la Dirección General de Aeronáutica Civil (DGAC) para la estación Carriel Sur, Concepción, Chile, muestra que el régimen de viento durante el periodo de estudio (2018-2019), presenta una distribución similar, con un dominio generalizado de los vientos SW (Fig. 10).





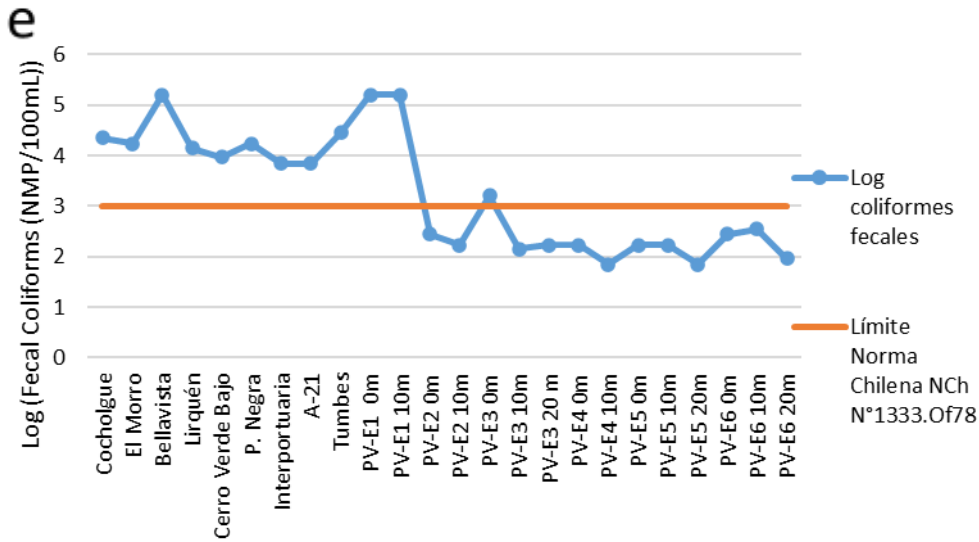


Figura 8: Concentración de coliformes fecales por puntos de muestreo de columna de agua y zona de barrido por estaciones del año; a) invierno 2018; b) primavera 2018; c) verano 2019; d) otoño 2019; e) primavera 2019. El límite máximo permitido por NCh.1333 corresponde a línea roja horizontal

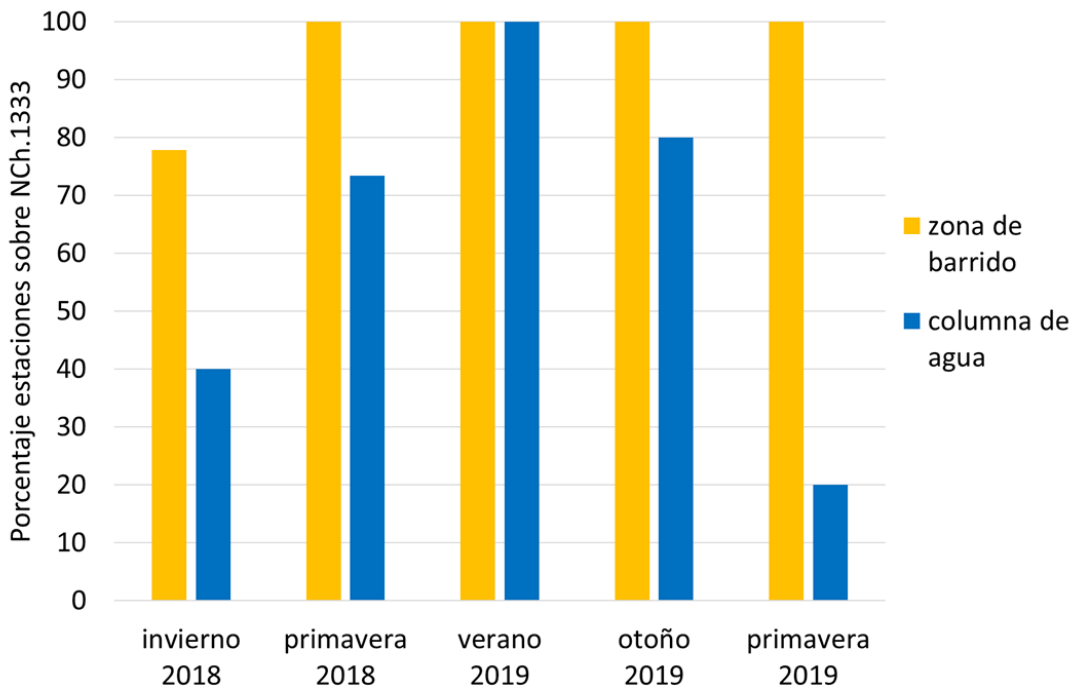


Figura 9: Comparación de porcentajes de puntos de muestreo por sobre NCh.1333 entre zona de barrido y columna de agua durante el periodo invierno 2018 y primavera 2019.



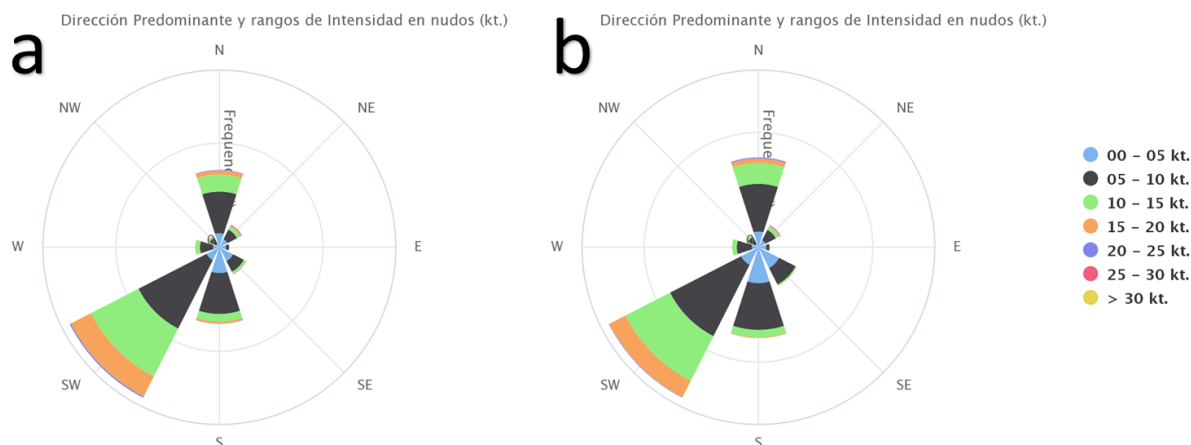


Figura 10.- Régimen de vientos anuales acumulados para el año 2018 (a) y 2019 (b), Carriel Sur, Concepción, Chile (DGAC).

**2.- Relación entre la variabilidad estacional de la contaminación fecal humana en Bahía Concepción y la incidencia de enfermedades talasogénicas (hepatitis A) de la población humana costera.**

Según el boletín epidemiológico trimestral del 2019 (MINSAL 2019) de la Hepatitis A en Chile, los valores más altos registrados a nivel nacional se encuentran en la región del Biobío durante los años 2018 y 2019, con una tasa, número de casos y mediana mucho mayores en comparación a las otras regiones del país (Tabla 5). Además, de acuerdo con el mismo informe, se tiene que son las comunas costeras las que presentan el mayor número de casos de Hepatitis A en comparación al resto de las comunas de la región del Biobío (MINSAL 2019). Así también, dicha entidad también informa que son las comunas costeras las que presentan una mayor densidad de casos de hepatitis A, como lo fue en el brote sufrido durante los años 2014-2015 en la región del Biobío (Fig.12)(MINSAL 2017). El análisis estacional del número de casos de hepatitis A para la región del Biobío muestra variabilidad durante el periodo de estudio comprendido entre 2018 y 2019, con valores máximos durante los meses de primavera 2018 y verano 2019 (Fig. 12). El análisis estadístico de los promedios estacionales del N° de copias/100mL de HmtDNA con los promedios estacionales del número de casos de hepatitis A

para la población humana costera de la región del Biobío, muestran una fuerte correlación significativa (Fig. 13;  $r^2= 0,9158$ ; valor  $p=0,011$ ). Análogamente, el análisis entre el logaritmo del promedio estacional de coliformes fecales en el borde costero (zona de barrido), con los promedios estacionales del número de casos de hepatitis A reportados para la región del Biobío, muestra también una fuerte correlación significativa (Fig. 14;  $r^2= 0,8381$ ; valor- $p= 0,0290$ ).

Tabla 5: Distribución de casos de hepatitis A, según región de residencia. Chile, SE 1 – 52, años 2018 y 2019 y mediana 2014 - 2018. Obtenida de BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO TRIMESTRAL: HEPATITIS A, SE 1 – 52, AÑO 2019 (MINSAL 2019)

Región	2018 SE 1 - 52		2019 SE 1 - 52		Mediana 2014 - 2018 SE 1 - 52
	Casos	Tasa*	Casos	Tasa*	Casos
Arica y Parinacota	14	5,6	59	23,1	14
Tarapacá	66	18,3	46	12,5	43
Antofagasta	225	34,6	19	2,9	76
Atacama	15	4,6	17	5,2	5
Coquimbo	55	6,8	46	5,6	34
Valparaíso	148	7,9	49	2,6	23
Metropolitana	1037	13,7	235	3,1	182
O'Higgins	23	2,4	11	1,2	13
Maule	77	7,2	25	2,3	29
Ñuble	113	23,1	57	11,6	90
Biobío	1242	74,6	434	25,9	981
Araucanía	50	5,0	20	2,0	50
Los Ríos	11	2,7	7	1,7	5
Los Lagos	17	2,0	18	2,1	7
Aisén	0	0,0	0	0,0	0
Magallanes	13	7,8	8	4,8	2
<b>Total</b>	<b>3106</b>	<b>16,7</b>	<b>1051</b>	<b>5,6</b>	<b>2121</b>

Fuentes: Base de datos ENO y base de datos EPIVIGILA. DEIS, DIPLAS - Ministerio de Salud de Chile.

\* Datos provisorios al 10 de enero de 2020

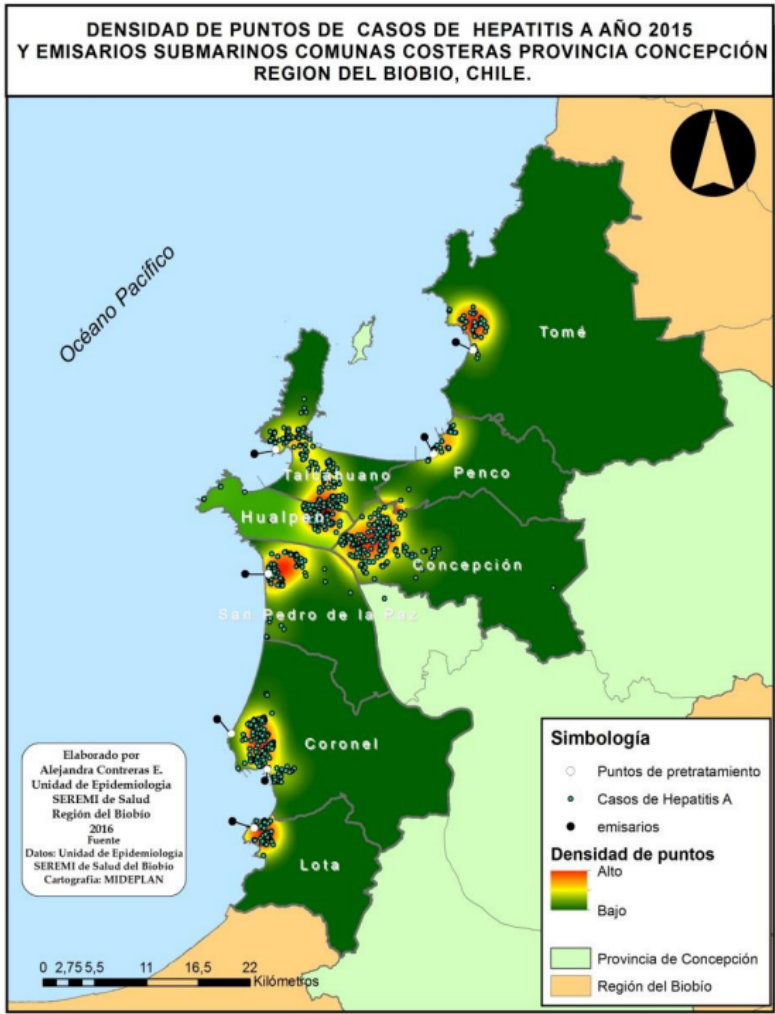


Figura 11.- Densidad de puntos de casos de hepatitis A año 2015 y emisarios submarinos en las comunas costeras de la provincia de Concepción, región del Biobío, Chile. (MINSAL 2017).

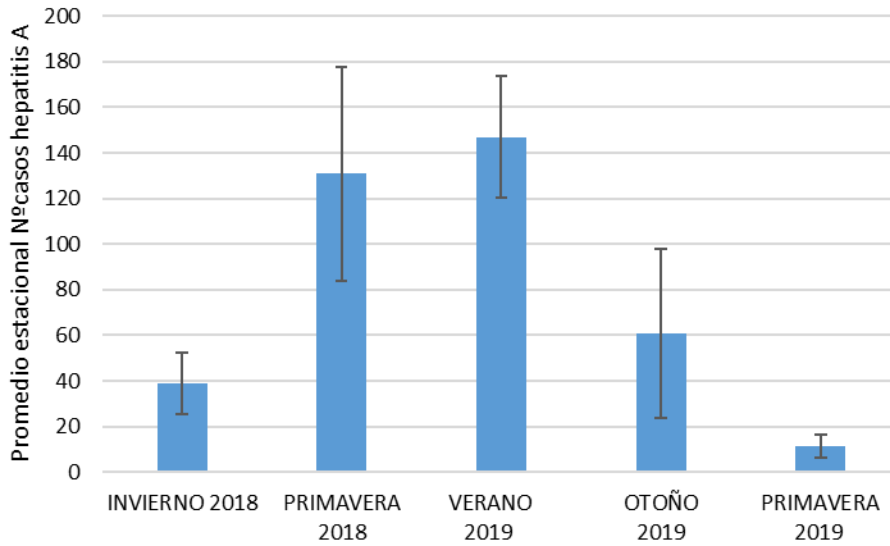


Figura 12.- Promedio estacional número de casos de hepatitis A para la región del Biobío según información reportada por MINSAL 2019.

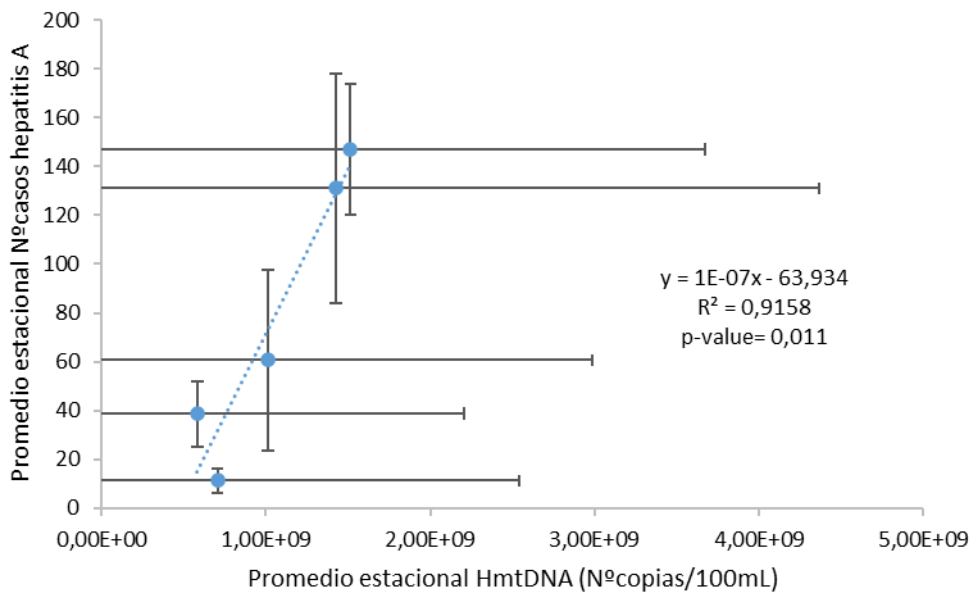


Figura 13.- Promedio estacional ( $\pm$  desviación estándar) del número de casos de hepatitis A en función del promedio estacional de HmtDNA ( $\pm$  desviación estándar) para todos los datos obtenidos.

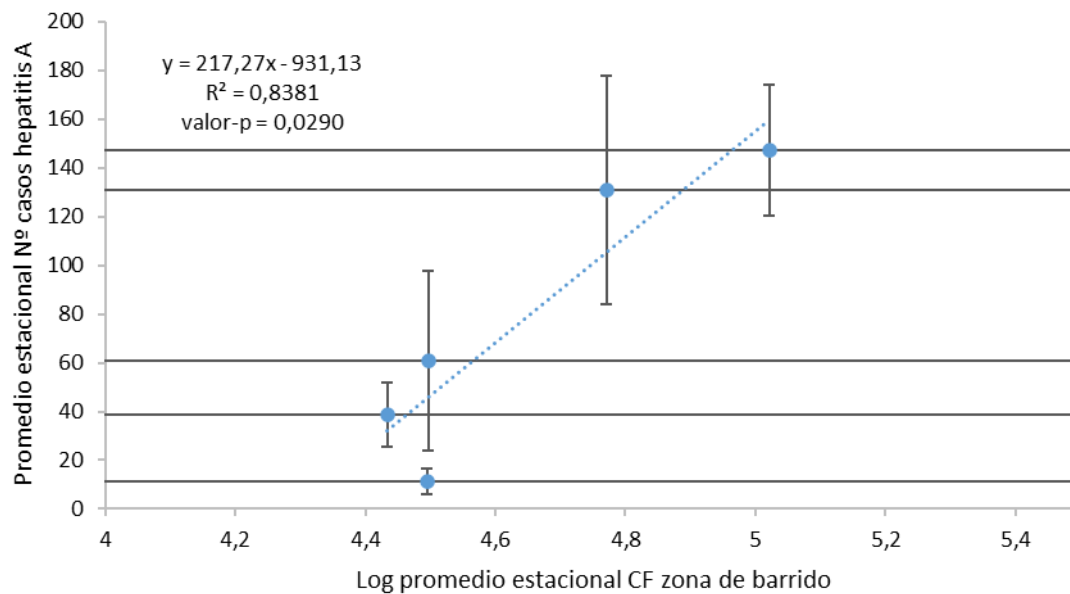


Figura 14.- Correlación entre promedio estacional del número de casos de hepatitis A ( $\pm$  desviación estándar) para la región del Biobío, y el logaritmo del promedio ( $\pm$  desviación estándar) de coliformes fecales estacionales en zona de barrido

## DISCUSIÓN

Distintos trabajos han descrito el uso de ADN mitocondrial para la identificación del origen de fuentes de contaminación fecal, en su mayoría en cuerpos de agua dulce. Así también, el ADN mitocondrial humano (HmtDNA) es uno de los marcadores moleculares utilizados para determinar la contaminación fecal de origen antropogénico (Caldwell et al. 2011). Estudios en agua dulce han descrito que la temperatura y la luz (radiación), favorecen la degradación del HmtDNA. No obstante, el tiempo de permanencia de este marcador en agua dulce puede alcanzar valores entre 2 a 13 días (He et al. 2015). Así también, se ha logrado detectar y cuantificar este marcador en agua dulce a una distancia no mayor a 20 km desde una planta de tratamiento de aguas servidas (Kapoor et al. 2013). Recientemente se ha descrito el uso de HmtDNA en una amplia área costera de estudio frente a la región del Biobío (González-Saldía et al. 2019), lo que demuestra que la distancia y el tiempo que puede permanecer esta señal en el ambiente marino es lo suficiente para integrar procesos del orden de días a semanas. Para Bahía Concepción, trabajos previos han descrito una correlación significativa entre el HmtDNA y los coliformes fecales ( $r^2 = 0,4601$ ; González-Saldía et al. 2019), pero solo para la zona de barrido del borde costero y en un limitado número de muestras ( $n=18$ ). En el presente estudio también fue posible observar para todos los datos, una correlación significativa para estos parámetros (valor- $p < 0,001$ ), pero utilizando un mayor número de observaciones ( $n=147$ ). No obstante, la correlación fue más débil ( $r^2=0,2789$ ) que lo informado por González Saldía et al. 2019. Esta correlación demuestra que al menos el 27% de la contaminación fecal presente en la bahía es de origen humano, tanto para las muestras provenientes de la columna de agua analizadas por separado (Fig. 4a;  $r^2= 0,3726$ ; valor- $p < 0,001$ ), como para las muestras provenientes de la zona de barrido (Fig. 4b;  $r^2= 0,3691$ ; valor- $p < 0,001$ ). En otras palabras, la zona de barrido como la columna de agua reciben aportes de material fecal humano siendo, además, esta la primera vez que se demuestra una correlación significativa para el HmtDNA y los coliformes fecales en la columna de agua del océano costero.

Las descargas de aguas residuales están compuestas por una mezcla compleja de sustancias químicas y una microbiota de origen entérico que transforman y utilizan esas sustancias. A pesar de que el origen humano revela la presencia de patógenos humanos específicos y su incuestionable riesgo directo para la salud humana, la forma en que la contaminación fecal humana puede ser también perjudicial para los ecosistemas acuáticos sigue siendo una pregunta abierta (i.e. Paruch et al. 2019). Al respecto, recientemente se ha informado que la alteración de la diversidad microbiana autóctona, la abundancia y la dispersión de genes microbianos de resistencia a antibióticos (ARG) se debe a este tipo de contaminación (Paruch et al. 2019, Karkman et al. 2019, Pascual-Benito 2020, Reynolds et al.

2020), además de tener un posible papel en el proceso de eutrofización de los ecosistemas acuáticos (Canosa & Pinilla 1999, Paerl et al. 2003, Okafor 2011). En el presente trabajo, el análisis de los datos totales obtenidos también determinó una correlación significativa ( $r^2= 0,298$ ; valor- $p=0,000$ ) entre la biomasa microbiana viva (ATP) y los coliformes fecales en el área de estudio, lo que demuestra que al menos un 30% de la biomasa microbiana viva presente en la columna de agua y zona de barrido de Bahía Concepción corresponden a microorganismos entéricos. Estos microorganismos alóctonos estarían desplazando a los microorganismos autóctonos, producto de la abundancia de las enterobacterias propias de las descargas de aguas residuales. Esto refleja un impacto de la contaminación fecal humana en la biodiversidad de microorganismos en el ecosistema marino de Bahía Concepción, lo que demuestra que el impacto de la contaminación fecal humana no solamente puede ser sobre la salud de la población humana costera, sino que también sobre la salud del ecosistema que recibe estas descargas. Además, este reemplazo ocurre indistintamente en la columna de agua como en la zona de barrido del borde costero. Siendo consistente con las correlaciones para el HmtDNA y coliformes fecales observados en las mismas muestras (Fig. 4a, Fig. 4b).

Distintos factores influyen en la distribución y abundancia de contaminación fecal en el océano costero, como por ejemplo la temperatura, salinidad, y forzantes ambientales como el viento y precipitaciones. Así, se tiene que durante las estaciones más cálidas, la temperatura del agua es la que incrementa la abundancia de coliformes fecales en muestras de agua de mar (Ndione et al. 2022). Mientras en estaciones más frías son las precipitaciones y vientos los que influyen favorablemente en la diseminación de la contaminación fecal en el océano costero (Ndione et al. 2022). En Playa Jacó, ubicada en la costa del Pacífico Central costarricense, se ha determinado que las precipitaciones favorecen la abundancia de nutrientes y coliformes totales producto del aporte de escorrentías (González-Fernández et al. 2021). En Bahía Concepción, se ha determinado que el tiempo de residencia de sus aguas se encuentran en el rango de 3,2 (Mesías & Salinas 1986) a 22 días (Arcos et al. 1995), dependiendo de las condiciones ambientales y época del año. En esta bahía, el viento sería el mayor forzante sobre su circulación, estableciendo un sistema de dos capas que desaparece en periodos de calma superiores a 12 h, y que deja a la bahía como un sistema de circulación de una sola capa (Sobarzo et al. 1997). En otras palabras, un efluente de boyantes positiva como las aguas servidas, al ser descargada en la profundidad de esta bahía a través de un emisario submarino, debería experimentar dilución, mezcla por arrastre vertical y ascenso vertical, acumulando una fracción en la capa superficial, quedando su distribución a merced del viento dominante. De esta manera, con vientos dominantes del cuadrante SSW, la capa superficial debería tender a acumularse contra la costa Este (E), de la bahía hasta salir de ella si la persistencia e intensidad del viento así lo permiten. En este proceso



existe la dilución del material descargado por este tipo de emisarios, desde el punto de descarga a medida que se aleja de él. No obstante, en el presente estudio, los resultados muestran que existe un mayor porcentaje de puntos de muestreo del borde costero por sobre NCh.1333, en contraste a lo observado en los puntos de muestreo de la columna de agua (Fig. 8), con la excepción del verano de 2019, donde tanto el borde costero como la columna de agua muestra valores significativamente más altos (valor-p = 0,005) que en las otras estaciones del año monitoreadas. Más aún, tanto en primavera de 2018 y otoño de 2019, la colimetría fecal es significativamente más alta en los puntos de muestreo del borde costero que en la columna de agua (Fig. 6), lo que no permite evidenciar la dilución del material descargado por los emisarios. Existen dos escenarios que podrían potencialmente explicar esta situación: el primero es que, a pesar de la dilución esperable desde el punto de descarga de los emisarios submarinos hacia la playa, el material se acumule en la arena de la playa y recircule producto del oleaje, y las mareas. El segundo escenario es que exista en el borde costero entradas difusas de material fecal humano (Fig. 8), que expliquen la mayor concentración de las bacterias entéricas en el borde costero en comparación a la columna de agua. Existen diversos puntos en el borde costero de Bahía Concepción que podrían favorecer esta situación, como por ejemplo el río Andalién, y los esteros Penco, Lirquén, Bellavista y Collén entre otros cursos menores de aguas.

Considerando el análisis anterior, se podría esperar que los vientos sean el forzante principal para la distribución de la contaminación fecal humana proveniente de los emisarios submarinos o de fuentes difusas en el borde costero en Bahía Concepción. No obstante, la situación que se observa en verano de 2019, donde tanto el borde costero como la columna de agua muestran un incremento significativo en comparación a las otras estaciones del año (Fig. 5), sugiere que existe un factor distinto a las forzantes ambientales que intervienen en la distribución de este tipo de contaminación en Bahía Concepción. Por ejemplo, la comuna de Penco y Tomé suman aproximadamente 102.313 habitantes, que conservadoramente podrían producir  $20,5 \text{ ton} \cdot \text{día}^{-1}$  de material fecal humano, considerando un aporte de  $200 \text{ g} \cdot \text{día}^{-1}$  por persona (promedio entre los países de altos y bajos ingresos; Rose et al. 2015). Sin embargo, según datos aportados por la oficina de turismo de la Ilustre Municipalidad de Tomé, durante los meses de verano, la comuna puede recibir la visita de entre 1.500.000 a 2.000.000 de personas (población flotante). Si esta población flotante pernoctara al menos una noche en la comuna, significa un aporte de material fecal humano extra al alcantarillado de entre 300 a 400 ton, para un sistema que atiende normalmente una población de 54.946 habitantes, que pueden emitir conservadoramente  $10,98 \text{ ton} \cdot \text{día}^{-1}$ . En otras palabras, durante los meses de verano, el sistema de alcantarillado de Tomé recibe aproximadamente entre 30 a 40 veces más material fecal que durante las estaciones de otoño, invierno y primavera, sin la población flotante. Los resultados sugieren que esta

carga extra podría estar sobrepasando la capacidad de dilución de Bahía Concepción durante el verano, convirtiendo a la bahía en una zona potencialmente peligrosa para la salud humana, dado el contacto directo con sus aguas, especialmente durante la temporada estival.

La relación del océano y la salud humana es conocida desde la época de Hipócrates. Actualmente, para la región del Biobío, se ha demostrado que existe una concordancia en el tiempo entre el incremento de la contaminación fecal humana y los brotes de enfermedades talasogénicas en la población humana costera, como por ejemplo la hepatitis A (González-Saldía et al. 2019). No obstante, en el presente trabajo fue posible determinar una fuerte correlación significativa ( $r^2=0,9158$ ; valor  $p=0,011$ ) entre el promedio estacional del número de copias de HmtDNA en la columna de agua y el promedio estacional del número de casos de hepatitis A para la población humana costera de la región del Biobío (Fig. 13). Esta correlación no se observa en la zona de barrido del borde costero, lo que sugiere que la señal del HmtDNA en la columna de agua corresponde a aquel proveniente de la contaminación fecal existente en el seno de la bahía, no así en la zona de barrido donde pueden existir otras fuentes de esta señal molecular como por ejemplo aquel que proviene de la piel, pelo, sudor, entre otros (Caldwell et al. 2009). Esta situación contrasta con la correlación significativa ( $r^2= 0,8381$ ; valor  $p=0,0290$ ), obtenida para el promedio de los casos estacionales de hepatitis A con el logaritmo del promedio de coliformes fecales en las muestras provenientes del borde costero (Fig. 14), lo que no se observa en la columna de agua. De lo anterior se desprende que los coliformes fecales de la columna de agua no son el mejor parámetro para estimar el peligro de contraer hepatitis A por la población humana costera, puesto que ésta entra en contacto directo con la contaminación fecal en el borde costero y no en la columna de agua del seno de la bahía. En trabajos posteriores se debería estudiar cuáles son las posibles fuentes difusas de contaminación fecal humana que entran a la bahía, posiblemente a través de los cursos de agua dulce que en ella desembocan, considerando además un balance de masas que permita determinar su importancia en el aporte de material fecal humano en esta área de estudio.

## CONCLUSIONES

1. Bahía Concepción se encuentra fuerte y permanentemente contaminada con material fecal humano, con valores que sobrepasa la NCh.1333 entre 14 a 84 veces dependiendo de la estación del año, tanto en su columna de agua como en el borde costero.
2. En términos generales durante el periodo de estudio, existe un mayor porcentaje de puntos de muestreo del borde costero sobre NCh.1333, en comparación a la columna de agua. Esto sugiere que existirían posibles descargas de material fecal humano en el borde costero distintas a las provenientes de los emisarios submarinos. No obstante, en promedio, la contaminación fecal humana en la columna de agua está 23 veces sobre NCh.1333 para el periodo de estudio.
3. La variabilidad de la contaminación fecal humana de Bahía Concepción demuestra que existe un fuerte incremento durante la época estival posiblemente atribuible a la población humana flotante que visita la zona durante el verano, más que a las forzantes ambientales que influyen en su distribución en esta época del año.
4. Independientemente de la estación del año, la capacidad de dilución de Bahía Concepción para este tipo de contaminación se encontraría sobrepasada, lo que se hace más evidente durante el periodo estival de 2019.
5. La fuerte correlación observada entre los casos de hepatitis A y el HmtDNA en la columna de agua y con los coliformes fecales en el borde costero, sugieren que Bahía Concepción es un sitio potencialmente riesgoso para la salud de la población humana costera y flotante, que interactúa directamente con sus aguas, especialmente durante los meses de verano
6. Los resultados de este trabajo sugieren que es necesario en futuros estudios, determinar las entradas de material fecal humano a Bahía Concepción producto de las descargas de agua dulce que allí existen.

## REFERENCIAS

- American Public Health Association (APHA). (2005). American Water Works Association & Water Pollution Control Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 ed. (Washington, 55 pp)
- Arcos, D.F., Núñez, S., Urrutia, A., Chuecas, L., (1995). Shelf-embayment water exchange and residence times within Concepcion Bay, Chile. *Gayana Oceanologia* 3 (2), 75–87.
- Bagi, A., & Skogerbø, G. (2022). Tracking bacterial pollution at a marine wastewater outfall site—A case study from Norway. *Science of The Total Environment*, 829, 154257.
- Belkin, Shimshon., and Rita R. Colwell. (2006). *Oceans and Health : Pathogens in the Marine Environment*. Springer Science+Business Media.
- Bertin, A., Inostroza, P.A., Quiñones, R.A., (2011). Estrogen pollution in a highly productive ecosystem off central-south Chile. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (7), 1530–1537. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.002>.
- Borja, Angel, Mathew P. White, Elisa Berdalet, Nikolaj Bock, Claire Eatock, Peter Kristensen, Anne Leonard, Josep Lloret, Sabine Pahl, Mariluz Parga, Julia Vera Prieto, Susanne Wuijts, and Lora E. Fleming. (2020). “Moving Toward an Agenda on Ocean Health and Human Health in Europe.” *Frontiers in Marine Science* 7.
- Caldwell, J.M., Levine, J.F., (2009). Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real time PCR for source tracking animal contamination. *J. Microbiol. Methods* 77 (1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.11.007>.
- Caldwell, J., Payment, P., Villemur, R., (2011). Mitochondrial DNA as source tracking markers of fecal contamination. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*. Springer, New York, NY, pp. 229–250 [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9386-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9386-1_10).
- Cacciabue, D. G., Juárez, M. M., Poma, H. R., Garcé, B., & Rajal, V. B. (2014). Cuantificación y evaluación de la estacionalidad de elementos parasitarios en ambientes acuáticos recreativos de la provincia de Salta, Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 46(2), 150-160.

Canosa, A., & Pinilla, G. (1999). Bacteriological eutrophication indicators in four Colombian water bodies (South America). *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 4(1-2), 23-27.

Cuitiva, D. E. R. (2012). Distribution of Enterococci as indicators of fecal contamination in waters of Tumaco Bay, Colombian Pacific Coast. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 50(2), 136-148.

D.S. N°90/2000, Establece norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales.

Daneri, G., Dellarossa, V., Quiñones, R.A., Jacob, B., Montero, P., Ulloa, O., (2000). Primary production and community respiration in the Humboldt Current System off Chile and associated oceanic areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197, 41–49. <https://doi.org/10.3354/meps197041>.

Norma Chilena NCh N°1333.Of78. Modificada 1987, Requisitos de Calidad de Agua para diferentes usos. Chile.

Devlin, Michelle J., Brett P. Lyons, Johanna E. Johnson, and Jeremy M. Hills. (2021). The Tropical Pacific Oceanscape: Current Issues, Solutions and Future Possibilities. *Marine Pollution Bulletin* 166.

DECRETO 144/2009, Establece normas de calidad primaria para la protección de las aguas marinas y estuarinas aptas para actividades de recreación con contacto directo.

Dirección General de Aeronáutica Civil (DGAC). (2022). Viento predominante anual en 8 direcciones 2018-2019, Estación Carriel Sur. CHILE

González-Saldía, R. R., N. L. Pino-Maureira, Ch Muñoz, L. Soto, E. Durán, M. J. Barra, S. Gutiérrez, V. Díaz, and A. Saavedra. (2019). Fecal Pollution Source Tracking and Thalassogenic Diseases: The Temporal-Spatial Concordance between Maximum Concentrations of Human Mitochondrial DNA in Seawater and Hepatitis A Outbreaks among a Coastal Population. *Science of the Total Environment* 686:158–70. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.415.

González-Fernández, A., Symonds, E. M., Gallard-Gongora, J. F., Mull, B., Lukasik, J. O., Navarro, P. R., ... & Harwood, V. J. (2021). Relationships among microbial indicators of fecal pollution, microbial source tracking markers, and pathogens in Costa Rican coastal waters. *Water Research*, 188, 116507.

Graves, Carolyn A., Andy Powell, Michelle Stone, Farran Redfern, Teema Biko, and Michelle Devlin. (2021). Marine Water Quality of a Densely Populated Pacific Atoll (Tarawa, Kiribati):

Cumulative Pressures and Resulting Impacts on Ecosystem and Human Health. *Marine Pollution Bulletin* 163. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111951.

Harwood, Valerie J., Christopher Staley, Brian D. Badgley, Kim Borges, and Asja Korajkic. (2014). Microbial Source Tracking Markers for Detection of Fecal Contamination in Environmental Waters: Relationships between Pathogens and Human Health Outcomes. *FEMS Microbiology Reviews* 38(1):1–40.

He, X., Chen, H., Shi, W., Cui, Y., Zhang, X.X., (2015). Persistence of mitochondrial DNA markers as fecal indicators in water environments. *Sci. Total Environ.* 533, 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.119>.

Instituto de Salud Pública (ISP), (2010). PRT-712.03-005. NMP para la determinación de coliformes y coliformes fecales en aguas. Sección Microbiología de Alimentos (6pp.).

Kapoor, V., Smith, C., Santo Domingo, J.W., Lu, T., Wendell, D., (2013). Correlative assessment of fecal indicators using human mitochondrial DNA as a direct marker. *Environ. Sci. Technol.* 47 (18), 10485–10493. <https://doi.org/10.1021/es4020458>.

Karkman, Antti, Katariina Pärnänen, and D. G. Joakim Larsson. (2019). Fecal Pollution Can Explain Antibiotic Resistance Gene Abundances in Anthropogenically Impacted Environments. *Nature Communications* 10(1). doi: 10.1038/s41467-018-07992-3.

Kongprajug, A., Chyerochana, N., Rattanakul, S., Denpetkul, T., Sangkaew, W., Somnark, P., ... & Sirikanchana, K. (2021). Integrated analyses of fecal indicator bacteria, microbial source tracking markers, and pathogens for Southeast Asian beach water quality assessment. *Water Research*, 203, 117479.

Mesías J. & S. Salinas. (1986). Corrientes en la bahía de Concepción, Chile. *Biol. Pesq*, 15, 55-62.

Ministerio de Salud de Chile (MINSAL). (2017). Situación epidemiológica de hepatitis A y viral sin especificación (CIE-10 B15 y B19). Chile, años 2007-2017.

Ministerio de Salud de Chile (MINSAL). (2020). Boletín epidemiológico trimestral: Hepatitis A, SE 1-52, año 2019. CHILE.

- Ndione, M., Ory, P., Agion, T., Treilles, M., Vacher, L., Simon-Bouhet, B., ... & Agogu , H. (2022). Temporal variations in fecal indicator bacteria in bathing water and sediment in a coastal ecosystem (Aytr  Bay, Charente-Maritime, France). *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113360.
- Okafor, N. (2011). Pollution of aquatic systems: Pollution through eutrophication, fecal materials, and oil spills. In *Environmental microbiology of aquatic and waste systems* (pp. 151-187). Springer, Dordrecht.
- Osińska, Adriana, Ewa Korzeniewska, Monika Harnisz, and Sebastian Niestęski. (2017). The Prevalence and Characterization of Antibiotic-Resistant and Virulent Escherichia Coli Strains in the Municipal Wastewater System and Their Environmental Fate. *Science of the Total Environment* 577:367–75. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.203.
- Paerl, H. W., Dyble, J., Moisander, P. H., Noble, R. T., Piehler, M. F., Pinckney, J. L., ... & Valdes, L. M. (2003). Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(3), 233-246.
- Paruch, L., Paruch, A. M., Eiken, H. G., & S rheim, R. (2019). Faecal pollution affects abundance and diversity of aquatic microbial community in anthropo-zoogenically influenced lotic ecosystems. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Pascual Benito, M. (2020). Nuevas herramientas para la gesti n de los recursos h dricos y los riesgos microbiol gicos asociados.
- Reynolds, L. J., Sala-Comorera, L., Martin, N. A., Nolan, T. M., Stephens, J. H., Gitto, A., ... & Meijer, W. G. (2020). Correlation between antimicrobial resistance and faecal contamination in small urban streams and bathing waters. *Science of The Total Environment*, 739, 140242.
- Rodr guez-Mozaz, Sara, Sara Chamorro, Elisabet Marti, Belinda Huerta, Meritxell Gros, Alexandre S nchez-Melsi , Carles M. Borrego, Dami  Barcel , and Jose Luis Balc zar. (2015). Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Hospital and Urban Wastewaters and Their Impact on the Receiving River. *Water Research* 69:234–42. doi: 10.1016/j.watres.2014.11.021.
- Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., Cartmell, E., (2015). The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45 (17), 1827–1879. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.100076>.

Sanhueza, Gonzalo, and Viviana Cachicas. (2020). Detección y Cuantificación de Virus de Hepatitis A En Moluscos En Las Bahías de Concepción y Arauco, Chile. *Revista Del Instituto de Salud Pública de Chile* 4(1). doi: 10.34052/rispch.v4i1.98.

Seguel, C.G., Mudge, S.M., Salgado, C., Toledo, M., (2001). Tracing sewage in the marine environment: altered signatures in Concepcion Bay, Chile. *Water Res.* 35 (17), 4166–4174. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00146-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00146-4).

Shuval Hillel Shuval Fredy, Hillel. (2003). Estimating the Global Burden of Thalassogenic Diseases: Human Infectious Diseases Caused by Wastewater Pollution of the Marine Environment.

Sobarzo, M. B., Figueroa, D. & D.R. Arcos. (1997). The influence of winds and tides in the formation of circulation layers in a bay, a case study: Concepción Bay, Chile. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 45(6), 729-736.

Sojobi, A. O., & Zayed, T. (2022). Impact of sewer overflow on public health: A comprehensive scientometric analysis and systematic review. *Environmental research*, 203, 111609.

Victoria, N. S., Kumari, T. S. D., & Lazarus, B. (2022). Assessment on impact of sewage in coastal pollution and distribution of fecal pathogenic bacteria with reference to antibiotic resistance in the coastal area of Cape Comorin, India. *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113123.

Wei, Z. L., Miao, J., Yang, Z. W., Shi, D. Y., Wu, H. Y., Yang, D., ... & Jin, M. (2020). Contamination sources of the enteric virus in recreational marine water shift in a seasonal pattern. *Science of The Total Environment*, 743, 140641.