

UNIVERSIDAD METROPOLITANA  
ESCUELA DE ASUNTOS AMBIENTALES  
SAN JUAN, PUERTO RICO

IDENTIFICACIÓN DE LA FUENTE DE CONTAMINACIÓN MICROBIANA POR  
ENTEROCOCOS EN EL BALNEARIO PÚBLICO DE PATILLAS

Requisito parcial para la obtención del  
Grado de Maestría en Ciencias en Gerencia Ambiental  
en Evaluación y Riesgo Ambiental

Por  
Héctor J. Nogueras Rivera

8 de diciembre de 2009

## **DEDICATORIA**

*A mi familia*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera dar las gracias a todas aquellas personas que de una manera u otra me ayudaron al desarrollo de este trabajo. En especial, doy gracias a mi director de tesis, Glorivee Rosario Pérez PhD, sin cuya ayuda este trabajo no hubiera sido posible, ya que me ha proporcionado todos los recursos necesarios para realizarlo. Le doy las gracias, además, por haberme dedicado su tiempo, por sus consejos, su amistad, y sobre todo, por haberme brindado la oportunidad de poder trabajar en esta investigación. Gracias también a los demás miembros del Comité de Tesis, por haberme brindado su amistad y ayuda siempre que la he necesitado, haberme resuelto innumerables dudas y por sus valiosos comentarios. Especialmente gracias a la Universidad de Puerto Rico en Cayey, por el apoyo económico del Fondo Institucional para el Desarrollo de la Investigación y haberme provisto el uso de las instalaciones de los laboratorios del Edificio Nuevo de Ciencias para completar este trabajo.

Mi agradecimiento también a mi familia y a todas las personas que de alguna manera u otra, con su apoyo moral, me han ayudado a concluir esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
Trasfondo del problema.....	1
Problema de estudio.....	3
Justificación de estudio.....	5
Hipótesis.....	6
Meta y objetivos.....	7
CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
Trasfondo histórico.....	8
Marco conceptual o teórico.....	11
Marco legal.....	15
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	19
Área de estudio.....	19
Descripción del muestreo.....	19
Parámetros físicos.....	20
Colección de la muestra.....	20
Método de cuantificación e identificación.....	21
Método de análisis espacial.....	32
Análisis estadístico.....	33
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	73
LITERATURA CITADA.....	77
TABLAS.....	85
FIGURAS.....	129

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Valores de CFU obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental en el 2006 en el balneario de Patillas.....	86
Tabla 2.	Valores de CFU obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental en el 2007 en el balneario de Patillas.....	87
Tabla 3.	Valores de CFU obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental en el 2008 en el balneario de Patillas.....	88
Tabla 4.	Valores de CFU obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental en el 2009 en el balneario de Patillas.....	89
Tabla 5.	Valores del promedio de CFU por mes de los valores obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental desde el 2006 hasta el 2009 en el balneario de Patillas.....	90
Tabla 6.	Todos los parámetros estadísticos del 2006 de todas las áreas del balneario de Patillas que son monitoreadas por la JCA.....	91
Tabla 7.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2006 para el extremo izquierdo del balneario de Patillas.....	92
Tabla 8.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2006 para el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas.....	93
Tabla 9.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2006 en punto de muestreo frente a los baños del balneario de Patillas....	94
Tabla 10.	Parámetros estadísticos obtenidos para los datos de la JCA de todas las áreas de muestreo durante el 2006.....	95
Tabla 11.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2006 de todas las zonas de muestreo del balneario de Patillas.....	96
Tabla 12.	Todos los parámetros estadísticos del 2007 de todas las áreas del balneario de Patillas que son monitoreadas por la JCA.....	97

Tabla 13.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2007 para el extremo izquierdo del balneario de Patillas.....	98
Tabla 14.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2007 para el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas.....	99
Tabla 15.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2007 en punto de muestreo frente a los baños del balneario de Patillas....	100
Tabla 16.	Parámetros estadísticos obtenidos para los datos de la JCA de todas las áreas de muestreo durante todo el 2007.....	101
Tabla 17.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2007 de todas las zonas de muestreo del balneario de Patillas.....	102
Tabla 18.	Todos los parámetros estadísticos del 2008 de todas las áreas del balneario de Patillas que son monitoreadas por la JCA.....	103
Tabla 19.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2008 para el extremo izquierdo del balneario de Patillas.....	104
Tabla 20.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2008 para el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas.....	105
Tabla 21.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2008 en punto de muestreo frente a los baños del balneario de Patillas....	106
Tabla 22.	Parámetros estadísticos obtenidos para los datos de la JCA de todas las áreas de muestreo durante todo el 2008.....	107
Tabla 23.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2008 de todas las zonas del balneario de Patillas.....	108
Tabla 24.	Parámetros estadísticos del 2009 de todas las áreas del balneario de Patillas que son monitoreadas por la JCA.....	109

Tabla 25.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2009 para el extremo izquierdo del balneario de Patillas.....	110
Tabla 26.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2009 para el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas.....	111
Tabla 27.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2009 en punto de muestreo frente a los baños del balneario de Patillas....	112
Tabla 28.	Parámetros estadísticos obtenidos para los datos de la JCA de todas las áreas de muestreo durante el 2009.....	113
Tabla 29.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2009 de todas las zonas del balneario de Patillas.....	114
Tabla 30.	Parámetros estadísticos obtenidos de los datos de la JCA dividido por área de muestreo durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009.....	115
Tabla 31.	Parámetros estadísticos de correlación entre áreas de muestreo desde caño aguas arriba del Puente hasta frente a los baños obtenidos de los datos de la JCA durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009.....	116
Tabla 32.	Análisis de correlación entre los parámetros estadísticos por área de muestreo de los datos obtenidos por la JCA durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009.....	117
Tabla 33.	Datos de los valores del promedio geométrico de CFU obtenidos de los datos de la JCA desde el 2006 al 2009 en el balneario de Patillas dividido en meses.....	118
Tabla 34.	Parámetros físicos obtenidos en el muestreo del balneario público de Patillas.....	119
Tabla 35.	Correlación entre los parámetros físico obtenidos en el muestreo del balneario.....	120
Tabla 36.	Datos de análisis estadístico de los valores de CFU por punto de muestreo en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas durante las fechas de 12/10/08, 19/10/08 y 26/10/08.....	121

Tabla 37.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos durante el muestreo realizado el 12/10/08 en el balneario de Patillas.....	122
Tabla 38.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos durante el muestreo realizado el 19/10/08 en el balneario de Patillas.....	123
Tabla 39.	Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos durante el muestreo realizado el 26/10/08 en el balneario de Patillas.....	124
Tabla 40.	Datos obtenidos de CFU en el mismo transecto en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas en las fechas del 12/10/08, 19/10/08 y 26/10/08.....	125
Tabla 41.	Datos de correlación entre CFU obtenidos y distancia a la orilla (Transectos) en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas en las fechas del 12/10/08, 19/10/08 y 26/10/08.....	126
Tabla 42.	Datos obtenidos de CFU en la misma zona (ZONA # 1 profundidad de tobillo), (ZONA # 2 profundidad de rodilla) y (ZONA # 3 profundidad de pecho) en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas en las fechas del 12/10/08, 19/10/08 y 26/10/08.....	127
Tabla 43.	Datos de correlación entre CFU obtenidos y zonas (ZONA # 1 profundidad de tobillo), (ZONA # 2 profundidad de rodilla) y (ZONA # 3 profundidad de pecho) en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas en las fechas del 12/10/08, 19/10/08 y 26/10/08.....	128



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Foto aérea del área de villa pesquera en Patillas.....	130
Figura 2.	Foto aérea de los puntos de muestreo de la JCA.....	131
Figura 3.	Foto aérea de los puntos de muestreo de la investigación divididos en zonas y transeptos.....	132
Figura 4.	Esquema de la intersección de las zonas y transeptos del muestreo.....	133
Figura 5.	Localización de la profundidad del muestreo en las zonas.....	134
Figura 6.	Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2006.....	135
Figura 7.	Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2007.....	136
Figura 8.	Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2008.....	137
Figura 9.	Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2009.....	138
Figura 10.	Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2006 agrupados en meses.....	139
Figura 11.	Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2007 agrupados en meses.....	140
Figura 12.	Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2008 agrupados en meses.....	141
Figura 13.	Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2009 agrupados en meses.....	142

Figura 14.	Distribución de los datos de CFU promedio por zona obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009 agrupados en meses...	143
Figura 15.	Distribución de los datos de CFU promedio obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009 agrupados en meses...	144
Figura 16.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el extremo izquierdo del balneario de Patillas durante el 2006 dividido en seis clases.....	145
Figura 17.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el extremo izquierdo del balneario de Patillas durante el 2006.....	146
Figura 18.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el caño aguas arriba del puente en el balneario de Patillas durante el 2006 dividido en seis clases.....	147
Figura 19.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el caño aguas arriba del puente en el balneario de Patillas durante el 2006.....	148
Figura 20.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA frente a los baños en el balneario de Patillas durante el 2006 dividido en seis clases.....	149
Figura 21.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA frente a los baños en el balneario de Patillas durante el 2006.....	150
Figura 22.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las zonas del balneario de Patillas durante el 2006 dividido en ocho clases.....	151
Figura 23.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en todas las áreas del balneario de Patillas durante el 2006.....	152
Figura 24.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el extremo izquierdo del balneario de Patillas durante el 2007 dividido en seis clases.....	153

Figura 25.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el extremo izquierdo del balneario de Patillas durante el 2007.....	154
Figura 26.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas durante el 2007 dividido en seis clases.....	155
Figura 27.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas durante el 2007..	156
Figura 28.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA frente a los baños en el balneario de Patillas durante el 2007 dividido en seis clases.....	157
Figura 29.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA frente a los baños en el balneario de Patillas durante el 2007.....	158
Figura 30.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las zonas del balneario de Patillas durante el 2007 dividido en ocho clases.....	159
Figura 31.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en todas las áreas del balneario de Patillas durante el 2007.....	160
Figura 32.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el extremo izquierdo del balneario de Patillas durante el 2008 dividido en seis clases.....	161
Figura 33.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el extremo izquierdo del balneario de Patillas durante el 2008.....	162
Figura 34.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas durante el 2008 dividido en seis clases.....	163
Figura 35.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas durante el año 2008....	164

Figura 36.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA frente a los baños del balneario de Patillas durante el 2008 dividido en seis clases.....	165
Figura 37.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA frente a los baños del balneario de Patillas durante el 2008.....	166
Figura 38.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las zonas en el balneario de Patillas durante el 2008 dividido en ocho clases.....	167
Figura 39.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en todas las áreas en el balneario de Patillas durante el 2008.....	168
Figura 40.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA Patillas en el extremo izquierdo del balneario durante el 2009 dividido en seis clases....	169
Figura 41.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el extremo izquierdo del balneario de Patillas durante el 2009.....	170
Figura 42.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas durante el 2009 dividido en cinco clases.....	171
Figura 43.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas durante el 2009.....	172
Figura 44.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA frente a los baños en el balneario de Patillas durante el 2009 dividido en cinco clases.....	173
Figura 45.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA frente a los baños del balneario de Patillas durante el 2009.....	174
Figura 46.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las áreas en el balneario de Patillas durante el 2009 dividido en siete clases.....	175

Figura 47.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las áreas en el balneario de Patillas durante el 2009.....	176
Figura 48.	Comparación de los datos estadísticos de promedio de CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las áreas en el balneario de Patillas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.....	177
Figura 49.	Comparación de los datos estadísticos de valores máximos de CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las áreas en el balneario de Patillas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.....	178
Figura 50.	Comparación de los datos estadísticos de los valores mínimos CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las áreas en el balneario de Patillas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.....	179
Figura 51.	Comparación de los datos estadísticos de la desviación estándar de CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las áreas en el balneario de Patillas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.....	180
Figura 52.	Comparación de los datos estadísticos de la media CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA de todas las áreas en el balneario de Patillas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.....	181
Figura 53.	Valores del promedio geométrico de CFU obtenido de los valores de la JCA en el año 2006 en el balneario de Patillas.....	182
Figura 54.	Valores del promedio geométrico de CFU obtenido de los valores de la JCA en el 2007 en el balneario de Patillas.....	183

Figura 55.	Valores del promedio geométrico de CFU obtenido de los valores de la JCA en el 2008 en el balneario de Patillas.....	184
Figura 56.	Valores del promedio geométrico de CFU obtenido de los valores de la JCA en el 2009 en el balneario de Patillas.....	185
Figura 57.	Valores obtenido del promedio geométrico de CFU de los datos de la JCA por mes desde el 2006 hasta el 2009.....	186
Figura 58.	El por ciento de veces que en cada año se sobrepasa el límite del promedio geométrico de 35 CFU de los datos obtenido de la JCA en el balneario de Patillas.....	187
Figura 59.	El por ciento de veces que en cada mes se sobrepasa el límite del promedio geométrico de 35 CFU de los datos obtenido de la JCA en el balneario de Patillas.....	188
Figura 60.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 12 de octubre del 2009.....	189
Figura 61.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 12 de octubre del 2009.....	190
Figura 62.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 19 de octubre del 2009.....	191
Figura 63.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 19 de octubre del 2009.....	192
Figura 64.	Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 25 de octubre del 2009.....	193
Figura 65.	Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 25 de octubre del 2009.....	194
Figura 66.	Datos del promedio de los valores de CFU obtenidos en el mismo punto de muestreo los diferentes días.....	195
Figura 67.	Datos de CFU obtenidos en el transepto#1 en los tres diferentes días.....	196

Figura 68.	Datos de CFU obtenidos en el transepto # 2 en los tres diferentes días.....	197
Figura 69.	Datos de CFU obtenidos en el transepto# 3 en los tres diferentes días.....	198
Figura 70.	Datos de CFU obtenidos en el transepto# 4 en los tres diferentes días.....	199
Figura 71.	Datos de CFU obtenidos en el transepto# 5 en los tres diferentes días.....	200
Figura 72.	Datos de CFU obtenidos en el transepto# 6 en los tres diferentes días.....	201
Figura 73.	Datos de CFU obtenidos en todos los transeptos del balneario de Patillas los tres diferentes días.....	202
Figura 74.	Datos de CFU obtenidos en las zonas #1 del balneario de Patillas los tres diferentes días.....	203
Figura 75.	Datos de CFU obtenidos en las zonas #2 del balneario de Patillas los tres diferentes días.....	204
Figura 76.	Datos de CFU obtenidos en las zonas #3 del balneario de Patillas los tres diferentes días.....	205
Figura 77.	Datos de CFU obtenidos en todas las zonas del balneario de Patillas los tres diferentes días.....	206
Figura 78.	Mapa de contorno del área de Patillas (USGS).....	207

## LISTA DE SÍMBOLOS O ABREVIACIONES

%	:	Por ciento
CDC	:	Centres for Disease Control
ASM	:	American Society of Microbiology
WHO	:	World Health Organization
EPA	:	Environmental Protection Agency
BEACH	:	Beaches Environmental Assessment Coastal Health
CWA	:	Clean Water Act
JCA	:	Junta de Calidad Ambiental
Col	:	Colonias
ml	:	Mililitros
MST	:	Microbial Source Tracking
°C	:	Grado Centígrado
pH	:	Potencial de hidrógeno
CFR	:	Code of Federal Regulation
NRDC	:	Natural Resources Defense Council
PCR	:	Polimerase Chain Reaction
NPDES	:	National Pollutant Discharge Elimination System
PFGE	:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
M	:	Metros
Min	:	Minutos
mEI agar	:	Membrane- <i>Enterococcus</i> Indoxyl- $\beta$ -D-Glucoside Agar
IPR	:	Ingoing process recovery
OPR	:	Ongoing process recovery
PBS	:	Phosphate Buffer Saline
RSD	:	Relative Standard Desviation
Mm	:	Milímetros
BHIB	:	Brain Herat infusión broth
BHIA	:	Brain Herat infusión agar
BEA	:	Bile Esculine Agar
NaCl	:	Sodium Chloride
TSA	:	Tryptic Soy Agar
ADB	:	Azide Dextrose Broth
ml	:	Microlitros
ASL	:	Airway surface liquid
ADN/DNA	:	Ácido deoxiribonucleico/Deoxiribonucleic acid
TBE	:	Tris Borate EDTA
NTU	:	Nephelometric Turbidity Units
mS/cm	:	Mili siemens per centimeter
USGS	:	United States Geological Survey



## RESUMEN

El desarrollo humano tiene el potencial de alterar las condiciones de los cuerpos de agua con fines recreativos. En este estudio analizamos la contaminación microbiológica e identificación de las principales fuentes de contaminación en el balneario de Patillas, Puerto Rico. Muestreamos 19 puntos en el balneario durante octubre del 2008. Estos puntos se dividieron en tres zonas y seis transeptos. Las muestras fueron analizadas utilizando el método 1600 de la EPA. Además obtuvimos datos relacionados a los parámetros físicos y químicos del área. Analizamos los datos de CFU de Enterococos obtenidos por la JCA en tres diferentes puntos de muestreo en el balneario desde el 2006 al 2009 mostrando una correlación negativa desde el punto de muestreo aguas arriba del caño que es la desembocadura de una quebrada hasta el punto de muestreo frente a los baños en el mismo año. Además encontramos una correlación negativa entre los datos de la misma área de muestreo en los diferentes años. Además, el punto de muestreo frente a los baños mostró un 30%, 40%, 27% y 39%, de las veces que excedieron el 75% de límite de confianza de 104 CFU. Basado en la fórmula de Cabelli, para estimar el número de casos de alta credibilidad de enfermedades gastrointestinales, obtuvimos que un total de 226, 193, 185 y 132 casos, en el periodo del 2006 al 2009, pudieron estar relacionado debido a la exposición a contaminación fecal en el balneario. En términos de zonas, encontramos una tendencia similar de disminución de CFU desde el extremo izquierdo del balneario donde desemboca la quebrada hasta frente a los baños y en términos de transepto, encontramos una tendencia de disminución de los valores de CFU con el aumento de profundidad implicando una tendencia de la zona de la orilla presentar los valores más altos de CFU. En términos de la identificación de la fuente de contaminación fecal, no logramos extraer el material genético de las bacterias, aún aplicando diferentes protocolos de investigaciones científicas previas. Sin embargo, el análisis espacial del área y la evaluación de los sistemas de tratamientos de agua reflejó que la fuente de contaminación de mayor probabilidad es de origen humano.

## ABSTRACT

The human development and its activities have the potential to impact recreational water bodies. In this study we performed an evaluation of the microbial contamination and the identification of main principal sources in Patillas beach in Puerto Rico. We collect water samples in 19 points divided in six transects and three zones and analyzed with EPA method 1600. Also physical and chemical parameters were measure at each sampling location. The statistical analysis performed with the Environmental Quality Board of Puerto Rico results from 2006 to 2009 demonstrate a negative correlation between the three sampling points with higher values at waters at the sewer that is the opening of a water body until the point in front of the bathrooms the same year and between years. The sampling point in front of bathrooms get values over the 75% of confidence limit of 35 CFU that is 104 CFU during 2006-2009 period. About 30% for (2006), 40% for (2007), 27% for (2008) and 39% for (2009) of thue overall samples collected were over the 104 CFU value. Using the Carbelli's formula we estimate de credible case of gastrointestinal illness obtained values of 226 cases, 193 cases, 185 cases and 132 cases from 2006-2009 period respectively that could be related to exposure to fecal contamination at the beach. About the zones a decrease in CFU values demonstrate a trend from left size of the beach until the point in front of the bathrooms and in transect a trend of decrease was found with deep increase that present that the higher values will be present in the shore of the beach. About the identification of the source of the contamination the DNA extraction could not be extract even using different scientific references but in other way a hydrology, geography, wastewater treatments and land use evaluation was performed pointing that the most probable source was human source.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### **Trasfondo del problema**

Aproximadamente un 13 por ciento (%) de las aguas superficiales en los Estados Unidos no cumplen con los criterios establecidos de densidad de organismos indicadores de coliformes fecales (US Environmental Protection Agency [USEPA], 2005a). A pesar que en ciertos casos la contaminación es atribuida a fuentes identificadas, tales como, la presencia de animales y efluentes de las plantas de tratamiento, se cree que las fuentes no identificadas aportan sustancialmente a la contaminación de los cuerpos de aguas superficiales (USEPA, 2005a). En los últimos años, la contaminación bacteriana de las aguas superficiales con fines recreativos ha despertado una preocupación en la salud pública y en el medio ambiente. Inicialmente, el enfoque establecido se dirigía a la contaminación de agua causada por agentes químicos, y no es hasta en años recientes, que se han establecido los riesgos causados por la contaminación microbiana.

En el año 2000, el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (Centers for Disease Control [CDC], por sus siglas en inglés), reportó 21 epidemias relacionadas a infecciones causadas por la exposición a microorganismos de origen acuático (Lee, Levy, Craun, Beach & Calderón, 2002). La Sociedad Americana de Microbiología (American Society of Microbiology [ASM], por sus siglas en inglés) estima que millones de tanques sépticos procesan billones de galones de aguas usadas que podrían contaminar aguas superficiales con numerosos patógenos incluyendo virus

(Chang, 1997). De acuerdo con el CDC, el agua es uno de los medios más frecuentes para la diseminación de enfermedades microbiológicas y es responsable del desarrollo de epidemias o enfermedades en muchas personas en un corto periodo de tiempo (Howard, 1998; USEPA, 2004a; Wilhem & Maluk, 1998). La contaminación del agua por heces fecales podría resultar en epidemias de fiebre tifoidea, shigelosis, salmonelosis, gastroenteritis disentería, giardiasis, cólera y hepatitis infecciosa (Howard, 1998). Estudios epidemiológicos elaborados por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization [WHO], por sus siglas en inglés) han demostrado una variedad de problemas de salud adquiridos por el contacto con aguas superficiales con fines recreativos contaminadas (World Health Organization [WHO], 1998).

La Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency [EPA], por sus siglas en inglés) ha reconocido la necesidad de establecer un programa de monitoreo de playas, así como mejorar los estándares de calidad del agua, y proveer al público en general información y guías acerca de las condiciones de los cuerpos de agua. En el 1997, la EPA estableció el programa de Evaluación Ambiental de las Playas, Costas y Salud (Beaches Environmental Assesment and Coastal Health [BEACH], por sus siglas en inglés) (USEPA, 1999). La meta de BEACH es reducir los riesgos a la salud humana causada por la exposición, la ingestión, la inhalación o el contacto físico con patógenos en aguas utilizadas para la recreación. El programa se dirige principalmente a fortalecer estándares y pruebas, proveer métodos mucho más rápidos, predecir contaminación, invertir en la salud y métodos de investigación e informar al público. Tres años mas tarde (2000), se crea el Acta de BEACH enmendando la sección 303 del Acta de Agua Limpia (Clean Water Act [CWA], por sus siglas en inglés), requiriendo así que para el 2004 las

costas y lagos de los estados y territorios de Estados Unidos adopten los criterios de indicadores para *Escherichia coli* y *Enterococcus spp* (USEPA, 1977, 2000a, 2003, 2004a, 2004b).

Bajo el programa BEACH y para el cumplimiento con el Acta BEACH, Estados Unidos incluye a Puerto Rico como uno de los territorios que deben cumplir con los requisitos de monitoreo y aviso de cierre de los cuerpos de aguas superficiales. La Junta de Calidad Ambiental (JCA) de Puerto Rico es la agencia responsable de establecer los programas de monitoreo, el análisis de las muestras, para asegurar que estos cumplen con los estándares establecidos. Cuando los resultados sobrepasan los estándares, de un promedio de 35 colonias en 100 mililitros de agua (35col/100ml) para Enterococos y un promedio de 200 col/100 ml para coliformes fecales (ambas en cinco muestras de agua marina o agua dulce respectivamente) es obligatorio la notificación al público de los resultados obtenidos con el fin de proteger la salud de los usuarios de las playas (Junta de Calidad Ambiental [JCA], 2003; USEPA, 2004a).

### **Problema de estudio**

Actualmente, Puerto Rico tiene un total de 65 playas de las cuales 20 están bajo el programa de monitoreo de la JCA. Debido a elevados niveles de indicadores de contaminación fecal en los años 2004 al 2009, la JCA reportó uno, cero, cero, seis, uno y cero avisos de cierre, respectivamente. Esto refleja un problema en la calidad de agua en las playas de Puerto Rico y también refleja una falta de cumplimiento con los estándares de calidad establecidos por la EPA.

La JCA es la agencia responsable del monitoreo y la notificación de los resultados obtenidos de las 20 playas que se encuentran bajo el programa. El Balneario de Patillas

está incluido en el programa y desde el 2004 es el balneario con más número de avisos y cierres. En el 2006, los reportes de muestreo para Enterococos indican que el 73% de las muestras, incluyendo re-muestréos, se encuentran fuera de especificación alcanzando hasta un máximo de 5,100 colonias en una de las muestras. En el informe de enero a agosto de 2007, un total de 85% de las muestras, incluyendo re-muestréos, estuvieron sobre los valores máximos considerados como seguros para cuerpos de aguas con fines recreativos (JCA, 2007).

Estos muestreos presentan un panorama claro del balneario de Patillas en cuanto a la condición y al cumplimiento con los estándares de calidad de agua establecidos para aguas superficiales con fines recreativos. Estos estándares junto al programa de monitoreo establecido, sirven como guía preventiva para establecer las condiciones del balneario el día del muestreo. Debido a que el muestreo y las pruebas para analizar el valor de microorganismos en el agua requieren más de 24 horas para hacerse, estos métodos no son prácticos para los usuarios, debido a que las condiciones de la calidad del agua son distintas antes, durante y después de tomadas las muestras, lo que representa un riesgo a la salud. Esta situación presenta un panorama incierto para los usuarios de las aguas superficiales con fines recreativos ya que los resultados se emiten días después cuando las condiciones del cuerpo de agua podrían continuar contaminadas o presentar un aumento en la cantidad de colonias.

El método utilizado actualmente para el análisis de microorganismos en los cuerpos de agua se basa solo en cuantificar las colonias y no es específico en cuanto a la fuente de procedencia (USEPA, 2000c). Por lo tanto, se desconoce si las bacterias son de origen animal o humano cuya información es de gran importancia para establecer

acciones correctivas específicas que ayuden a mejorar la calidad del agua. Como parte del programa “Microbial Source Tracking” (MST), la EPA está promoviendo el desarrollo de nuevos métodos de monitoreo. Se buscan métodos con mayor rapidez, efectividad y de mayor especificidad que los existentes que permita la identificación, cuantificación de microorganismos y el aviso al público se pueda llevar a cabo con mayor prontitud.

Si se notifica al público con mayor prontitud a cerca de la calidad de las aguas superficiales y se desarrollan métodos de cuantificación más rápidos que los existentes como lo establece el programa BEACH, ayudarán a determinar si un cuerpo de agua cumple o no con los estándares de calidad. Estas acciones no necesariamente eliminarán ni identificarán la fuente de procedencia del microorganismo y así poder tomar acción específica y erradicar el problema. Con este estudio determinaremos el número de colonias de Enterococos en 100ml de agua, según los métodos utilizados por la JCA e identificaremos mediante el uso de marcadores moleculares el origen de los Enterococos entre humano y animal y así tomar acción correctiva específica para disminuir o eliminar el problema ambiental y por ende el riesgo a los humanos que produce dicha exposición a microorganismos patogénicos.

### **Justificación de estudio**

Los Enterococos son un grupo de estreptococos fecales que se caracterizan por la habilidad de crecer en 6.5% cloruro de sodio (NaCl), a bajas y altas temperaturas 10 grados centígrados (°C) y 45°C y a valores de pH alto (9.5) (Manero & Blanch, 1999). Estos microorganismos son utilizados como indicadores de contaminación fecal y son de gran valor en ambientes marinos y aguas de recreación como indicadores de riesgos potenciales para la salud y gastroenteritis relacionada a personas que nadan en éstas

(Scott, Rose, Jenkins, Farrah & Lukasik, 2002). Los Enterococos son bacterias no patogénicas cuando residen en su hábitat normal como en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Fuera de su hábitat normal, los Enterococos son patogénicos causando infecciones en el tracto urinario y heridas, bacteriemia, endocarditis y meningitis, entre otros (Scott et al., 2002). *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* y “yellow-pigmented *Enterococci*” son cepas relacionadas a fuentes humanas (Bahirathan, Puente & Seyfried, 1998; Quednau, Ahrne & Molin, 1999; Wheeler, Hartel, Godfrey, Hill & Segars, 2002) y poseen genes asociados con *Enterococci* que son específicos a humanos (Hammerum & Jensen, 2002).

Actualmente existe un riesgo para los usuarios del balneario de Patillas por la falta de cumplimiento con los estándares de número de colonias de Enterococos. Aunque se desarrollen métodos más rápidos para cuantificar el número de Enterococos como lo propone el programa de MST, éstos no determinarán la fuente de contaminación. Ante tal desconocimiento no se podrá identificar la procedencia de la bacteria y poder realizar un plan de manejo que permita eliminar la fuente de contaminación ya sea animal o humana. Por tal razón es de vital importancia investigar el origen de la fuente de Enterococos y así llevar a cabo medidas correctivas específicas para el tipo de contaminación, erradicar el riesgo a los seres humanos y mejorar la calidad del ambiente.

### **Hipótesis**

La fuente de contaminación predominante de Enterococos en el balneario de Patillas es de origen humano.



## **Meta y objetivos**

Este estudio microbiológico, químico y ambiental tiene como meta cuantificar e identificar la contaminación microbiana que afecta el balneario de Patillas para desarrollar estrategia que permitan corregir la situación que afecta el balneario. Los objetivos específicos de esta investigación son los siguientes:

1. Determinar el número de colonias de Enterococos en 100ml de agua.
2. Determinar mediante marcadores moleculares si la contaminación con Enterococos es de origen animal o humano y poder identificar la fuente de contaminación.
3. Desarrollar recomendaciones de acciones correctivas que ayuden a disminuir o erradicar el problema de contaminación en el balneario de Patillas.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **Trasfondo histórico**

Ante la necesidad de establecer controles y normas a seguir en cuanto a la calidad de agua en los cuerpos de agua con fines recreativos el 10 de octubre de 2000 se firma la ley BEACH. Esta ley enmendó el CWA, específicamente la sección 303, donde se establece que los estados y territorios de los Estados Unidos tienen la responsabilidad del cumplimiento con estos estándares de calidad establecidos en el código de regulaciones federales (Code of Federal Regulation [CFR], por sus siglas en inglés) en cuerpos de agua con fines recreativos. Además de cumplir con los estándares de calidad, cada estado o territorio tiene la responsabilidad de establecer programas de monitoreo y notificación a los usuarios de las condiciones de sus cuerpos de aguas como también tener una base de datos pública que provea información de las condiciones de los cuerpos de aguas (USEPA, 1977, 2000b, 2007a).

En el 2006, según el informe titulado “Examinando las Aguas” del Consejo de Defensa Nacional de Recursos (Natural Resources Defense Council [NRDC], por sus siglas en inglés), el número de días con cierres y advertencias de salud en playas de océanos, bahías y los Grandes Lagos aumentó 28% con una marca de 25,643 en todo Estado Unidos. Este ha sido el mayor aumento porcentual desde el 2003, cuando se duplicó el número de playas monitoreadas por lo menos semanalmente gracias a las subvenciones de la Ley BEACH administradas por la EPA. En el 2006, hubo un aumento

inferior al 1% en el número de playas monitoreadas por lo menos semanalmente, pero un notable aumento en la cantidad de lluvia en algunas partes del país que parece ser el factor determinante para el aumento en los días de cierres y advertencias para la salud. A nivel regional, los mayores aumentos porcentuales obtenidos en el 2005 fueron a lo largo de la costa de New York—New Jersey para un 96%, seguido del oeste para un 91%, New England para un 75%, la península DelMarVa para un 43%, y los Grandes Lagos para un 7%. Hubo una disminución general en los días de cierre o advertencias de salud en el Golfo de un 14% y en el Sureste de un 3% (Dorfman & Stoner, 2007). En el 2006, el porcentaje de todas las muestras que superaron las normas de salud nacional disminuyó al 7% con respecto al 8% en 2005. A nivel regional, los excedentes porcentuales más altos fueron en la costa de los Grandes Lagos (14%), seguidos de los estados del oeste para un 8%, la Península de DelMarVa, el Golfo, New England y NY-NJ (cada uno en 6%), y el sureste (3%).

En todo Estados Unidos, incluyendo a Puerto Rico, los funcionarios a cargo de las playas siguen utilizando métodos tradicionales que tardan aproximadamente 24 horas en detectar niveles indicadores de bacterias en muestras de agua de las playas. Algunos estados, como California y New Jersey, están haciendo pruebas piloto con métodos que dan resultados en unas cuatro horas. Algunas comunidades en siete estados (Indiana, Maryland, Ohio, New Hampshire, New York, South Carolina y Wisconsin) y la JCA en Puerto Rico están utilizando o desarrollando modelos computacionales que les permiten predecir concentraciones que indican niveles de bacterias aproximadamente en una hora utilizando medidas físicas en la playa, como niveles de lluvia, velocidad y dirección del viento, mareas y altura de las olas (Dorfman & Stoner, 2007). Algunas comunidades de

15 estados hacen cierres preventivos de playas o emiten advertencias para la salud basados solamente en los niveles de lluvia (California, Connecticut, Delaware, Florida, Hawai, Maine, Missisipi, North Carolina, New Hampshire, New Jersey, New York, Pensilvania, Rhode Island, South Carolina y Wisconsin). Louisiana está elaborando normas preventivas en base a la lluvia (Dorfman & Stoner, 2007).

### **Principales hallazgos.**

Durante el 2006, las playas de los océanos, las bahías, los Grandes Lagos y algunas playas de agua dulce en los Estados Unidos tuvieron 25,643 días de cierres y advertencias para la salud, 73 cierres y advertencias para la salud prolongados (de siete a 13 semanas consecutivas) y 69 cierres y advertencias para la salud permanentes (más de 13 semanas consecutivas). El total de cierres y advertencias para la salud, incluyendo los días de los cierres o advertencias prolongadas alcanzan los 29,785 días (Dorfman & Stoner, 2007).

Desde 1992 se documentan más de 155,286 días de cierres y advertencias para la salud y 562 cierres y advertencias prolongados. El número de días de cierres y advertencias de salud de playas aumentó 28% representando un total de 5,568 días en el 2006. Los dos factores principales que llevaron al aumento en el 2006 parecen ser las fuertes lluvias en algunas áreas, particularmente en Hawai, y la contaminación con aguas pluviales y residuales cargadas de bacterias que contaminan el agua de las playas. El porcentaje de playas monitoreadas, por lo menos una vez por semana, se mantuvo constante en 79%.

El alto nivel de continuo de cierres y advertencias para la salud indica que un monitoreo periódico continúa revelando graves niveles de contaminación en las playas de

las costas, las bahías y los Grandes Lagos de Estados Unidos. El informe de NRDC muestra que 15,738 (63%) de los cierres y advertencias del 2006 se emitieron porque la calidad de agua monitoreada reveló niveles de bacterias que superaron las normas de salud y de seguridad. Las principales causas de cierres y advertencias para la salud en las playas durante el 2006 se indican a continuación: (1) un 63% (15,738) se basaron en monitoreos que detectaron niveles de bacterias que excedían las normas de calidad de las aguas de las playas para una disminución del 75% comparado con el 2005, (2) un 33% (8,334) fueron por precaución, debido a lluvias que se sabe que contaminan las aguas donde se practica la natación para un aumento del 21% comparado con el 2005, y (3) un 4% (966) fueron en respuesta a eventos que se conoce que causan contaminación, como fallas en plantas de tratamiento de aguas residuales o daños en tuberías de drenaje. En otras palabras, las localidades no esperaron los resultados de los monitoreos para decidir los cierres de playas o emitir advertencias. El aumento fue de 3% comparado con el 2005. Menos del 1% (89) fueron asociados por ejemplo, a otras causas, como el dragado y el crecimiento de algas este renglón tuvo una disminución del 2% comparado con el 2005.

### **Marco conceptual o teórico**

#### **Estudio de casos.**

Los Enterococos son un grupo de estreptococos fecales que se caracterizan por la habilidad de crecer en 6.5% cloruro de sodio (NaCl), a bajas y altas temperaturas 10 grados centígrados (°C) y 45°C y a valores de (pH) alto (9.5) (Manero & Blanch, 1999). Estos microorganismos son utilizados como indicadores de contaminación fecal y son de gran valor en ambientes marinos y aguas de recreación como indicadores de riesgos potenciales para la salud y gastroenteritis relacionada a personas que nadan en éstas

(Scott et al., 2002). Los Enterococos son bacterias no patogénicas cuando residen en su hábitat normal como en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Fuera de su hábitat normal, los Enterococos son patogénicos causando infecciones en el tracto urinario y heridas, bacteriemia, endocarditis y meningitis, entre otros (Scott et al., 2002).

Ante esta situación, la EPA presentó el 20 de abril de 2004, la estrategia para administrar el plan de playas limpias. En este plan, la EPA, pretende ayudar a todos los estados y regiones de Estados Unidos proveyendo las herramientas necesarias y específicas para reducir los riesgos de infección a las personas que utilizan los cuerpos de agua con fines recreativos. En este plan se describen los dos aspectos más importantes que se desean alcanzar. El primer aspecto es promover el programa de calidad de agua y el segundo crear mejoras científicas que apoyen y mejoren el monitoreo y el reporte de los cuerpos de agua. Por esto, encontramos un creciente interés en el desarrollo de métodos de cuantificación mucho más rápidos como también el desarrollo de métodos de identificación con el fin de mejorar la calidad del ambiente y eliminar o reducir la exposición de microorganismos a los seres humanos (USEPA, 1999).

Con el fin de presentar nuevas alternativas para cuantificar e identificar microorganismos indicadores con los de contaminación fecal utilizando los métodos de MST en los Estados Unidos se han desarrollado varios estudios. A continuación se presentan una descripción general de algunos estudios desarrollados (USEPA, 2005a).

#### ***Caso #1: St. Andrews Park (Georgia) 2004***

La playa es aproximadamente 1.3 kilómetros de largo y esta limitado al norte por riachuelos y al sur por la isla Jekyll. Muestreos previos sugirieron que la contaminación fecal podría ser originada por un número de lugares al norte de la playa. Un muestreo

específico se elaboró en los riachuelos y en las tuberías que descargaban al río Jekyll el cual fluye hacia el norte del parque. Muchos de los muestreos en los riachuelos demostraron un alto conteo de Enterococos. En adición, una de las tuberías de descargas de un restaurante local estaba rota y posteriormente fue reparada. En conclusión, se estableció que durante patrones de tiempo calmado, altas concentraciones de Enterococos fueron detectadas en los riachuelos y sedimentos y en el área de bañistas. La gran proporción de *Enterococcus fecalis* en los riachuelos fue interpretada como resultado de contaminación de humanos y animales salvajes. Al final, la conclusión se dirigió a que la fuente principal de contaminación era de origen animal y no de origen humano, debido a la caracterización del humedal del lugar el cual imposibilita la presencia de humanos (USEPA, 2005a).

### ***Caso #2: Tampa Bay (Florida) 2000***

Tampa Bay esta localizado en la costa de Florida en contacto con el Golfo de México. Éste es un estuario subtropical y uno de los más grandes de la costa sur de los Estados Unidos. La evaluación de riesgo a los usuarios de cuerpos de aguas con fines de recreación ha sido uno de mucha importancia en los Estados Unidos y no ha sido la excepción el Tampa Bay. Éstos establecieron los límites de descarga a los lugares de recreación y establecieron los estándares de calidad del agua con fines recreativos. Además, elaboraron un estudio debido a la inconsistencia en los resultados de indicadores fecales específicamente *E.coli* debido a su crecimiento normal en vegetación en climas tropicales y se recomendó Enterococos y *Clostridium perfringens* como mejores indicadores de contaminación fecal en regiones tropicales y subtropicales (USEPA, 2005a).

### ***Caso #3: Vermillion River (Minnesota) 2004***

El río Vermillion comprende 372 millas cuadradas mayormente localizado en el sur de Dakota. La utilización de las tierras alrededor del río es mayormente de agricultura y con pequeñas zonas urbanas. En el año 1998, el río no cumplió con los estándares de calidad debido a su alto nivel de bacterias y no podía ser utilizado para fines recreativos. Por esto, se desarrolló un estudio cuyo fin fue determinar cual era la mayor fuente de contaminación fecal al cuerpo de agua por medio de reacción de cadena de polimerasa (Polimerase Chain Reaction [PCR], por sus siglas en inglés). Al concluir el análisis, los resultados obtenidos de la identificación de las mayores fuentes de contaminación se obtuvo que un 14% fueron de ganso, un 12% de cerdos, 10% de vacas, 9% de humanos, 9% de venados, 9% de ovejas y 9% de pavos (USEPA, 2005a).

### ***Caso#4: Río Anacostiar (Maryland / District of Columbia) 2003.***

El río Anacostia consiste de 15 kilómetros y está bordeado por un 2% de tierras de uso agrícola, 28% de bosques y parques y un 70% de residencial y zona industrial. Este río no alcanzó los estándares establecidos en el CWA debido a altos niveles de coliformes fecales. Este estudio fue dirigido a la identificación de la mayor fuente de contaminación y específicamente determinar si la contaminación fecal de origen humano estaba presente. Para el desarrollo de este estudio se utilizaron una combinación de técnicas de resistencia a antibióticos y con electroforesis de gel de campo eléctrico (Pulsed Field Gel Electrophoresis [PFGE], por sus siglas en inglés). Al finalizar este estudio se logró determinar que las fuentes de contaminación más predominantes fueron de 31% aves, 25% de animales salvajes, 24% de origen humano y un 20% de mascotas (USEPA, 2005a).



### ***Caso#5: Bahía Avalon (California) 2003***

En la bahía Avalon de California, durante el verano de 2000 al 2001, las muestras de agua frecuentemente excedían el estándar de Enterococos por lo que letreros de aviso a los usuarios fueron colocados en el área. Al comienzo de la investigación no era claro cuales eran las fuentes principales de contaminación, si eran descargas de aguas usadas, de origen animal o de origen humano. En términos de las descargas de aguas usadas se pensó que era poco probable debido al plan agresivo establecido para controlar dicha contaminación. El análisis se llevó a cabo utilizando el método de huésped específico por medio de PCR. Al final del estudio se demostró que las fuentes predominantes lo eran aves, aguas subterráneas contaminadas y drenajes, y demostró presencia de contaminación fecal de origen humano (USEPA, 2005a).

En términos generales, al igual que estos estudios, un sin número de estudios se están realizando en los Estado Unidos con el fin de alcanzar el cumplimiento con los estándares de calidad de agua establecidos por la EPA. Además de alcanzar los estándares de calidad, se están desarrollando métodos que cuantifiquen especies con mayor prontitud y que puedan identificar especies para así poder desarrollar medidas correctivas específicas y poder erradicar por completo la contaminación en los cuerpos de aguas con fines de recreación.

### **Marco legal**

En los Estados Unidos, las regulaciones para la protección de las aguas con fines de recreación fueron consideradas por primera vez en el año 1924 por el comité de la Asociación de Salud Pública Americana de los Estados Unidos. Éstos decidieron no establecer estándares debido a la falta de información epidemiológica y por la precaución

de alarmar a los usuarios sin una clara evidencia. El Comité mantuvo su posición hasta 1936 cuando propusieron que era inaceptable la calidad del agua si ésta contenía más de 1,000 colonias de coliformes fecales en 100 mililitros de agua (1,000 col/100 ml). Esta decisión fue basada en la creencia de que los coliformes fecales estaban directamente relacionados con materia fecal y su presencia implicaba la presencia potencial de patógenos entéricos. A finales de 1940 y principios del 1950, el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos llevó a cabo, en los Estados Unidos, una serie de estudios epidemiológicos para determinar los efectos a la salud asociado a nadar en aguas contaminadas. Los estudios demostraron que existía un efecto a la salud cuando las densidades de coliformes totales eran cerca de 2,000 col/100 ml. Basado en esto, la Comisión Federal de Contaminación de Agua de los Estados Unidos, elaboró un reporte acerca de los criterios de calidad del agua, e integró unas recomendaciones que se documentan en el manual de análisis de agua “The Green Book” que fue realizado por el Cuerpo de Ingenieros de los Estados Unidos y la EPA. El Comité propuso que los coliformes fecales no excedieran una densidad promedio de 200 col/100 ml ni debería exceder de exceder 400 col/100 ml para el 10% de las muestras tomadas durante cualquier periodo de 30 días. Posteriormente, en el 1976 y como requisito legal de presentar nuevos criterios de calidad de agua basado en los últimos conocimientos científicos, la EPA redactó los criterios de calidad del agua en un nuevo manual que se nombró “Red Book”. En dicho manual, la EPA recomendó los mismos criterios establecidos en el manual “The Green Book” para coliformes fecales (Sloat & Ziel, 1992; USEPA, 1999, 2007b).

Para mantener la calidad de las aguas superficiales, en el 1986, la EPA llevó a cabo nuevas recomendaciones las cuales establecen un límite de Enterococos de 35 col/100 ml en aguas marinas y de 33 col/100 ml en agua dulce. Además, se recomendó que en agua dulce la densidad de *Escherichia coli* no exceda 126 col/100 ml (JCA, 2003; USEPA, 1999).

En términos legales, la CWA, establece que los estados deben adoptar estándares de calidad de agua que sean compatibles con los programas de control de contaminación con el propósito de disminuir las descargas de contaminantes a los cuerpos de agua. Estos estándares se encuentran documentados en el CFR en el capítulo 40 parte 131 “Water Quality Standards for Coastal and Great Lakes Recreations Waters”. En muchos casos, los estándares han sido alcanzados debido a la significativa reducción de descargas desde fuentes identificadas bajo el programa de “National Pollutant Discharge Elimination System” (NPDS). A pesar de la implantación de CWA hace 30 años, una fracción significativa de cuerpos de agua continúa siendo clasificada no apta para su uso debido a los altos niveles de bacterias fecales (USEPA, 2000b). Como consecuencia, la protección de aguas utilizadas con fines de recreación y los abastecimientos de agua pública contra la contaminación de microorganismos fecales es uno de los retos más importantes y difíciles para los científicos ambientales.

Ante esta situación de contaminación de las aguas superficiales con fines recreativos, el 10 de octubre de 2000 se firmó la ley BEACH y enmendando específicamente la sección 303 del CWA donde se establece que los estados y territorios de los Estados Unidos incluyendo a Puerto Rico tienen la responsabilidad del cumplimiento con estos estándares de calidad establecidos en el CFR en cuerpos de agua

con fines recreativos. Además de cumplir con los estándares de calidad, cada estado o territorio tiene la responsabilidad de establecer programas de monitoreo y notificación a los usuarios de las condiciones de sus cuerpos de aguas como también tener una base de datos públicos que provea información de las condiciones de los cuerpos de aguas. Es de esta forma, y bajo la ley de política pública ambiental de Puerto Rico, que la isla entra en el programa de BEACH y requiere un monitoreo y avisos públicos de las condiciones de los cuerpos de agua. Es bajo esta ley de política pública ambiental que se faculta a la JCA como la agencia responsable de la evaluación de los cuerpos de agua y controlar las fuentes de contaminación dispersas existentes. Además del cumplimiento con la ley de política pública ambiental, la JCA tiene la responsabilidad de designar los usos de los cuerpos de agua, prescribir los estándares de calidad de agua, identificar otras reglas y reglamentos aplicables a las fuentes de contaminación que pudieran estar afectando la calidad de las aguas y prescribir medidas adicionales necesarias para alcanzar y mantener la calidad del agua. Estas funciones de la JCA son establecidas en el reglamento de estándares de calidad de agua de Puerto Rico con el fin de preservar, conservar y restaurar la calidad de agua en Puerto Rico (JCA, 2004).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **Área de estudio**

Este estudio lo realizamos en el balneario del municipio de Patillas localizado al sur este de Puerto Rico. En su hidrografía, Patillas cuenta con el Río Grande de Patillas el cual tiene su origen al norte del Barrio Mulas en la Sierra de Cayey del municipio de Patillas. Este río corre hacia el sur por nueve millas hasta descargar en el Lago Patillas y luego cinco millas más hasta desembocar en el Mar Caribe al sur de Puerto Rico. Es específicamente cerca de la desembocadura de este río que se encuentra el barrio Bajos donde está localizado el balneario de Villa Pesquera (Figura 1). La villa Pesquera tiene una dimensión de 167 metros (m) y cuyo oleaje es tranquilo ya que tiene un banco de arrecife por toda su bahía y no deja que las olas fuertes entren al área de las orillas. El efecto de poco o ningún oleaje en la zona reduce el proceso de difusión aumentando el potencial peligro en caso de alguna contaminación.

#### **Descripción del muestreo**

El muestreo lo llevamos a cabo según el método EPA-821-R-06-009 desarrollado por la EPA (USEPA, 2005b). Este lo realizamos una vez por semana durante el mes octubre en 19 puntos dentro de los límites establecidos en el balneario como área para bañistas y cada punto de muestreo fue determinado por la unión entre transepto y zona (Figura 2).

Un transepto lo definimos como una línea imaginaria a través de un punto fijo en el balneario y que formar un ángulo recto con la costa. En el caso de la zona la definimos como una línea de contorno de igual profundidad y en paralelo con la costa. Seleccionamos el punto de muestreo identificado como frente a los baños que utiliza la JCA para elaborar el muestreo como el transepto del centro en la costa para definir el primer transepto (Figura 3).

Las muestras de agua las colectamos a una profundidad bajo la superficie de 0.075 m en las muestras “profundidad de tobillo” y de 0.3 m para las muestras “profundidad a la rodilla” y “profundidad al pecho” (Figura 4 y 5). Las muestras fueron colectadas en botellas de 500 ml de polietileno previamente esterilizadas.

### **Parámetros físicos**

Utilizamos un U-10 Water Quality Checker (HORIBA®) para medir los parámetros físicos, en el cual obtuvimos el pH, temperatura, conductividad, salinidad, turbidez y oxígeno disuelto, entre otros de cada muestra en el balneario. Anotamos la cantidad de personas, animales, basura y cualquier otro dato relevante para el análisis de los resultados.

### **Colección de la muestra**

Las muestras de agua para ensayos bacteriológicos las colectamos por el método establecido en EPA-821-R-06-009 (USEPA, 2005b). Previo a su uso, las botellas de polietileno fueron esterilizadas en autoclave a una temperatura de 121°C por un mínimo de 15 minutos (min). Todas las muestras las identificamos en el lugar de muestreo con la fecha, hora, lugar y firma del colector. Las muestras las almacenamos en hielo a 4°C

hasta ser llevadas al laboratorio para procesarlas en un tiempo no mayor a 12 horas (Harwood, Shehane & Ulrich, 2005).

### **Método de cuantificación e identificación**

#### **Cuantificación.**

Para el proceso de cuantificación utilizamos el método de la EPA 1600 de filtración a través de membranas como lo establece CWA (USEPA, 2000c, 2006a). En general, este método utiliza el medio “membrane-*Enterococcus* Indoxyl- $\beta$ -D-Glucoside Agar” (mEI agar). Éste es un medio selectivo utilizado para la detección y cuantificación de Enterococos en agua. Una vez que las muestras fueron filtradas, los filtros se colocaron en las placas de mEI agar e incubadas a 41°C por 24 horas. Después de la incubación se identificaron y cuantificaron las colonias de Enterococos (pequeñas y grises con un halo azul) utilizando una lámpara fluorescente con magnificación.

#### **Control de calidad.**

Los requisitos mínimos de control de calidad para el análisis de muestras utilizando el método 1600 incluye la demostración inicial de la capacidad del laboratorio a través del análisis de recobro y precisión inicial (ingoin process recovery [IPR], por sus siglas en inglés), la demostración continua de capacidad a través del análisis de recobro y precisión continua (ongoing process recovery [OPR], por sus siglas en inglés) y el análisis rutinario de controles positivo y negativo, verificación de la esterilidad de filtro, método del blanco y la verificación de la esterilidad del medio (USEPA, 2000c, 2006a).

El análisis de IPR lo utilizamos para demostrar el cumplimiento del método y lo realizamos en cada laboratorio antes de utilizar el método para el monitoreo de muestras

de campo. La EPA recomienda, pero no requiere, que el IPR sea llevado por cada analista. Las muestras de IPR fueron acompañadas por un método aceptable de blanco y un cotejo de esterilidad del medio. El análisis de IPR lo realizamos de la siguiente forma comenzando con la preparación de cuatro muestras de 100 ml de “Phosphate Buffer Saline” (PBS) y añadimos a cada muestra *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). Luego, filtramos y procesamos cada muestra de IPR. Calculamos el % de recobro y utilizamos este % de todas las muestras. Determinamos el promedio y la desviación estándar relativa (Relative Standard Deviation [RSD], por sus siglas en inglés). La RSD es la desviación estándar dividida por el promedio y multiplicado por cien. Comparamos el promedio y el RSD con los criterios establecidos en el método 1600 de la EPA. Si el promedio y el RSD para el recobro de Enterococos cumplían con los criterios establecidos se podía comenzar el análisis de muestras. Por otro lado, si el promedio del porcentaje de recobro o el RSD no cumplían con los criterios establecidos, un análisis para la identificación del problema era requerido y una vez identificado se corrigió y repetió el análisis de IPR.

Para demostrar el continuo control de los sistemas de análisis, analizamos rutinariamente las muestras de PBS que se prepararon añadiendo *E. faecalis* (ATCC 19433). Analizamos por lo menos una muestra OPR cada 20 muestras de campo o una por semana, lo que ocurriera con mayor frecuencia. Las muestras de OPR fueron acompañadas por un método aceptable de blanco y un cotejo apropiado de esterilidad de medio. El análisis de OPR fue llevado a cabo añadiendo *E. faecalis* (ATCC 19433) a una muestra de 100 ml de PBS. Filtramos y procesamos cada muestra de IPR y calculamos el número de Enterococos en 100 ml y el por ciento de recobro para las muestras de OPR utilizando una ecuación. Comparamos el valor obtenido con los criterios establecidos en



el método 1600 de la EPA. Si el valor de OPR cumplía con los criterios establecidos se podía comenzar el análisis de muestras. Por otro lado, si el valor de OPR no cumplía con los criterios establecidos, un análisis para la identificación del problema era requerido y una vez identificado se corregía y repetía el análisis de OPR.

Los resultados de OPR e IPR fueron anotados para mantener un registro con el fin de monitorear el continuo funcionamiento del método. Desarrollamos un análisis de exactitud del método 1600 calculando el promedio de los porcentos de recobro y su desviación estándar para expresar la exactitud en términos de intervalo de  $R \pm 2sr$ .

#### *Cultivos controles.*

Analizamos los controles negativos para asegurar que el mEi agar estaba funcionando apropiadamente. Los controles negativos fueron analizados cada vez que un nuevo medio para a los reactivos era utilizado. Para un análisis continuo realizamos el control negativo cada vez que analizamos las muestras. El control negativo fue llevado a cabo filtrando una suspensión diluida viable de *E. coli* (ATCC 11775). La viabilidad del control negativo fue demostrada utilizando un medio no selectivo como agar tríptico de soya. En el caso de que el control negativo no presente la respuesta apropiada, se deberá cotejar y/o reemplazar los medios, reactivos o los controles negativos y reanalizar el control negativo.

Analizamos el control positivo con el fin de asegurar que el mEi agar está funcionando apropiadamente. Los controles positivos fueron analizados cada vez que un nuevo medio a reactivo era utilizado. Para un análisis continuo realizamos el análisis de control positivo cada vez que analizamos las muestras. La muestra de OPR podía ser utilizada como control positivo (USEPA, 2006b). El control positivo fue llevado a cabo

filtrando una suspensión diluida viable de *E. faecalis* (ATCC19433) y analizado para identificar las colonias según el EPA-821-R-06-009. Si el control positivo no presentaba la respuesta característica de colonias de Enterococos cuyo diámetro es mayor o igual a 0.5 mm con un halo azul se cotejaba y/o reemplazaba los medios, reactivos o los controles positivos y se analizaba nuevamente el control positivo.

*Controles para la verificación de medio.*

Todos los medios fueron verificados con los controles positivos y negativos siempre que un reactivo nuevo era utilizado. En un análisis continuo se realizaba los controles positivos y negativos en los medios de verificación con cada grupo de muestras de campo obtenidas.

*Verificación de colonias.*

Verificamos 10 colonias típicas positivas y 10 colonias atípicas negativas por mes, o una colonia típica y una colonia atípica del 10 % de todas las colonias típicas (lo que fuera mayor).

Como parte del proceso de verificación, las colonias  $\geq 0.5$  milímetros (mm) de diámetro de cualquier color que contengan un halo azul en el agar mEi fueron consideradas como colonias de Enterococos típicas. En el procedimiento utilizamos una aguja estéril de inocular para transferir una porción del crecimiento del centro de un mínimo de 10 colonias típicas de Enterococos bien aislada y 10 colonias atípicas a un tubo de Brain Heart Infution Broth (BHIB) y a un tubo de Brain Heart Infution Agar (BHIA). Incubamos el BHIB por un periodo de  $24 \pm 2$  horas y el BHIA por un periodo de  $48 \pm 3$  horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ . Luego de 24 horas de incubación, transferimos parte del crecimiento de cada tubo BHIB hacia Bile Esculin Agar (BEA), BHIB y BHIB con

cloruro de sodio (NaCl) al 6.5%. Incubamos BEA y BHIB con 6.5% NaCl a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por un periodo de  $48 \pm 3$  horas. Incubamos BHIB a  $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por un periodo de  $48 \pm 3$  horas. Observamos todos los medios de verificación para crecimiento. Luego del periodo de incubación llevamos a cabo la tinción de Gram utilizando el crecimiento de cada BHIA. Las bacterias en forma de cocos Gram positivos que crecieron e hidrolizaron esculina en BEA (produciendo un precipitado negro o marrón) y crecieron en BHIB con 6.5% NaCl a  $35^{\circ}\text{C}$  y BHIB a  $45^{\circ}\text{C}$  fueron identificados como Enterococos.

#### *Verificación de esterilidad de filtro*

Colocamos como mínimo un filtro de membrana (por lote de filtro) en una placa Trytic Soy Agar (TSA) y se incubó por un periodo de  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . La ausencia de crecimiento indicaba la esterilidad del filtro. Como parte del control de calidad se llevó a cabo la verificación de la esterilidad de filtro cada día que las muestras fueron analizadas.

#### *Método del blanco*

Filtramos 50 ml de PBS estéril y colocamos el filtro en una placa de agar mEi. La ausencia de crecimiento indicaba que no había contaminación del proceso. Este procedimiento se llevó a cabo cada día que las muestras fueron analizadas.

#### *Filtración de blanco*

Filtramos 50 ml de PBS estéril antes de comenzar las filtraciones de las muestras. Colocamos el filtro en una placa de TSA e incubamos por un periodo de  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ . Ausencia de crecimiento indicaba esterilidad de la solución amortiguadora de PBS y del equipo de filtración.

### *Verificación de esterilidad del medio*

Examinamos la esterilidad del medio incubando una unidad (tubo o placa) de cada medio (TSA, mEi agar, y medios de verificación) apropiadamente y observamos si ocurría algún crecimiento. Ausencia de crecimiento indicaba esterilidad del medio. La verificación de la esterilidad del medio se llevó a cabo cada día que las muestras fueron analizadas.

### *Variabilidad de conteo de colonias*

Un conteo en duplicado de un filtro de membrana cada mes se llevaba a cabo si era solo un analista. El conteo en duplicado de colonias tenía que estar dentro del 5% para un solo analista. De no tener muestras de campo positivas para el conteo, la muestra de OPR era utilizada para esta determinación.

### *Calibración y estandarización*

Verificación de la temperatura de las incubadoras era realizada dos veces al día con un mínimo de 4 horas de diferencia entre lecturas para asegurar que la operación estaba dentro de los límites. Verificación de los termómetros era realizada anualmente utilizando un estándar certificado de NIST o alguno que cumpla con los requisitos de la monografía de NIST SP 250-23. Los refrigeradores utilizados para almacenar medios y reactivos eran monitoreados diariamente para asegurar un control de temperatura adecuado.

### *Preparación de los estándares*

Preparación de la cultivo madre: Inoculamos TSA (o algún otro medio no selectivo) con *E. faecalis* (ATCC 19433) e incubamos a  $35^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 20

$\pm 4$  horas. Este cultivo madre podía ser almacenado en la oscuridad a temperatura ambiente hasta 30 días.

Preparación de la suspensión no diluida: Preparamos una solución 1% Azide Dextrose Broth (ADB) combinando 99 ml del PBS y 1 ml ADB en un envase estéril. Utilizando el cultivo madre de *E. faecalis* transferimos una porción del crecimiento a la solución 1% ADB y agitamos vigorosamente por lo menos en 25 ocasiones. Dispersamos el inóculo agitando vigorosamente el cultivo del caldo e incubamos a  $35 \pm 3^\circ\text{C}$  por un periodo de  $20 \pm 4$  horas. Este cultivo fue referido como suspensión no diluida y contenía aproximadamente  $1.0 \times 10^6 - 1.0 \times 10^7$  CFU de *E. faecalis* por cada ml del cultivo.

Diluciones: Mezclamos las suspensiones no diluidas agitando cuidadosamente por un mínimo de 25 veces y preparamos las siguientes diluciones:

Dilución A: Asépticamente transferimos 1 ml de la suspensión no diluida a 99 ml de PBS estéril y mezclamos cuidadosamente por lo menos en 25 ocasiones. Esta solución era conocida como Dilución A y 1 ml contenía  $10^{-2}$  ml de la suspensión original no diluida.

Dilución B: Asépticamente transferimos 1 ml de la suspensión (Dilución A) a 99 ml de PBS estéril y mezclamos cuidadosamente por lo menos en 25 ocasiones. Esta solución era conocida como Dilución B y 1 ml contenía  $10^{-4}$  ml de la suspensión original no diluida.

Dilución C: Asépticamente transferimos 1 ml de la suspensión (Dilución B) a 99 ml de PBS estéril y mezclamos cuidadosamente por lo menos en 25 ocasiones. Esta solución era conocida como Dilución C y 1 ml contenía  $10^{-5}$  ml de la suspensión original no diluida.

Dilución D: Asépticamente transferimos 1 ml de la suspensión (Dilución C) a 99 ml de PBS estéril y mezclamos cuidadosamente por lo menos en 25 ocasiones. Esta solución era conocida como Dilución D y 1 ml contenía  $10^{-6}$  ml de la suspensión original no diluida.

Preparación del estándar de adición a la muestra: Añadimos 3 ml de la suspensión conocida como dilución D a 100 ml de PBS o al apropiado volumen de muestra y mezclamos cuidadosamente por lo menos en 25 ocasiones. El volumen de la suspensión añadida a cada 100 ml de muestras de  $3 \times 10^{-6}$  ml era referido como V añadido a 100ml de muestra. Filtramos el contenido de la solución y analizamos como lo establece la sección de preparación de las muestras.

Enumeración de las suspensiones: Preparamos placas de TSA en triplicado para las diluciones B, C y D. Mezclamos la Dilución B agitando la solución por un mínimo de 25 ocasiones. Transferimos 0.1 ml de la Dilución B en la superficie de cada una de las tres placas de TSA. Mezclamos la Dilución C agitando la solución por un mínimo de 25 ocasiones. Transferimos 0.1 ml de la Dilución C en la superficie de cada una de las tres placas de TSA. Mezclamos la Dilución D agitando la solución por un mínimo de 25 ocasiones. Transferimos 0.1 ml de la Dilución D en la superficie de cada una de las tres placas de TSA. Asépticamente, distribuimos el inóculo sobre la superficie de las placas rotando la placa. Invertimos las placas e incubamos a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  por un periodo de  $20 \pm 4$  horas. Contamos y anotamos el número de colonias por placa. El número de Enterococos (CFU/ml) en la suspensión no diluida fue calculado utilizando los resultados de las placas de TSA dentro del rango de 30 a 300 CFU por placa.

Cálculos de recobro para las muestras “spiked”: En los cálculos para la determinación de la concentración de las muestras (CFU/ml) en las suspensiones no diluidas utilizamos la siguiente ecuación:

$$\text{Enterococos (no diluida)} = (\text{CFU1} + \text{CFU2} + \text{CFUn}) / (\text{V1} + \text{V2} + \text{Vn})$$

CFU= número de unidades de colonias formadas en la placa de TSA que produjeron conteo en un rango de 30 a 300 CFU por placa.

V= Volumen de la muestra no diluida en cada placa de TSA que produjeron conteo en un rango de 30 a 300 CFU por placa.

n = número de placas que produjeron conteo de un rango de 30 a 300 CFU por placa.

Cálculo para la concentración verdadera de Enterococos “spiked” (CFU/ml) fue determinado utilizando la siguiente formula:

T “spiked” Enterococos = (Enterococos (no diluida)) x (V añadido a 100ml de muestra)

$$\text{T “spiked” Enterococos} = \text{número de Enterococos “spiked” (CFU/ml)}$$

Enterococos (no diluida) = Enterococos (CFU/ml) en suspensiones no diluidas “spiked”

(V añadido a 100ml de muestra)= ml de las suspensiones utilizadas por cada 100 ml.

Cálculo para la determinación del por ciento de recobro (R) de Enterococos “spiked” (CFU/ml) fue determinada utilizando la siguiente ecuación:

$$R = 100 \times (\text{Ns} - \text{Nu}) / \text{T}$$

R=% de recobro

Ns=Enterococos en la muestra “spike” (CFU/100ml)

Nu =Enterococos en la muestra no “spike” (CFU/100ml)

T=Valor verdadero de la muestra “spike” (CFU/100ml)

### ***Preparación de las muestras.***

En la preparación de la muestras rotulamos las placas y preparamos los reportes con la identificación de muestra y volumen de la muestra. Colocamos un filtro de membrana estéril en la base del equipo de filtración y se unió el embudo a la base por lo cual el filtro de membrana quedó entre el embudo y la base del equipo de filtración. Agitamos el envase de muestra vigorosamente cerca de 25 veces para distribuir la bacteria uniformemente y medimos el volumen deseado de muestra o de la dilución en el embudo. Seleccionamos un volumen de 100 ml de muestra de agua para producir de 20-60 colonias. Es recomendable que un mínimo de tres diluciones fueran analizadas para asegurar un conteo entre 20-60 colonias. Tamaños de muestra pequeños o diluciones de muestra fueron utilizadas para minimizar la interferencia de la turbidez o de altas densidades de bacterias. Diferentes volúmenes o diluciones de la misma muestra fueron filtrados. Cuando analizamos los volúmenes de muestra pequeños (< 20 ml), fue añadido de 20-30 ml de PBS al embudo para filtrar. Esto permitió una distribución uniforme de la muestra a través de la membrana. Filtramos la muestra y enjuagamos los lados del embudo un mínimo de dos veces con 20-30 ml del PBS. Apagamos el sistema de vacío y removimos el embudo de la base del filtro. Utilizando técnicas asépticas, removimos el filtro de membrana de la base del equipo de filtración y lo colocamos sobre la placa de mEi agar evitando formación de burbujas entre el filtro y el agar. Cerramos la placa de agar e incubamos a  $41^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  por un periodo de  $24 \pm 2$  horas. Al terminar la incubación



llevamos acabo el conteo de las colonias y el registro de las mismas con sus respectivas identificaciones. Cuando medimos el tamaño de las colonias era importante no incluir el halo. Utilizamos magnificación para el conteo y una lámpara fluorescente para obtener mayor visibilidad de las colonias.

*Análisis para el cálculo de la cantidad de Enterococos en 100 ml de agua.*

$Enterococos/100 \text{ mL} = 100 \text{ (número de colonias)} / \text{(volumen de la muestra filtrada, en ml)}$ .

### **Identificación.**

#### ***Extracción del DNA.***

Un volumen de 300 ml de cada muestra fue filtrada utilizando filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . En el caso de que el proceso de filtración se detuviera, un filtro adicional podía ser utilizado hasta alcanzar un volumen filtrado de 300 ml. Los filtros fueron incubados en agar mEi (medio básico Difco) a 41°C por 48 horas. Los filtros que contenían colonias de Enterococos fueron removidos y suspendidos en 2 ml en ADB y mezclados vigorosamente con un vortex e incubados por 3 horas a 41°C con movimiento para lavar las bacterias de los filtros y enriquecer el medio. Los tubos fueron centrifugados a 7,500 x g por 10 min. Luego de la centrifugación, el sobrenadante fue decantado y el “pellet” resultante fue resuspendido en 200 microlitros ( $\mu\text{l}$ ) del amortiguador Airway surface liquid (ASL) lysis (Qiagen, Inc) seguido de la incubación a 95°C por 5 min (Harwood et al., 2005; Scott, Jenkins, Lukasik & Rose, 2005).

La extracción del DNA fue realizada con el lisado resultante utilizando el kit QIA amp DNA Stool Mini Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Qiagen, Inc). Cuidadosamente, añadimos 15  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (Qiagen, Inc). La muestra fue agitada

inmediatamente e incubada a 70°C por 10 minutos. Luego añadimos 200 µl de etanol absoluto (ice cold) y agitamos inmediatamente. Transferimos el lisado resultante a las “filter spin columns” seguido de una centrifugación a 10,000 x g por 1 minuto. Lavamos la columna con 500 µl del amortiguador AW1 (QIAGEN, Inc) por centrifugación a 10,000 x g por 1 minuto. Luego, lavamos la columna con 500 µl del amortiguador AW2 (Qiagen, Inc) por centrifugación a 14,000 x g por 3 minutos. El flujo fue descartado y la columna fue secada por centrifugación a 14,000 x g por 1 minuto. El DNA purificado fue removido de la columna con 200 µl del amortiguador AE (Qiagen, Inc) por centrifugación a 10,000 x g por 1 minuto. El eluado se almacenó a –20°C hasta ser utilizado en el PCR (Harwood et al., 2005; Scott et., 2005).

#### ***Electroforesis de gel de agarosa.***

Los productos del PCR fueron visualizados mediante el uso de geles de agarosa de 1% en TBE 1%. Las muestras fueron teñidas usando 20X Gel Star® según instrucciones del fabricante y vistas bajo luz ultravioleta. Para determinar el tamaño de los fragmentos se usó una escalera de 100 pares de bases.

#### **Método de análisis espacial**

Como parte del estudio y con el propósito de identificar el origen de la fuente de contaminación en el balneario de Patillas elaboramos un análisis espacial del área del Bajo de Patillas. Para este análisis delimitamos el área de estudio como el balneario de Patillas y todas las posibles rutas de que desembocan en dirección al balneario (USEPA, 2000d). Elaboramos una caracterización del área de estudio identificando elevaciones topográficas, cuerpos de agua, escorrentías, uso de terrenos, la identificación de todas las

posibles fuentes de contaminación fecal en el área de Patillas y un análisis de la proximidad de las fuentes de contaminación al área de estudio (USEPA, 2000d).

### **Análisis estadísticos**

La Agencia de Protección Ambiental en conjunto con la Junta de Calidad Ambiental bajo el Programa de Monitoría de Playas y Notificación Pública tiene la responsabilidad de: (1) llevar a cabo las monitorias bacteriológicas en las playas de mayor uso por bañistas, (2) notificar los resultados de las monitorias que se realizan cada dos semanas en las playas incluidas en el programa y (3) la protección de la salud de los bañistas que visitan estas playas.

En cada playa el muestreo bacteriológico consiste en obtener muestras de agua para coliformes fecales y Enterococos. En Puerto Rico, la JCA utiliza estos grupos de bacterias como indicadores de posible contaminación fecal. En el Reglamento de Estándares de Calidad de Agua, la JCA ha establecido los valores máximos aceptables de indicadores para el contacto primario (natación) en la playa. El programa incluye un total de 23 playas dentro de la cuales se encuentra el balneario de Patillas. Este balneario consta aproximadamente de más de 30 metros de longitud de costa y se encuentra bordeado por arrecifes, lo cual promueve a que la marea sea una calmada (Figura 1). La JCA tradicionalmente obtiene muestras en tres puntos diferentes cada dos semanas que incluye el punto de muestreo 1 aguas arriba del puente, punto de muestreo 2 en el extremo izquierdo del balneario y el punto de muestreo 3 frente a los baños (Figura 2). Estos muestreos son realizados con el fin de monitorear y garantizar el cumplimiento con los estándares de agua establecidos por la EPA y para la notificación al público de existir alguna contaminación bacteriana. Utilizamos el programa de Data Análisis Plus para el

análisis estadístico de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA como también para el análisis estadístico realizado de los datos obtenidos del muestreo realizado en el mes de octubre. Llevamos a cabo un análisis de promedio aritmético, promedio geométrico de los valores obtenidos por la JCA y los valores obtenidos en el muestreo para la comparación con los estándares establecidos de 35 CFU y con el 75% del límite de confianza de 104 CFU. Presentamos un análisis de frecuencia con el fin de identificar el número de muestras que excedieron el límite del promedio geométrico de 35 CFU y que excedieron el límite de confianza del 75% que es de 104 CFU. Realizamos un análisis de regresión lineal y determinamos el coeficiente de correlación entre los valores de CFU y los parámetros físicos y químicos con el fin de identificar la existencia de alguna o ninguna relación. En adición, un análisis de correlación se llevó a cabo entre los valores de CFU obtenidos en los puntos de muestreo de la JCA en el mismo año, entre los diferentes años, entre los transeptos y las zonas con el fin de identificar tendencias de comportamiento en el área.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Resultados**

##### **Datos de los muestreos realizados por la JCA (2006-2009).**

La Agencia de Protección Ambiental en conjunto con la Junta de Calidad Ambiental bajo el Programa de Monitoría de Playas y Notificación Pública tiene la responsabilidad de: (1) llevar a cabo las monitorias bacteriológicas en las playas de mayor uso por bañistas, (2) notificar los resultados de las monitorias que se realizan cada dos semanas en las playas incluidas en el programa y (3) la protección de la salud de los bañistas que visitan estas playas. Como parte de nuestra investigación, utilizamos los datos obtenidos por la JCA, como referencia acerca del comportamiento de el balneario de Patillas en los últimos tres años (2006 hasta 2009) con el fin de evaluar tendencias y comportamientos de la contaminación bacteriana en este (Figuras 6 a la 15, Tablas 1a la 5).

De los datos reportados por la JCA, durante el año 2006, encontramos que en el punto 1 extremo izquierdo del balneario un valor máximo de 1139 CFU en el mes de enero y un promedio aritmético durante todo el año de 286 CFU con una desviación estándar de 309 (Tabla 6). Utilizando los datos obtenidos de CFU para el 2006 realizamos una división de los datos en clases utilizando la fórmula de Sturges (Keller, 2005). La fórmula de Sturges es una guía para la agrupación de todos los datos u observaciones obtenidos en clases para formar un histograma de frecuencia. En el que se

establece que el número de clases se determina con la fórmula  $1 + 3.3 \log$  (número total de datos). Una vez determinado el número de clases, se agrupan los datos basado en el ancho de clase. El ancho de clase se determina restando el valor máximo menos el valor mínimo y dividiendo por el número total de datos. Una vez determinado el número de clases y el ancho de clases se elabora un análisis de frecuencia agrupando los datos por clase. El resultado fue un total de seis clases con un ancho de clase de 190 y cuyos datos se agruparon resultando en 17 muestras en la primera clase, 4 en la segunda, 6 en la tercera, 1 en la cuarta, 3 en la quinta y 1 en la sexta (Tabla 7). Esta distribución presenta un histograma unimodal de tendencia positiva implicando una mayor población en las primeras clases (Figura 16). Un análisis de frecuencias acumulativas fue realizado con el fin de determinar el porcentaje de muestras que excedieron el 75% del límite de confianza, que es 104 CFU, obteniendo así un total de 53% de las muestras que excedieron el estándar establecido (Figura 17).

De los datos reportados en el 2006 en el punto del caño aguas arribas del puente se obtuvo un valor máximo de 5100 CFU en el mes de junio y un promedio aritmético de 576 CFU con una desviación estándar de 944 datos (Tabla 6). Utilizando los datos de obtenido de CFU para el 2006 se realizó una división de los datos en seis clases con un ancho de clase de 850 y cuyo datos se agruparon resultando en 26 muestras en la primera clase, 3 en la segunda clase, 1 en la tercera clase, 0 en la cuarta, 0 en la quinta clase y 1 en la sexta clase (Tabla 8). Esta distribución presenta un histograma unimodal de tendencia positiva implicando una tendencia en la primera clase (Figura 18). Un análisis de frecuencia acumulativas mostró que 84% de la muestras excedieron el 75% del límite de confianza de 104 CFU (Figura 19).

En cuanto a los datos del punto del balneario frente a los baños se obtuvieron un valor máximo de 600 CFU en el mes de agosto y un promedio aritmético de 325 CFU con una desviación estándar de 321 (Tabla 6). Utilizando los datos obtenidos de CFU para el 2006 se realizó una división de los datos en clases utilizando la fórmula de Sturges (Keller, 2005). El resultado fue un número de seis clases con un ancho de clase de 100 y cuyos datos se agruparon resultando en 23 muestras en la primera clase, 5 en la segunda clase, 2 en la tercera clase, 1 en la cuarta, 1 en la quinta y 1 en la sexta clase para un total de 33 datos (Tabla 9). Esta distribución presentó una distribución unimodal de tendencia positiva implicando un mayor número de datos en la primera clase (Figura 20). Un análisis de frecuencia acumulativa fue realizado obteniendo que un 30% de todas las muestras excedieron el 75% del límite de confianza permitido de 104 CFU (Figura 21).

En términos generales, y agrupando todos los datos obtenidos de todas las zonas de muestreo por la JCA para el año 2006, los datos presentaron un valor máximo de 5100 CFU y éste fue obtenido en el caño aguas arriba del puente como también un promedio aritmético de 317 CFU con una desviación estándar de 588 (Tabla 10). Utilizando los datos obtenidos de todas las zonas muestreadas en el balneario de Patillas realizamos una división de datos en 8 clases con un ancho de 638 y cuyos datos agrupamos resultando en 97 datos en la primera clase, 2 en la segunda clase, 0 en la tercera clase, 0 en la cuarta clase, 0 en la quinta clase, 0 en la sexta clase, 0 en la séptima clase, y de 1 en la octava clase (Tabla 11). Esta distribución presentó ser unimodal de tendencia positiva implicando un mayor número de datos en la primera clase (Figura 22). Un análisis de frecuencias acumulativas fue realizado y obtuvimos que de todas las muestras, el 55% excedían el 75% del límite de confianza de 104 CFU (Figura 23).

De los datos reportados por la JCA durante el año 2007 encontramos que en el punto de muestreo 1, el extremo izquierdo del balneario, un valor máximo de 600 CFU en los meses de junio y agosto, y un promedio aritmético durante todo el año de 266 CFU con una desviación estándar de 219 (Tabla 12). Utilizando los datos obtenidos de CFU para el 2007 se realizó también una división de los datos en clases utilizando la fórmula de Sturges. El resultado fue un número de seis clases con un ancho de clase de 100 y cuyos datos se agruparon resultando en 8 muestras en la primera clase, 6 en la segunda, 1 en la tercera, 1 en la cuarta, 2 en la quinta y 6 en la sexta (Tabla 13). Esta distribución presenta un histograma bimodal indicando la presencia de dos distribuciones (Figura 24). Un análisis de frecuencias acumulativas fue realizado y demostró que el 67% de las muestras excedieron el 75% del límite de confianza de 104 CFU (Figura 25).

De los datos reportados en el 2007 en el punto del caño aguas arriba del puente obtuvimos un valor máximo de 1860 CFU en el mes de agosto y un promedio aritmético de 571 CFU con una desviación estándar de 458 (Tabla 12). Utilizando los datos obtenidos de CFU para el 2007 realizamos una división de los datos en seis clases con un ancho de clase de 310 y cuyos datos se agruparon resultando en 8 datos en la primera clase, 7 en la segunda clase, 7 en la tercera clase, 1 en la cuarta, 0 en la quinta clase y 2 en la sexta clase (Tabla 14). Esta distribución presentó un histograma bimodal indicando la presencia de dos distribuciones (Figura 26). Realizamos un análisis de frecuencia acumulativas y obtuvimos que un total de 84% de las muestras que excedieron el 75% del límite de confianza de 104 CFU (Figura 27).

En cuanto a los datos del punto del balneario frente a los baños obtuvimos un valor máximo de 2030 CFU en el mes de enero y un promedio aritmético de 281 CFU



con una desviación estándar 534 (Tabla 12). Utilizando los datos obtenidos de CFU para el 2007 y realizando una división de los datos en clases utilizando la fórmula de Sturges determinamos un número de seis clases con un ancho de clase de 338 y cuyos datos agrupamos en 21 en la primera clase, 2 en la segunda clase, 0 en la tercera clase, 2 en la quinta y 1 en la sexta clase para un total de 26 datos (Tabla 15). Esta distribución presentó una distribución bimodal indicando la presencia de dos distribuciones (Figura 28). Realizamos un análisis de frecuencia acumulativa y obtuvimos que un 40% de todas las muestras excedieran el límite de confianza de 75% permitido de 104 CFU (Figura 29).

En términos generales, y agrupando todos los datos obtenidos de todas las zonas de muestreo la JCA para el año 2007, obtuvimos un valor máximo de 2030 CFU y éste fue obtenido en el punto frente a los baños y un promedio aritmético de 369 CFU con una desviación estándar de 445 (Tabla 16). Utilizando los datos obtenidos de todas las zonas muestreadas en el balneario de Patillas realizamos una división de datos en clase resultando siete clases con un ancho de clase de 290 y cuyos datos se agruparon resultando en 44 en la primera clase, 10 en la segunda clase, 15 en la tercera clase, 1 en la cuarta clase, 0 en la quinta clase, 3 en la sexta clase y 2 en la séptima clase (Tabla 17). Esta distribución presentó ser una distribución bimodal indicando la presencia de dos distribuciones (Figura 30). Realizamos un análisis de frecuencias acumulativas y obtuvimos que de todas las muestras el 63% de 75 muestras excedieran el límite de confianza de 75% permitido de 104 CFU (Figura 31).

De los datos reportados por la JCA durante el año 2008 encontramos que en el punto de muestreo 1 extremo izquierdo del balneario un valor máximo de 1700 CFU en el mes de febrero y un promedio aritmético durante todo el año de 309 CFU con una

desviación estándar de 445 (Tabla 18). Como hemos señalado anteriormente, utilizando los datos obtenidos de CFU para el 2008, realizamos una división de los datos en clases utilizando la fórmula de Sturges. El resultado fue un número de seis clases con un ancho de clase de 283 y cuyos datos se agruparon resultando en 21 en la primera clase, 4 en la segunda, 1 en la tercera, 1 en la cuarta, 0 en la quinta y 2 en la sexta (Tabla 19). Esta distribución presenta un histograma bimodal indicando la presencia de dos distribuciones (Figura 32). Realizamos un análisis de frecuencias acumulativas con el fin de determinar el porcentaje de muestras que excedieron el estándar permitido de 104 CFU obteniendo que un total de un 55% de las muestras excediera este límite de confianza de 75% establecido (Figura 33).

De los datos reportados en el 2008 en el punto del caño aguas arriba del puente obtuvimos un valor máximo de 2120 CFU en el mes de abril y un promedio aritmético de 475 CFU con una desviación estándar de 516 (Tabla 18). Utilizando los datos obtenidos de CFU para el 2008 realizamos una división de los datos en seis clases con un ancho de clase de 353 y se agruparon en 18 datos en la primera clase, 5 en la segunda clase, 2 en la tercera clase, 1 en la cuarta, 2 en la quinta clase y 1 en la sexta clase (Tabla 20). Esta distribución presenta un histograma bimodal indicando la presencia de dos distribuciones (Figura 34). Realizamos un análisis de frecuencia acumulativas y obtuvimos que un total de 86% de las muestras excedieron el límite de confianza de 75% de 104 CFU (Figura 35).

En cuanto a los datos del punto del balneario frente a los baños obtuvimos un valor máximo de 486 CFU en el mes de enero y un promedio aritmético de 82 CFU con una desviación estándar 119 presentado (Tabla 18). Realizamos una división de los datos en clases donde el resultado fue un número de seis clases con un ancho de 81 y cuyos

datos se agruparon resultando en 24 en la primera clase, 2 en la segunda clase, 4 en la tercera clase, 1 en la cuarta clase, 1 en la quinta y 1 en la sexta clase para un total de 33 datos (Tabla 21). Esta distribución presentó una distribución unimodal indicando la presencia dos distribuciones (Figura 36). Realizamos un análisis de frecuencia acumulativa y obtuvimos que un 27% de todas las muestras excedieron el límite de confianza de 75% permitido de 104 CFU (Figura 37).

En términos generales, y al agrupar todos los datos obtenidos de todas las zonas de muestreo la JCA para el año 2008, los datos presentaron un valor máximo de 2120 CFU y este fue obtenido en el punto del caño agua arriba del puente y un promedio aritmético de 280 CFU con una desviación estándar de 420 (Tabla 22). Utilizando los datos obtenidos de todas las zonas muestreadas en el balneario de Patillas realizamos una división de datos en clase resultando en siete con un ancho de clase de 303 y cuyos datos se agruparon en 70 en la primera clase, 12 en la segunda clase, 2 en la tercera clase, 2 en la cuarta clase, 0 en la quinta clase, 4 en la sexta clase y 1 en la séptima clase (Tabla 23). Esta distribución presentó ser una distribución bimodal indicando la presencia de dos distribuciones (Figura 38). Realizamos un análisis de frecuencias acumulativas fue realizado obteniendo que de todas las muestras el 54% de 91 muestras excedieran el límite de confianza de 75% de 104 CFU (Figura 39).

De los datos reportados por la JCA durante el año 2009 hasta el mes de agosto encontramos que en el punto 1 extremo izquierdo del balneario un valor máximo de 624 CFU en el mes de febrero y un promedio aritmético durante todo el año de 180 CFU con una desviación estándar de 168 (Tabla 24). Utilizando los datos obtenido de CFU para el 2009 realizamos una división de los datos en clases resultando un número de cinco clases

con un ancho de 125 y cuyos datos agrupamos en 10 datos en la primera clase, 6 en la segunda, 2 en la tercera, 3 en la cuarta y 1 en la quinta (Tabla 25). Esta distribución presenta un histograma bimodal indicando la presencia de dos distribuciones (Figura 40). Realizamos un análisis de frecuencias acumulativas para determinar el porcentaje de muestras que excedieron el límite de confianza de 75% de 104 CFU obteniendo un 64 % de las muestras (Figura 41).

De los datos reportados en el 2009 en el punto del caño aguas arriba del puente hasta el mes de agosto obtuvimos un valor máximo de 1256 CFU en el mes de junio y un promedio aritmético de 327 CFU con una desviación estándar de 294 (Tabla 24). Utilizando los datos obtenidos de CFU para el 2009 realizamos una división de datos en cinco clases con un ancho de clase de 251 y se agruparon en 11 datos en la primera clase, 7 en la segunda clase, 2 en la tercera clase, 1 en la cuarta y 1 en la quinta clase (Tabla 26). Esta distribución presenta un histograma unimodal de tendencia positiva indicando la ubicación de los datos en las primeras clases (Figura 42). Realizamos un análisis de frecuencia acumulativas y obtuvimos que un total de 77% de la muestras excedieron el límite de confianza de 75% de 104 CFU (Figura 43).

En cuanto a los datos del punto del balneario frente a los baños obtuvimos un valor máximo de 372 CFU en el mes de enero y un promedio aritmético de 69 CFU con una desviación estándar 93 (Tabla 24). Utilizando los datos obtenidos de CFU para el 2009 realizamos una división en clases resultando un número de cinco clases con un ancho de 74 y cuyos datos agrupamos en 17 en la primera clase, 6 en la segunda clase, 1 en la tercera clase, 1 en la cuarta y 1 en la quinta para un total de 23 datos (Tabla 27). Esta distribución presentó una distribución unimodal indicando la presencia de tendencia

positiva (Figura 44). Realizamos un análisis de frecuencia acumulativa y obtuvimos que 39% de todas las muestras excedieron el límite de confianza de 75% de 104 CFU (Figura 45).

En términos generales, y agrupando todos los datos obtenidos de todas las zonas de muestreo la JCA para el año 2009, los datos presentaron un valor máximo de 1256 CFU y este fue obtenido en el punto del caño agua arriba del puente en el mes de junio y un promedio aritmético de 190 CFU con una desviación estándar de 225 (Tabla 28). Utilizando los datos obtenidos de todas las zonas muestreadas en el balneario de Patillas realizamos una división de datos en clase resultando en siete con un ancho de 358 y cuyos datos agrupamos resultando en 41 datos en la primera clase, 16 en la segunda clase, 5 en la tercera clase, 3 en la cuarta clase, 1 en la quinta clase, 0 en la sexta clase y de 1 en la séptima clase (Tabla 29). Esta distribución presentó ser una distribución unimodal de tendencia positiva indicando una agrupación de los datos en las primeras clases (Figura 46). Realizamos un análisis de frecuencias acumulativas y obtuvimos que de todas las muestras el 55% de 67 muestras excedieron el límite de confianza del 75% de 104 CFU (Figura 47).

El comportamiento a través de los años fue analizado en términos de promedio, valor máximo, valor máximo y desviación estándar. Además, se determinó si existe o no alguna correlación entre las tres áreas muestreadas por la JCA.

Una evaluación de los promedios de CFU en cada año demostró que durante todos éstos el promedio aritmético mayor de CFU fue obtenido en el caño aguas arriba del puente con valores de 576 CFU en el 2006, 561 CFU en el 2007, 475 CFU en el 2008 y 328 CFU en el 2009 (Tabla 30, Figura 48). En el caso de las muestras del extremo

izquierdo del balneario obtuvimos promedios aritméticos de 286 CFU en el 2006, 266 CFU en el 2007, 309 CFU en el 2008 y de 180 CFU en el 2009. En las muestras obtenidas frente a los baños obtuvimos valores de 102 CFU en el 2006, 282 CFU en el 2007, 82 CFU en el 2008 y de 69 CFU en el 2009 presentado (Tabla 30, Figura 48). Una evaluación de la correlación de los promedios aritméticos de CFU de cada zona de cada año demostró una correlación negativa fuerte en todos los años con valores de coeficiente de correlación de  $-0.99$  en el 2006,  $-0.84$  en el 2007,  $-0.99$  en el 2008 y de  $-0.99$  en el 2009 (Tabla 31). Esto demostró una tendencia fuerte de disminución de CFU desde el punto de muestreo en el caño aguas arriba del puente hasta el frente de los baños cuando comparamos los valores de las tres zonas de muestreo de la JCA en un año. Por otra parte, cuando comparamos los valores de CFU promedios de la misma zona de muestreo en los diferentes años obtuvimos valores de coeficientes de correlación de  $-0.94$  para la zona del caño aguas arriba del puente, de  $-0.63$  para la zona del extremo izquierdo del balneario y de  $-0.40$  para la zona del balneario frente a los baños (Tabla 32). Esto representa una tendencia de correlación negativa fuerte para la zona del caño aguas arriba del puente y una correlación de tendencia negativa para las zonas del extremo izquierdo y frente a los baños.

Una evaluación de los valores máximos de CFU en cada año demostró que los valores máximos en el periodo de 2006-2009 ocurrieron en el caño aguas arriba del puente con valores de 5100 en el 2006, 2120 en el 2008 y de 1256 en el 2009 con excepción del año 2007 donde el valor máximo se presentó en el área frente a los baños con un valor de CFU de 2030 (Figura 49, Tabla 30). En el caso de las muestras del extremo izquierdo del balneario obtuvimos valores máximos de 1139 CFU en el 2006,

600 CFU en el 2007, 1700 CFU en el 2008 y de 624 CFU en el 2009 (Figura 49, Tabla 30). En las muestras obtenidas frente a los baños obtuvimos valores máximos de 600 CFU en el 2006, 2030 CFU en el 2007, 486 CFU en el 2008 y de 372 CFU en el 2009 (Figura 49, Tabla 30). Una evaluación de la correlación de los valores máximos de CFU entre las zona por cada año demostró una correlación negativa fuerte en todos los años con excepción del 2007 con valores de coeficiente de correlación de -0.92 en el 2006, -0.96 en el 2008, -0.97 en el 2009 y de 0.1 en el 2007 (Tabla 31). Esto demostró una tendencia fuerte de disminución de CFU cuando comparamos los valores de las tres zonas de muestreo de la JCA en cada año con la excepción del 2007. Por otra parte, cuando comparamos los valores máximos de la misma zona de muestreo en los diferentes años obtuvimos valores de coeficientes de correlación de -0.85 para la zona del caño aguas arriba del puente, de -0.1 para la zona del extremo izquierdo del balneario y de -0.40 para la zona del balneario frente a los baños (Tabla 32). Esto representa una tendencia de correlación negativa fuerte para la zona del caño aguas arriba del puente y una correlación de tendencia negativa para las zonas del extremo izquierdo y frente a los baños.

Una evaluación de los valores mínimos de CFU en cada año demostró que entre el 2006 hasta el 2009 en la zona frente a los baños obtuvo valores de 1 CFU en todos los años (Figura 50, Tabla 30). En el caso de las muestras en el caño aguas arriba del puente se obtuvieron valores mínimos de 1 CFU en el 2006, 20 CFU en el 2007, 30 CFU en el 2008 y de 36 CFU en el 2009 (Figura 50, Tabla 30). En las muestras obtenidas en el extremo izquierdo del balneario obtuvimos valores de 1 CFU en el 2006, 21 CFU en el 2007, 8 CFU en el 2008 y de 4 CFU en el 2009 (Figura 50, Tabla 30). Una evaluación de

la correlación de los valores mínimos de CFU entre las zona por cada año demostró una correlación negativa fuerte en todos los años con excepción del 2006 con un valor de 0 a diferencia de -0.84 en el 2007, -0.96 en el 2008 y -0.90 en el 2009 (Tabla 31). Esto demostró una tendencia fuerte de disminución de CFU cuando comparamos los valores de las tres zonas diferentes de muestreo de la JCA por cada año con la excepción del 2007. Por otra parte, cuando comparamos los valores mínimos de la misma zona de muestreo en los diferentes años obtuvimos valores de coeficientes de correlación de 0.97 para la zona del caño aguas arriba del puente, de -0.1 para la zona del extremo izquierdo del balneario y de 0.0 para la zona del balneario frente a los baños (Tabla 32). Esto representa una tendencia de correlación positiva fuerte para la zona del caño aguas arriba del puente y una correlación de tendencia negativa para las zonas del extremo izquierdo y ninguna tendencia para la zona frente a los baños.

Una evaluación de la desviación estándar de CFU en cada año demostró que los valores mayores ocurrieron en la zona del caño aguas arriba del puente con 944 para el 2006, 516 para el 2008, 294 para el 2009, con la excepción que para el año 2007 el valor mayor de desviación estándar ocurrió en la zona frente a los baños con 534 (Figura 51, Tabla 30). En las muestras obtenidas en el extremo izquierdo del balneario se obtuvieron valores de 309 en el 2006, 219 en el 2007, 445 en el 2008 y de 168 en el 2009 (Figura 51, Tabla 30). En las muestras obtenidas frente a los baños se obtuvieron valores de desviación estándar de 141 en el 2006, 534 en el 2007, 119 en el 2008 y de 93 en el 2009 (Figura 51, Tabla 30). Una evaluación de la correlación de los valores obtenidos de las desviaciones estándar de CFU entre las zona de cada año demostró una correlación negativa en todos los años con excepción del 2007 con valores de coeficiente de



correlación de -0.95 en el 2006, -0.94 en el 2008, -0.99 en el 2009 y de 0.2 en el 2007 (Tabla 31). Esto demostró una tendencia fuerte de disminución de desviación estándar o variabilidad cuando comparamos los valores de las tres zonas de muestreo de la JCA por cada año con la excepción del 2007. Por otra parte, cuando comparamos los valores de desviaciones estándar de la misma zona de muestreo en los diferentes años obtuvimos valores de coeficientes de correlación de  $-0.882$  para la zona del caño aguas arriba del puente, de  $-0.2$  para la zona del extremo izquierdo del balneario y de  $-0.3$  para la zona del balneario frente a los baños (Tabla 32). Esto representa una tendencia de correlación negativa fuerte para la zona del caño aguas arriba del puente implicando una disminución en variabilidad a través de los años y una correlación de tendencia negativa para las zonas del extremo izquierdo y para la zona frente a los baños.

Una evaluación de la media de CFU en cada año demostró que los valores mayores ocurrieron en la zona en el caño aguas arriba del puente con 246 para el 2006, 600 para el 2007, 264 para el 2008 y de 262 para el 2009 (Figura 52, Tabla 30). En las muestras obtenidas en el extremo izquierdo del balneario obtuvimos valores de media 155 en el 2006, 173 en el 2007, 116 en el 2008 y de 142 en el 2009 (Figura 52, Tabla 30). En las muestras obtenidas frente a los baños se obtuvieron valores de la media de 37 en el 2006, 54 en el 2007, 24 en el 2008 y de 24 en el 2009 (Figura 52, Tabla 30). Una evaluación de la correlación de los valores obtenidos de la medias de CFU entre las zona de un mismo año demostró una correlación negativa con valores de coeficiente de correlación de -0.99 en el 2006, -0.95 en el 2007, -0.99 en el 2008 y de  $-0.99$  en el 2009 (Tabla 31). Esto demostró una tendencia fuerte de disminución de la media cuando comparamos los valores de las tres zonas de muestreo de la JCA cada año. Por otra parte,

cuando comparamos los valores de la media de la misma zona de muestreo en los diferentes años obtuvimos valores de coeficientes de correlación de  $-0.22$  para la zona del caño aguas arriba del puente, de  $-0.5$  para la zona del extremo izquierdo del balneario y de  $-0.6$  para la zona del balneario frente a los baños (Tabla 32). Esto representa una tendencia de correlación negativa para las zonas del caño aguas arriba del puente, del extremo izquierdo y la zona frente a los baños implicando una disminución del valor de media a través de los años.

En términos totales, se ha identificado una disminución general de los valores de CFU a través de los años. Además, se ha establecido un comportamiento lineal o relación entre los puntos de muestreo del balneario parecido a un efecto de degradación a través de zonas. Con este dato se podría evaluar la posibilidad de establecer un modelo predictivo para la evaluación del balneario basado en estudios específicos donde se relacionen valores de CFU en el extremo izquierdo con el frente del balneario. En adición a esta evaluación estadística para los datos obtenidos de los muestreos de la JCA en el balneario de Patillas realizamos un análisis de comparación de los resultados del promedio geométrico de CFU en el punto de muestreo frente a los baños (Figura 2). En este análisis determinamos parámetros estadísticos de promedio, valores máximos, valores mínimos y desviación estándar. Además, se determinó el comportamiento del balneario de Patillas en términos del porciento de veces al mes y año (2006-2009) que el promedio geométrico excedió el límite de 35 CFU (Tabla 33). Basado en este análisis se obtuvo que para el año 2006 el promedio aritmético fuera de 55 CFU. También se obtuvieron valores máximos de 148 CFU, mínimos de 1 CFU y una desviación estándar de 43 (Figura 53). Por otra parte, para el 2007 se obtuvo un promedio aritmético de 75

CFU. También se obtuvieron valores máximos de 153 CFU, mínimos de 11 CFU y una desviación estándar de 75 (Figura 54). Para el 2008 se obtuvo un promedio aritmético de 38 CFU, valores máximos de 138 CFU, mínimos de 3 CFU y una desviación estándar de 39 (Figura 55). Por último, en el 2009 se obtuvo un promedio aritmético de 29 CFU, valores máximos de 88 CFU, mínimos de 11 CFU y una desviación estándar de 27 (Figura 56).

Para evaluar el comportamiento del balneario a través de los años en términos de cumplimiento con el estándar del promedio geométrico de 35 CFU (Figura 57) se identificó el número de veces que el promedio geométrico excedió el estándar establecido en cada año. Realizamos una evaluación del periodo 2006-2009 y obtuvimos que en el año 2006 un total de 7 ocasiones de 12 el balneario no cumplió con los estándares establecidos representando esto un 58% (Figura 58). En el 2007 un total de 6 ocasiones de 9 el balneario no cumplió con los estándares establecidos representando esto un 67% (Figura 58). En el 2008 un total de 4 ocasiones de 11 el balneario no cumplió con los estándares establecidos representando esto un 36% (Figura 58). En el 2009 un total de 2 ocasiones de 8 hasta el mes de agosto el balneario no cumplió con los estándares establecidos representando esto un 25% (Figura 58). Además, se determinó en cuantas ocasiones los meses incumplieron con el estándar del promedio geométrico en el periodo 2006-2009 (Figura 59). Para los meses de enero, febrero, abril, mayo, junio y julio se obtuvo que un 50% sobrepasaran el límite del promedio geométrico de 35 CFU en el periodo de estos cuatro años. El mes de agosto reflejó que más de un 70% sobrepasan los límites. Por el contrario, en el mes de marzo los valores del promedio geométrico fueron casi 0% reflejando así estar muy por debajo del estándar de 35 CFU. Los últimos cuatro

meses del año presentaron que un 25% de las ocasiones bajo el estándar de promedio geométrico de 35 CFU.

### **Parámetros físicos y cuantificación de Enterococos en el balneario de Patillas.**

Como parte del primer objetivo de esta investigación, se recolectaron datos en tres fechas de muestreo diferentes de 19 puntos diferentes para un total de 57 observaciones. En cada una de estas fechas y puntos se recopiló información que incluía la hora, CFU, distancia a la orilla temperatura del agua, temperatura del aire, cantidad de lluvia, velocidad del viento, densidad de bañistas en el agua y en la playa, embarcaciones, animales, pH, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto y salinidad.

Se analizaron las variables consideradas en este estudio a base del promedio y desviación típica. Además, se calculó la puntuación mínima y máxima obtenida para cada variable (Tabla 34). En términos de CFU, este fluctuó entre 1 y 17 CFU, siendo el promedio determinado 2.49 CFU. La distancia a la orilla fluctuó desde un mínimo de 0 pies hasta un máximo de 194 pies, con un promedio de 50.81 pies. La temperatura del agua fluctuó de un mínimo de 28.40°C hasta un máximo de 32.00°C, obteniéndose un promedio de 29.70°C. En cuanto a la temperatura del aire, esta fluctuó desde un mínimo de 24.80°C hasta un máximo de 26.50°C, siendo la temperatura promedio de 25.90°C (NOAA). Se encontró que la medición de la cantidad de lluvia fluctuó desde un mínimo de 1.50 mm hasta un máximo de 94.50 mm, obteniéndose un promedio de 32.77mm (NOAA). La velocidad del viento fluctuó entre 2.50 km/hr hasta 4.00km/hr (NOAA). En términos de la densidad de bañistas, en la playa fluctuó entre un mínimo de 17 hasta un máximo de 77, con un promedio de 45. En cuanto a embarcaciones, el mínimo

determinado fue de 3, el máximo de 9, obteniéndose un promedio de 5.67. En cuanto a animales el mínimo calculado fue de 2, el máximo fue de 5, determinándose un promedio de 4. En términos de los valores determinados para pH, se observó un valor mínimo de 7.37, un valor máximo de 8.23, donde se determinó un promedio de 7.89. En cuanto a la turbidez, se obtuvo un valor mínimo de 0.00 NTU, un valor máximo de 10.00 NTU y un promedio de 9.77 NTU. Los valores determinados para la conductividad fluctuaron desde un mínimo de 27.30 mS/cm hasta un máximo de 54.70 mS/cm con un promedio de 48.04 mS/cm. Los valores determinados para oxígeno disuelto fluctuó entre un mínimo de 1.44 mg/l hasta un máximo de 8.64 mg/l, con un promedio de 4.17mg/l. Finalmente, se encontró que los valores determinados para salinidad fluctuaron entre 2.10% hasta 3.61%, determinándose un promedio de 3.10%.

Luego de obtener estos datos de los parámetros físicos, determinamos el coeficiente de correlación entre las variables de pH, turbidez, conductividad, oxígeno disuelto y salinidad con las variables independientes hora, distancia a la orilla, temperatura del agua y del aire, lluvias, velocidad del viento, densidad de bañistas en el agua y en la playa, el número de embarcaciones y animales (Tabla 35).

Se observó que el pH estaba significativamente relacionado con la hora, la temperatura del aire, la lluvia, el número de embarcaciones, animales, conductividad y salinidad (Tabla 35). Además, se observó que la relación del pH y la hora eran positivas y directas, encontrándose mayor pH en horas mas tardes de la recolección de datos. La relación entre el pH y temperatura del aire resultó también ser directa, donde se encontró mayor pH según aumentaba la temperatura del aire. La relación entre pH y embarcaciones también resultó ser positiva y directa, donde a mayor número de

embarcaciones mayor el valor de pH. También la relación entre la conductividad y pH fue positiva, demostrándose que según aumentaba el valor de conductividad aumentaba el nivel del pH. La relación entre nivel de oxígeno disuelto y pH fue también positiva y directa, donde a mayor nivel de oxígeno disuelto, mayor el nivel de pH. También se encontró relación directa y positiva entre los niveles de salinidad y pH, donde según aumentaba el nivel de salinidad, aumentaba el nivel de pH. Si embargo se encontró que la relación entre nivel de lluvias y pH era negativa inversa, indicativo de que según aumentaba el nivel de las lluvias, disminuía el valor de pH. Igualmente se encontró que la relación entre animales y pH era negativa, donde según aumentaba el número de animales se reducía el nivel de pH.

Al considerar las relaciones entre turbidez y las otras variables de estudio, se encontró que la turbidez se relacionaba significativamente con la velocidad del viento, densidad de bañistas en el agua y número de animales (Tabla 35). Todas estas relaciones eran positivas y directas, donde a mayor velocidad del viento, mayor densidad de bañistas en el agua, número de animales y turbidez.

En términos de conductividad, los resultados obtenidos demuestran una relación estadísticamente significativa positiva de este parámetro con la temperatura del aire, densidad de bañistas en la playa, número de embarcaciones, oxígeno disuelto y salinidad (Tabla 35). En este caso, según aumentaba la temperatura del aire, la densidad de bañistas en la playa, el número de embarcaciones, oxígeno disuelto y salinidad, aumentaba el nivel de conductividad. Sin embargo, la relación entre el nivel de conductividad y lluvia fue negativa encontrándose menor nivel de conductividad cuando aumentaba el nivel de lluvias (NOAA).

Se encontró una relación significativa directa entre los niveles de oxígeno disuelto y la temperatura del aire, número de embarcaciones y salinidad (Tabla 35). En este caso, existían mayores niveles de oxígeno disuelto en las situaciones donde la temperatura del aire era más alta, así como en las ocasiones donde había mayor número de embarcaciones y el nivel de salinidad era más alto. Sin embargo, se encontró una relación negativa (inversa) entre los niveles de oxígeno disuelto y la cantidad de lluvias y el número de animales. En este caso, los niveles de oxígeno disuelto eran menores cuando aumentaba la cantidad de lluvias y el número de animales.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de correlación con el fin de determinar las relaciones existentes entre los niveles de salinidad y las variables de estudio (Tabla 35). Hubo relación significativa directa entre los niveles de salinidad y la temperatura del aire, densidad de bañistas en la playa y número de embarcaciones. Estas relaciones indican que los niveles de salinidad eran más altos cuando la temperatura del aire era más alta, así también cuando la densidad de bañistas en la playa era más alta. También se observó mayor nivel de salinidad cuando había mayor número de embarcaciones. Sin embargo, se encontró una relación negativa entre el nivel de salinidad y cantidad de lluvias, donde a mayor cantidad de lluvias, menor era el nivel de salinidad.

Por otra parte se llevó a cabo un análisis de los valores de CFU obtenidos para la evaluación del comportamiento del balneario de Patillas utilizando los resultados y elaborando una división en clases para la determinación de frecuencias y frecuencias acumulativas. Además, se elaboró un análisis para determinar como fue el comportamiento de cada punto de muestreo durante los tres muestreos como también las tendencias de las zonas y los transeptos.

Colectamos un total de 57 muestras divididas en 19 muestras por cada día del muestreo durante las fechas del 12 de octubre, 19 de octubre y 25 de octubre de 2008 (Tabla 36). Durante el muestreo realizado el 12 de octubre de 2008 se colectaron un total de 19 muestras y dentro de las cuales se obtuvo un valor máximo de 6 CFU en el punto de muestreo 19, un valor mínimo de 1 CFU y un promedio geométrico de 2 CFU. Esto significa que ninguna de las muestras sobrepaso el límite de 35 CFU establecido por la EPA ni del límite de confianza 75% que es 104 CFU. Además, todos los resultados se dividieron en clases utilizando la fórmula de Sturges resultando en un número de seis clases con un ancho de clase de 1. Utilizando estos resultados se elaboró un histograma para la distribución de frecuencias obteniendo que para esta fecha se agruparan los datos de 12 en la primera clase, 1 en la segunda clase, 4 e la tercera clase, 0 en la cuarta clase, 1 en la quinta clase y 1 en la sexta clase (Tabla 37). Esta distribución representa un histograma bimodal conteniendo dos distribuciones (Figura 60). En cuanto a la distribución de frecuencias acumulativas se presentó que la primera clase contiene un 63% de todos los datos (Figura 61).

Durante el muestreo realizado el 19 de octubre de 2008 se colectaron un total de 19 muestras y dentro de las cuales se obtuvo un valor máximo de 17 CFU en el punto de muestreo 8 y un valor mínimo de 1 CFU, lo que significa que ninguna de las muestras sobrepaso el límite de 104 CFU establecido por la EPA. Además, todos los resultados se dividieron en clases resultando en un número de seis clases con un ancho de clase de 3. Utilizando estos resultados se elaboró un histograma para la distribución de frecuencias obteniendo que para esta fecha se agruparon los datos de la siguiente forma 15 datos en la primera clase, 2 en la segunda clase, 1 en la tercera clase, 0 en la cuarta clase, 0 en la



quinta clase y 1 en la sexta (Tabla 38). Esta distribución representa un histograma unimodal de tendencia positiva conteniendo la mayor distribución en la primera clase (Figura 62). En cuanto a la distribución de frecuencias acumulativas se presentó que la primera clase contiene un 79% de todos los datos obtenidos (Figura 63).

Durante el muestreo obtenido el 25 de octubre de 2008 se colectaron un total de 19 muestras y dentro de las cuales se obtuvo un valor máximo de 7 CFU en el punto de muestreo 16 y un valor mínimo de 1 CFU, lo que significa que ninguna de las muestras sobrepaso el límite de 104 CFU establecido por la EPA. Además, todos los resultados se dividieron en clases resultando en un número de cuatro clases con un ancho de clase de 2. Utilizando estos resultados se elaboró un histograma para la distribución de frecuencias obteniendo que para esta fecha se agruparon los datos de la siguiente forma 11 datos en la primera clase, 2 en la segunda clase, 5 en la tercera clase, 1 en la cuarta clase (Tabla 39). Esta distribución representa un histograma bimodal lo cual indica la presencia de dos distribuciones (Figura 64). En cuanto a la distribución de frecuencias acumulativas se presentó que la primera clase contiene un 58% de todos los datos obtenidos (Figura 65).

Además de este análisis de distribución de frecuencias llevamos a cabo una evaluación del comportamiento del mismo punto de muestreo diferentes días como también las tendencias de los datos a través de las zonas y los transeptos. En cuanto a la evaluación de los datos obtenidos del mismo punto en los diferentes días realizamos un análisis del promedio de CFU del mismo punto en los tres días de muestreo diferentes obteniendo un valor mínimo de 1 CFU para los puntos de muestreo 3, 5, 6, 9, 11 y 17, y un valor máximo de 6 CFU para el punto de muestreo 8 (Tabla 36 y Figura 66). En cuanto a las desviaciones estándar de estos datos de promedio del mismo punto en

diferentes días, encontramos una variación o desviación estándar de 0.0 hasta 9.2, representando poca variabilidad entre los datos del mismo punto en los diferentes días.

La evaluación de los transectos de todos los días de muestreo para determinar la tendencia de CFU (Tabla 40 y Figuras 67-73) con respecto a la distancia a la orilla encontramos que para el 12 de octubre de 2008 en el transecto 1 la correlación fue de cero mientras que en el 19 de octubre de 2008 se obtuvo una correlación negativa de  $-0.87$  y para el 25 de octubre de  $-0.24$ , con un promedio general de coeficiente de correlación de  $-0.37$  lo cual significa una correlación negativa mediana. En el transecto 2 encontramos que para el 12 de octubre obtuvimos un valor de cero mientras que en el 19 de octubre y 25 de octubre fue de  $-0.86$  con un promedio general de coeficiente de correlación de  $-0.58$  lo cual significa una tendencia negativa fuerte. Para el transecto 3 se obtuvieron valores de coeficiente de correlación de  $-0.87$  para el 12 de octubre, de  $-0.56$  para el 19 de octubre y de  $-0.87$  para el 25 de octubre con un promedio general de  $-0.60$  implicando una tendencia negativa fuerte. En el transecto 4 se obtuvieron valores de  $-0.87$  12 de octubre, de  $0.92$  para el 19 de octubre y de  $-0.5$  para el 25 de octubre con un promedio general  $-0.2$  lo cual significa una tendencia negativa débil. Para el transecto 5 se obtuvieron valores de  $-0.86$  el 12 de octubre y de cero el 19 y 25 de octubre y un promedio general de  $-0.29$  lo que significa una tendencia negativa débil. Para el transecto numero 6 se obtuvieron valores de cero el 12 y 19 de octubre y de  $-0.65$  para el 25 de octubre con un promedio general de  $-0.22$  lo que significa una tendencia negativa débil. En términos generales, el comportamiento de todos los transectos fue similar en los coeficientes de correlación de CFU. En cuanto a distancia de la orilla, todos presentaron una tendencia negativa de CFU a medida que a medida que aumenta la profundidad, y

específicamente en los transeptos 22 y el transepto 3, es donde se reflejó la tendencia negativa mas fuerte (Tabla 41).

Por otra parte evaluamos el comportamiento de las zonas los diferentes días con el fin de determinar alguna relación de CFU en una misma profundidad a lo largo del balneario (Tabla 42 y Figuras 74-77). Para la Zona 1 (profundidad de tobillo) encontramos que para el 12 de octubre obtuvimos un coeficiente de correlación de 0.74, para el 19 de octubre de  $-0.62$  y para el 25 de octubre de 0.27 y con un promedio general de coeficiente de correlación de 0.13. Para la Zona 2 (profundidad de rodilla) se obtuvieron valores de coeficiente de correlación el 12 de octubre de  $-0.65$ , para 19 de octubre de  $-0.12$  y para el 25 de octubre de  $-0.21$  y un promedio general de coeficiente de correlación de  $-0.32$ . Para la Zona 3 (profundidad de pecho) se obtuvieron valores de coeficiente de correlación para el 12 de octubre de 0.65, para el 19 de octubre de 0.24 y para el 25 de octubre de 0.62 y un promedio general de coeficiente de correlación de 0.51 (Tabla 43). En términos generales, el comportamiento de las zonas en términos de CFU fue similar entre las Zona 1 y Zona 3 en donde se obtuvieron tendencias positivas débiles a diferencia de la Zona 2 en donde la tendencia de CFU en la misma profundidad a lo largo del balneario desde el extremo izquierdo al derecho fue negativa moderada.

#### **Identificación de material genético de Enterococos de las muestras del balneario de Patillas.**

Durante el proceso de este análisis de identificación y debido a problemas con la metodología recomendada se utilizaron varios métodos desarrollados por Qiagen, del Departamento de Protección Ambiental de la Universidad del Sur de la Florida y de Marie Rosa Molina (EPA), con el fin de determinar la causa del problema.

Para comenzar, se elaboró la metodología recomendada y al finalizar el proceso de purificación las muestras se colocaron en la gel de agarosa al 1% sin obtener ninguna banda para cada una de las muestra, aunque obtuvimos las bandas específicas para el DNA ladder y los DNA lambda. Debido a este hallazgo no se elaboró el método de amplificación con PCR para este caso en particular ya que esto representaba un problema con la extracción del DNA de las bacterias en todas las muestras. Para verificar los factores que pudieran estar afectando estos resultados, decidimos analizar los pasos en la metodología e identificamos que el material genético pudiera haberse perdido en algunas de las fases de extracciones o en el proceso de purificación. Basado en ésto se colectaron dos muestras de los sobrenadante después de cada fase de centrifugación como también muestras de la columna “spin” luego de la fase de “loading” y de los lavados. Además, durante el proceso de elusión el producto obtenido se volvió a cargar a la columna “spin” con el fin de aumentar la concentración del material genético (estas subsecuentes elusiones aumentan la concentración del material genético). Una vez colectadas todas las muestras se prepararon para correrlas en la gel de agarosa al 1%. Se obtuvieron los mismos resultados anteriores donde no se observó bandas asociadas a las muestras aunque nuevamente se pudo detectar bandas del DNA ladder y al DNA lambda.

Una vez confirmado que el problema no era la pérdida del material genético sino otro factor incorporamos a la metodología la recomendación del área técnica de QIAGEN. Esta recomendación incluía identificar la concentración inicial de colonias. Para este fin utilizamos el protocolo de QIAGEN QIAMP DNA Easy Blood and Tissue Handbook en el cual se establece el máximo de colonias permitidas de  $2 \times 10^9$ . Es importante señalar que una mayor concentración inicial de colonias podría afectar el

comportamiento lineal entre número de colonias y la cantidad de DNA. En adición, en este protocolo se establece la utilización de una solución amortiguadora de lisis para las bacterias Gram positivo debido a que su pared celular de peptidoglicano es más gruesa. Además, se utilizó un tratamiento previo de incubación a 37°C por un periodo de 30 minutos con el fin de aumentar la exposición de las bacterias a la lisozima. Para comenzar este segundo análisis se cultivaron bacterias de *Enterococcus faecium* en mEi agar para garantizar su viabilidad y se prepararon diferentes diluciones desde  $1 \times 10^{-2}$  hasta  $1 \times 10^9$ . A esto se le añadió el cultivo de *Escherichia coli* en las mismas concentraciones. Una vez preparadas todas las soluciones se elaboró el proceso de extracción y purificación de las muestras pero durante el proceso de identificación de las bandas en la agarosa no se obtuvieron resultados para las muestras pero sí las bandas para el DNA ladder y el DNA lambda.

Después de intentar las variaciones en el protocolo antes descritas se contactó al Departamento de Protección Ambiental de la Universidad de Florida de donde se obtuvo la referencia inicial para la extracción y purificación del material genético. Este Departamento nos facilitó el protocolo completo que utilizaban en su laboratorio con el fin de extraer y purificar bacterias Gram positivo. Este protocolo es similar al utilizado inicialmente en esta investigación con unos cambios mínimos entre los cuales encontramos el aumento de volumen de azuro de dextrosa (de 5 ml a 2 ml) que podría aumentar la eficiencia del lavado de las bacterias y cambios en las revoluciones por minutos utilizadas en el proceso de centrifugación que aumentaría la eficiencia en la separación durante el proceso. El método se realizó nuevamente con estos cambios y

obtuvimos los mismos resultados para las muestras (no se observó bandas) pero sí se observaron bandas en el DNA ladder y DNA lambda.

Las recomendaciones y/o cambios sugeridos para evitar la pérdida de material, modificar el factor de concentración inicial, utilización de diferentes bacterias, mejorar los lavados y eficiencia en la separación no fueron suficientes para poder extraer el material genético de las muestras. Debido a estos problemas encontrados durante el proceso de extracción y purificación del material genético no se pudo identificar si la procedencia de la contaminación era o no de origen humano. A pesar de esta situación, y como un método alternativo, se decidió elaborar un análisis geográfico e hidrológico de área para proveer una decisión acerca de cual sería la posible fuente de contaminación.

Para la identificación de fuentes de contaminación en un cuerpo de agua es importante especificar que existen actualmente varios factores como por ejemplo productos de heces fecales. Los productos de contaminantes por heces fecales, según sea su procedencia, se pueden clasificar como fuentes de contaminación puntual y no puntual. La contaminación por fuente puntual es aquella que puede ser identificada en un punto en particular como por ejemplo tuberías de drenajes que descargan a un cuerpo de agua directamente. En cambio, una contaminación por fuente no puntual es aquella en la que los contaminantes alcanzan los cuerpos de agua debido a factores ambientales como por ejemplo escorrentías de lluvias. Esta forma de contaminación es mucho más difícil de controlar y es la fuente de contaminación de los cuerpos de agua que más predomina debido a la impermeabilidad de los terrenos por el desarrollo de áreas urbanas entre otras situaciones. De las fuentes de contaminación no puntuales encontramos escorrentías de campos agrícolas que acarrearán estiércol, escorrentías provenientes de sistemas de

tratamientos de agua urbanos en males estado o defectuosos y escorrentías de pozos sépticos en mal estado o de mal funcionamiento (USEPA, 2005b).

En el caso particular del balneario de Patillas se realizó una evaluación geográfica hidrológica con el fin de identificar alguno de estos factores. Entre los datos encontrados cabe señalar que el municipio de Patillas cuenta con una planta de tratamiento que descarga al Mar Caribe bajo el permiso de Descarga PR0020753, una cantidad de 1 mgal por día, pero ésta no trata las aguas de todo el municipio y solo de un sector urbano. Este municipio cuenta con una población de 20,152 habitantes distribuidos en 21 barrios.

Una evaluación del área de balneario de Patillas fue realizada con el fin de identificar las posibles fuentes de contaminación. Basado en esto, observamos que los puntos de entrada de contaminación al balneario son tuberías de escorrentías de lluvias, embarcaciones y descarga de quebradas. Las fuentes del origen de la contaminación bacteriana pudieran ser de animal o de origen humano. En términos de contaminación de origen animal, al finalizar una evaluación del área no se observó actividad alguna de crianza de animales y que cuyas descargas de escorrentías pudieran llegar a impactar alguna quebrada y así entrar en el área del balneario. Sin embargo, se observó que existe una quebrada cuyo origen comienza en la zona montañosa de la urbanización Lamboglia y desemboca en el Mar Caribe justo en el balneario de Patillas (Figura 78). Una evaluación física de las residencias demostró la presencia de tanques sépticos ya que el servicio de tratamiento de aguas usadas no existe en el área. Tomando en consideración esta información decidimos recopilar otros datos utilizando el único estudio realizado en Puerto Rico acerca de las características de los hogares en el año 1990 por el United Status Geological Survey (USGS) donde se presentaba el uso de agua y disposición de

ésta para tratar (Solley, Pierce & Perlman, 1993), En este estudio se estableció que para el municipio de Patillas solo menos de 5,000 unidades de vivienda estaban conectadas a este servicio público de tratamiento de agua y que un total de 68% de las unidades de vivienda disponían sus aguas en sistemas de tanques sépticos. Además, se presentó que la media de año de construcción de las estructuras de vivienda en el municipio de Patillas fue en el 1972 lo cual pudiera implicar deterioro de los sistemas de tanques sépticos o mal funcionamiento. En términos de infraestructura de los servicios de tratamiento de aguas, ninguna mejora se ha realizado desde entonces indicando que estos tanques sépticos aun continúan en uso. Adicional a este documento, la JCA elaboró un estudio de las costas durante el año 2008 donde se estableció que para el municipio de Patillas la fuente de contaminación más probable es el uso de tanques sépticos en el área y las descargas del sistema de tratamiento existente (JCA, 2008).

Basado en la recopilación de todos estos datos, donde se presenta las características de los hogares en el municipio de Patillas, tiempo de construcción de las unidades de vivienda, la falta de sistemas público de tratamiento de aguas usadas con mayor capacidad y la cercanía de las viviendas existentes al balneario, podríamos hacer deducir que la principal fuente de contaminación bacteriana es de origen humano.

### **Discusión**

Este estudio fue elaborado con el fin de obtener información acerca del balneario de Patillas en términos de contaminación bacteriana utilizando principalmente los datos obtenidos por la JCA en el periodo 2006-2009. Además, se diseñó un protocolo de muestreo para obtener información cuantitativa de la cantidad de bacterias y cualitativas para poder identificar la procedencia de dicha contaminación.



El primer objetivo de estudio fue utilizar un protocolo de muestreo y un método de cuantificación para determinar el número de colonias de Enterococos en 100ml de agua. Como forma suplementaria a este primer objetivo se decidió elaborar un análisis de las condiciones del balneario utilizando los datos obtenidos por la JCA para los años 2006, 2007, 2008 y 2009. Al evaluar los datos obtenidos y comparando el comportamiento de las tres áreas de muestreo por año se obtuvo que todos los parámetros estadísticos analizados presentaron una tendencia negativa fuerte o una tendencia a disminuir los CFU desde el punto de muestreo cao aguas arriba del puente hasta el frente de los baños en el balneario. Este patrón ocurrió en los años 2006, 2008 y 2009, pero no así para el año 2007 en el cual se obtuvieron valores de CFU que sobrepasaron los estándares de la EPA de 104 CFU y también sobrepasaron los valores obtenidos de CFU en las otras áreas de muestreo. Por otra parte, se elaboró un análisis para comparar el comportamiento de la misma área de muestreo de la JCA pero en los diferentes años. Los resultados demostraron que en las áreas del caño aguas arriba del puente y en el extremo izquierdo del balneario mostraron una correlación negativa fuerte implicando que a través de los años la contaminación bacteriana ha ido en descenso casi lineal, pero en el área frente de los baños, aunque demostró una correlación negativa, fue moderada y esto fue debido a que para el 2007 esta área obtuvo valores de hasta 2030 CFU afectando así el promedio aritmético de CFU y comportamiento de descenso lineal esperado como las otras áreas de muestreo

En cuanto al porcentaje de muestras que excedieron el estándar de 104 CFU por año en cada área, la correlación obtenida en todos los años fue una negativa indicando así que el comportamiento del número de muestras que exceden los parámetros han

presentado una tendencia a ser menor desde el caño aguas arriba del puente hasta frente a los baños en el balneario. Esta tendencia nos confirma el comportamiento y la posible fuente o ruta de la contaminación bacteriana a través del balneario estableciendo como origen el caño aguas arriba del puente y degradándose hasta llegar al frente del balneario.

En cuanto al muestreo realizado durante las fechas del 12, 19, y 26 de octubre de 2008, no se encontró ninguna correlación significativa de ninguno de los parámetros de muestreo con los CFU de Enterococos. Esto pudo deberse a que no hubo mucha variabilidad de los parámetros medidos así como los valores de CFU, reflejando que durante este periodo de muestreo las condiciones del balneario presentaron estabilidad y se compararon con los valores obtenidos por la JCA en el mismo periodo de muestreo.

Como parte de los parámetros físicos del muestreo, la temperatura fue determinada y es necesario denotar que todos los microorganismos tienen una temperatura óptima de crecimiento. Esto significa que a determinado aumento de temperatura la velocidad de duplicación (o la velocidad de crecimiento poblacional) de los microorganismos es mayor. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no todos los microorganismos crecen en el mismo rango de temperaturas como por ejemplo los termófilos poseen rango de temperatura de 25–80°C, los mesófilos poseen un rango de temperatura de 10-45°C y los psicrófilos un rango de temperatura de 10-20°C (Todar, 2008). En cuanto al pH, la mayoría de los microorganismos crecen en pH cercanos a la neutralidad, entre 5 y 9, cosa que no excluye que existan microorganismos que puedan soportar pH extremos y se desarrollen. Según el rango de pH del medio en el cual se desarrollan pueden dividirse en acidófilos con pH externo de 1-5 y pH interno de 6.5, neutrófilos con pH externo de 5.5-8.5 y pH interno de 7.5 y alcalófilos con pH interno de

9-10 y pH interno de 9.5. Los microorganismos regulan su pH interno mediante un sistema de transporte de protones que se encuentra en la membrana citoplasmática, que incluye una bomba de protones ATP dependiente. El rango de pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos es estrecho debido a que frente a un pH externo muy desfavorable se requiere un gran consumo de energía para mantener el pH interno (Todar, 2008). En cuanto a la salinidad, el agua es el solvente en donde ocurren las reacciones químicas y enzimáticas de la célula y es indispensable para el desarrollo de los microorganismos. La actividad de agua ( $a_w$ ) del medio representa la fracción molar de las moléculas de agua totales que están disponibles, y es igual a relación que existe entre la presión de vapor de la solución respecto a la del agua pura ( $p/p_0$ ). El valor mínimo de  $a_w$  en el cual las bacterias pueden crecer varía ampliamente, pero el valor óptimo para muchas especies es mayor a 0.99. Algunas bacterias halófilas (bacterias que se desarrollan en altas concentraciones de sal) crecen mejor con  $a_w = 0.80$ . Variaciones en la actividad de agua pueden afectar la tasa de crecimiento, la composición celular y la actividad metabólica de la bacteria, debido a que si no disponen de suficiente cantidad de agua libre (no asociada a solutos, etc.) en el medio necesitarán realizar más trabajo para obtenerla y disminuirá el rendimiento del crecimiento (Todar, 2008) . Además, no hubo un periodo de precipitación que es un factor relacionado con aumento de los valores de CFU debido al aumento de escorrentías y que fomentara cambios en los valores de pH, conductividad y salinidad.

Por otra parte, con relación a los valores de CFU por cada transecto, este análisis de correlación presentó resultados de disminución de CFU a medida que se aumentaba la profundidad. Estos resultados son significativos en términos de desarrollar un plan de

muestreo. Esto es de gran importancia para las diferentes poblaciones que visitan el balneario y su ubicación dentro del balneario. Dentro de este concepto las poblaciones mas afectadas serian las que utilizan las aguas menos profundas que incluirían niños y personas de edad avanzada a diferencia de adolescentes y adultos cuyas poblaciones tienden a utilizar aguas mas profundas. Por otra parte, en cuanto a las tendencias de CFU en términos de transeptos, el comportamiento reflejó un aumento de CFU desde el extremo derecho del balneario hacia el extremo izquierdo. Esta tendencia confirma el gradiente que presenta este balneario durante los años 2006 al 2009 donde los valores de CFU mayores de los muestreos de la JCA se mostraron en la zona aguas arriba del puente y presentó una disminución hacia el extremo derecho del balneario.

#### **Evaluación de riesgo.**

Esta evaluación de riesgo se llevó a cabo con el fin de evaluar el potencial de riesgo asociado con la exposición de patógenos, específicamente Enterococos, en el agua en el balneario de Patillas. El escenario de exposición fue relativamente el contacto directo de los visitantes en el área del balneario clasificado como área de contacto primario en donde la JCA toma sus muestras del punto de muestreo frente a los baños. A diferencia de la JCA se tomaron en cada muestreo un total de 19 muestras dividido en transeptos y zonas (Figura 3) dependiendo de la profundidad.

Esta evaluación de riesgo se presenta principalmente en la identificación del peligro a los humanos con la exposición a la contaminación bacteriana en el balneario de Patillas. En el primer concepto se identificaron los peligros de la exposición basado en estudios elaborados donde se han establecido las probabilidades de infección o enfermedades y se utilizaron los datos obtenidos de la JCA y de nuestro muestreo para

establecer la relación de concentración bacteriana y número de casos de enfermedades gastrointestinales esperadas.

En cuanto a la identificación del riesgo podemos hacer mención que desde los años 1950, numerosos estudios se han realizado para examinar la asociación entre la calidad de las aguas con fines de recreación y enfermedades (Pruss, 1998). Muchos de estos estudios han reportado un aumento en el riesgo asociado a enfermedades o infecciones debido a la exposición a aguas con fines recreativos. Algunos han relacionado el nivel de contaminación en el agua medido por medio de organismos indicadores con la magnitud de riesgo. A pesar de las investigaciones extensivas acerca de este tema algo de incertidumbre se mantiene acerca de como estos organismos indicadores pueden ser mejor utilizados para la regulación de los cuerpos de aguas con fines recreativos. En el 1986, la EPA publicó los criterios recomendados para los cuerpos de aguas con fines recreativos en el cual propuso el uso Enterococos en cuerpos marinos y el uso de *E. coli* como organismo indicador en los cuerpos de agua de ríos y lagos. Este reporte recomendó los niveles regulatorios basado en el promedio geométrico de un mínimo de cinco muestras en un periodo de 30 días, de 35 CFU de Enterococos para cuerpos de agua marino y de 33 CFU en ríos y lagos, y de 126 CFU para *E. coli* en agua de ríos y lagos (USEPA, 1986, 2004a, 2004b). Los coliformes fecales, que fueron los organismos inicialmente propuestos, no fueron recomendados como indicadores de contaminación fecal en este reporte. Estas nuevas guías de los estándares de organismos indicadores fueron basadas en los estudios de Cabelli (1983) y Dufour (1984), los cuales han sido criticados por diferentes conceptos del estudio (Fleisher, Kay, Salmon, Jones,

Wyer & Godfree, 1996). Por otra parte la organización mundial de salud ha desarrollado unas guías similares con estudios más controlados y recientes (Kay et al., 1994).

Algunos intentos se han desarrollado para resumir y evaluar la literatura existente en una forma sistemática y cuantitativa para establecer una relación mas clara en cuanto a esta relación (Pruss, 1998). Basado en estos estudios se sugiere una relación dosis respuesta entre la contaminación fecal y el riesgo de enfermedades gastrointestinales, pero no específicamente entre organismos indicadores y enfermedades. En adición, existe estudio en el cual se evalúa directamente la relación entre un organismo indicador específico con enfermedades o infecciones surgidas debido a la exposición a este en cuerpos de aguas con fines recreativos y específicamente marino el cual es factor principal en esta investigación.

En este estudio sistemático se cuantificó la relación entre los organismos indicadores y las enfermedades. Además se evaluó el potencial del uso de estas enfermedades gastrointestinales bajo las guías establecidas. Utilizando un total de 976 estudios se identificaron los estudios más relevantes y se obtuvieron resultados que demuestran una tendencia de aumento de todos los organismos indicadores con relación al riesgo relativo pero la tendencia mas fuerte fue demostrada para Enterococos por lo que apoyan la utilización del uso de estas bacterias como indicador de contaminación fecal en aguas marinas (Pruss, 1998).

En el análisis categórico, el riesgo relativo no continuo aumentó con densidades mayores a 104 CFU, indicando un potencial límite para riesgo de enfermedades gastrointestinales. Los resultados de la regresión confirman la asociación entre densidad de Enterococos y el logaritmo natural del riesgo. Este riesgo relativo de enfermedades

gastrointestinales aumentó 1.3 veces por cada aumento de log 10 de la densidad de Enterococos (Pruss, 1998).

Por otra parte, la EPA, desde su publicación de los criterios del 1986, ha evaluado un número de estudios relacionados a organismos indicadores. Esta evaluación se llevó a cabo con el fin de evaluar las guías establecidas del uso de organismos indicadores dependiendo el cuerpo de agua como también la evaluación de estudios epidemiológicos que relacione enfermedades gastrointestinales con la exposición en cuerpos de fines recreativos. La evaluación de estos estudios se llevó a cabo con el fin de determinar la necesidad de modificación de los resultados de la relación establecida por ellos en el 1984 en cuanto al número de colonias de bacterias con el registro de enfermedades gastrointestinales. Durante el periodo de evaluación de estudios encontraron que estos confirmaron y validaron los resultados obtenidos por la EPA por lo que aparenta no existir ninguna razón para modificar los mismos (Dufour, 1999).

Estos nuevos estudios se han añadido como parte de la evidencia para sustentar los criterios de la EPA. La agencia no encontró razón para su cambio (USEPA, 2000b). De estas evaluaciones podrían hacer mención de los hallazgos más sobresalientes de cada investigación, como por ejemplo, en Israel se encontró que de todos los organismos los Enterococos fueron los más predictivos en asociación con enfermedades gastrointestinales en ambientes marinos (Fattal, Peleg-Olevsky, Agursky & Shuval, 1987). Por otra parte, en Hong Kong se determinó que de los organismos indicadores *E. coli* demostró la mayor correlación significativa al combinar las enfermedades gastrointestinales y síntomas en la piel (Cheung, Chang, Hung & Kleevens, 1990). También en otro estudio se demostró que el riesgo de enfermedades aumenta

significativamente con la exposición en ambientes marinos (Balajaran, Soni Raleigh, Yuen, Wheeler, Machin & Cartwright, 1991; Ferley et al., 1989; Francy, Myers & Metzker, 1993). En otro estudio se demostró que la incertidumbre de las fuentes de contaminación fecal puede explicar la falta de relación estadísticamente significativa entre nadadores y no nadadores (Von Shirnding, Kfir, Cabello, Franklin & Joubert, 1992). Los síntomas de enfermedades gastrointestinales no aumentan con el aumento en el conteo de bacterias y que el conteo de coliformes fecales demostró mayor predicción en enfermedades gastrointestinales que *Estreptococos* (Corbett, Rubin, Curry, Kleinbaub & Sydney Beach Users Study Advisory Group, 1993). Al comparar con otros organismos indicadores demostraron que *Estreptococos* fue el mejor indicador de síntomas gastrointestinales (Kay et al., 1994). Otro estudio en Hong Kong no encontró relación estadística entre enfermedades gastrointestinales y el conteo de *E. coli* (Kueh et al., 1995). La asociación de síntomas gastrointestinales con *E. coli* y coliformes fecales fue débil (Haile, 1996). *Enterococos* demostró ser consistentemente asociación con enfermedades gastrointestinales en los grupos expuestos como también encontró diferencia significativa entre los grupos de nadadores y no nadadores si el tiempo en el agua era mayor de 30 minutos minutos (He & Jiang, 2005; McBride et al., 1998; Seyfried, Tobin, Brown & Ness, 1985).

Por otra parte, en Puerto Rico el primer estudio elaborado para determinar la relación entre CFU y síntomas de enfermedades gastrointestinales determinó la existencia de un riesgo significativo de contraer enfermedades respiratorias y síntomas en la piel para las personas expuestas en la playa. Además determinó que el riesgo aún existe a concentraciones bajas de indicadores demostrado por una correlación positiva



significando que aunque esté en cumplimiento el balneario existe un riesgo de contraer enfermedades. Por otra parte, determinó que el organismo indicador con mayor relación a causar enfermedades fueron colifagos y *E. coli* analizados por métodos enzimáticos (Toranzos & Smith, 2007).

Basado en esta investigación se ha demostrado una gran variabilidad en término de la relación entre organismos indicadores y enfermedades gastrointestinales pero aun así han demostrado fuertes correlaciones entre ambos independientemente el organismo indicador. Por esto, gran atención debe presentarse a la contaminación de los balnearios en Puerto Rico específicamente y sobre la base de este estudio al balneario de Patillas en el cual se han presentado altos valores de CFU a través de los años implicando un factor claro de riesgo a la salud humana.

Con el fin de presentar el número de casos de enfermedades gastrointestinales basado en la concentración de bacterias específicamente de Enterococos utilizamos la fórmula del estudio de Carbelli en el cual se establece una relación entre casos de alta credibilidad de enfermedades gastrointestinales por cada 1000 bañistas (USEPA, 2006b). Utilizando esta ecuación basado en los límites establecidos de 35 CFU en un periodo de 30 días obtenemos que la implicación sea de 19 casos por cada 1000 bañistas. Utilizando esta ecuación aplicamos los datos obtenidos de CFU por la JCA durante los años 2006 al año 2009 e incluimos los datos de CFU obtenidos durante nuestro muestreo en el año 2008 en el mes de octubre para obtener datos del número de casos que con alta probabilidad pudieran presentar riesgo a enfermedad gastrointestinal.

Basado en esto y utilizando los datos de la JCA, determinamos el número de casos de enfermedades gastrointestinales en el balneario de Patillas durante los años 2006

al 2009 dividido por mes. Para el año 2006 y basado en la fórmula de Carbelli donde el número de casos de enfermedades gastrointestinales de alta credibilidad esta basado en  $0.1 + 2.3 \log (\text{enterococos} / 100\text{ml})$ . Utilizando esta fórmula y según los promedios geométricos obtenidos un total de 224 casos de alta credibilidad de enfermedades gastrointestinales pudieron presentarse con un máximo de 27 casos en el mes de agosto. Para el año 2007 un total de 193 casos de alta credibilidad de enfermedades gastrointestinales debieron reportarse con un máximo de 27 casos en los meses de abril y junio. En el año 2008 un total de 185 casos debieron presentarse de enfermedades gastrointestinales con un valor máximo de 26 casos en el mes de agosto. Por otra parte, para el año 2009 hasta el mes de agosto un total de 132 casos pudieron reportarse de enfermedades gastrointestinales con un valor máximo de 21 casos en el mes de febrero. Es importante presentar que estos datos obtenidos de número de casos son basados en análisis estadístico de estudio previos de Carbelli pero no han sido confirmados con estudios epidemiológicos en Puerto Rico. En fin, es necesario hacer mención que ante este panorama donde si hay una correlación entre organismos indicadores y enfermedades gastrointestinales, y basado en estudios previos y parámetros estadísticos de la EPA, el balneario de Patillas refleja una condición de riesgo a la salud humana.

## CÁPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este estudio, se combinamos los análisis estadísticos de los valores de CFU obtenidos en las muestras colectadas por la JCA, de los valores de CFU obtenido durante el muestreo realizado en el mes de octubre del 2008 y elaboramos un análisis geográfico e hidrológico del área para determinar la fuente de contaminación de mayor probabilidad. Además, presentamos un análisis de identificación de riesgos con la información histórica de los valores de CFU en el balneario con el fin de ilustrar la posibilidad de contraer enfermedades gastrointestinales o las posibles implicaciones de la exposición a agentes en dicha área.

Basado en los resultados del análisis estadístico de los valores de CFU obtenido por la JCA podemos llegar a varias conclusiones. Durante todos los años presentamos una tendencia de disminución de los valores de CFU desde el canal aguas arriba del puente hasta el punto de muestreo frente a los baños. Durante los años 2006 al 2009 en el mes de agosto se presentaron los valores más altos de CFU en los años 2006 y 2008. Además, aunque el balneario presentó unas tendencias a disminución de los valores de CFU, el punto frente a los baños es el área del balneario que está sobre el estándar permitido de 35 CFU y que un total de 39% de todas las muestras colectadas hasta el mes de Agosto estén sobre el límite de confianza de 75% (104CFU) implica que aun el problema existe. Por otra parte, y basado en los posibles casos de enfermedades gastrointestinales, se presentó que de los datos de CFU hasta el mes de agosto un total de

132 casos pudieran haber sido relacionados a la exposición de contaminación fecal en el balneario. Esto confirma aún las condiciones, el riesgo y el panorama que existe en el balneario de Patillas.

Por otra parte, cabe mencionar que de los datos obtenidos durante el muestreo obtuvimos promedios geométricos de 2 CFU y una relación de 4 posibles casos de contraer enfermedades gastrointestinales. También obtuvimos la misma tendencia en los datos obtenidos de la JCA de disminución de CFU desde el extremo izquierdo del balneario hasta el frente de los baños. Esto confirma la probabilidad de que a pesar de la existencia de descargas pluviales al balneario el punto o la fuente de contaminación se radica en el extremo izquierdo del balneario en donde se encuentra una cuenca que descarga directamente al balneario. Además, concluimos que basado en la tendencia obtenidas en cuanto al efecto de la profundidad, identificamos el área de profundidad de tobillo en donde los valores de CFU más altos fueron encontrados, los cuales implican directamente un factor de riesgo a niños y personas de edad avanzada los cuales son los usuarios más comunes en esta área en los balnearios.

En cuanto a la fuente de contaminación bacteriana en el balneario, a pesar que no se pudo identificar con las técnicas moleculares el análisis de censo, características de los hogares, falta de conexión sanitaria a sistemas de tratamientos y el desagüe directo de las quebradas al balneario podrían constituir una evidencia para deducir que la principal fuente de contaminación es de origen humano.

Ante esta situación desarrollamos varias recomendaciones con el fin de minimizar el riesgo de enfermedades gastrointestinales debido a la exposición a contaminación fecal.

1. Realizar un muestreo diario por un periodo de tiempo para establecer un modelo predictivo del comportamiento de la contaminación bacteriana a través de los días para así poder emitir aviso y evitar la posible exposición a los bañistas.
2. Evaluar la condición de las conexiones de los hogares a los sistemas sanitarios o pozos sépticos en el área.
3. Elaborar un muestreo a lo largo de la quebrada para establecer un gradiente más definido de ubicación de la fuente de contaminación.
4. Realizar un muestreo del fondo del balneario para determinar si los valores de CFU son mayores en la sedimentación del fondo del balneario.
5. Evaluar cada balneario para determinar el comportamiento en termino de CFU y establecer un plan de muestreo basado en el mismo
6. Evaluar la posibilidad de establecer conexión de los hogares a los sistemas de tratamientos de aguas usadas de la AAA.
7. Para el análisis molecular la utilización una muestra cruda de la planta de la AAA para elaborar el análisis de un control positivo y así determinar la funcionalidad de la metodología para confirmar el análisis de PCR.
8. Para el análisis molecular aumentar el tiempo de tres horas de lavado de las muestras con azuro de dextrosa para promover el crecimiento y optimizar el lavado de los filtros.
9. Realizar estudios epidemiológicos para caracterizar el comportamiento y la relación de los indicadores de contaminación fecal con enfermedades gastrointestinales en Puerto Rico.

Para finalizar es importante establecer que aunque para la determinar si el origen de las bacterias era animal o humano encontramos algunas limitaciones con la metodología de análisis molecular para poder completar el mismo. Aún así se obtuvo el conocimiento acerca de estas técnicas para futuras investigaciones y también logramos identificar la fuente de contaminación bacteriana de mayor probabilidad en el balneario de Patillas.

## LITERATURA CITADA

- Bahirathan, M. L., Puente, L., & Seyfried, P. (1998). Use of yellow-pigmented *Enterococci* as a specific indicator of human and nonhuman sources of faecal pollution. *Can J Microbiology*, 44, 1066-1071.
- Balarajan, R., Raleigh S., V., Yuen, P., Wheeler, D., Machin, D., & Cartwright, R. (1991). Health risks associated with bathing in sea water. *British Medical Journal*, 303, 1444-1445.
- Chang, C. (1997). Arch Water in the News: Microbes Endanger U.S Waters. *American Society for Microbiology*, May, 12-17.
- Cheung, W. H. S., Chang, K. C. K., Hung, R. P. S., & Kleevens, J. W. L. (1990). Health effects of beach water pollution in Hong Kong. *Epidemiological Infections*, 105, 139-162.
- Corbett, S. J., Rubin, G. L., Curry, G. K., Kleinbaub, D. G., & Sydney Beach Users Study Advisory Group. (1993). The health effects of swimming at Sydney beaches. *American Journal of Public Health*, 83(12), 1701-1706.
- Dorfman, M., & Stoner, N. (2007). *A guide to water quality at vacations beaches. Testing the waters*. Washington, DC: Natural Resources Defense Council.
- Dufour, A. P. (1999). *Memo from A. Dufour to Elizabeth Sutherland, Acting Director, Standards and Applied Science Division*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Science and Technology.

- Fattal, B., Peleg-Olevsky, E., Agursky, T., & Shuval, H. I. (1987). The association between seawater pollution as measured by bacterial indicators and morbidity among bathers at Mediterranean bathing beaches of Israel. *Chemosphere*, 16, 565-570.
- Ferley, J. P., Zmirou, D., Balducci, F., Baleux, B., Fera, P., Larbaigt, G., Jacq, E., Moissonnier, B., Blineau, A., & Boudot, J. (1989). Epidemiological significance of microbiological pollution criteria for river recreational waters. *International Journal of Epidemiology*, 18(1), 198-205.
- Fleisher, J. M., Kay, D., Salmon, R. L., Jones, F., Wyer, M. D., & Godfree, A. F. (1996). Marine waters contaminated with domestic sewage: Nonenteric illnesses associated with bather exposure in the United Kingdom. *American Journal of Public Health*, 86(9), 1228-1234.
- Francy, D. S., Myers, D. N., & Metzker, K. D. (1993). *Escherichia coli and fecal coliform bacteria as indicators of recreational water quality* (Water Resources Investigations Report 93-4083). Columbus, OH: U.S. Geological Survey.
- Haile, R. (1996). *A health effects study of swimmers in Santa Monica Bay*. Monterey Park, CA: Santa Monica Bay Restoration Project.
- Hammerum, A. M., & Jensen, L. B. (2002). Prevalence of esp, encoding the enterococcal surface protein, in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital patients, poultry, and pigs in Denmark. *J Clin Microbiol*, 40, 4396.
- Harwood, V. J., Shehane, S. D., & Ulrich, R. M. (2005). *Microbial source tracking: tools for refining total maximum daily load assessments*. Florida: Department of Environmental Protection.



- Howard, B. J. (1998). *Clinical and Pathogenic Microbiology* (2nd ed., pp.11). St. Louis, MO: Mosby-Year Book, Inc.
- He, J. W., & Jiang, S. (2005). Quantification of *Enterococci* and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2250-2255.
- Junta de Calidad Ambiental. (2003). Reglamentos de estándares de calidad de agua de Puerto Rico en ley sobre política pública ambiental. Ley núm. 9 de 18 de junio de 1970. San Juan, PR: Departamento de Estado.
- Junta de Calidad Ambiental. (2004). *Ley sobre política pública ambiental*. Ley núm. 416 de 22 de septiembre de 2004. San Juan, PR: Departamento de Estado.
- Junta de Calidad Ambiental. (2007). *Resultados de monitoria de playas al 7 de septiembre de 2007*. Recuperado de <http://www.gobierno.pr/NR/rdonlyres/CF3E0B80-2AD4-4549-93A0-D2B1A71A2B7C/0/Resultadosmonitoriadeplayasal7septiembre2007.pdf>.
- Junta de Calidad Ambiental. (2008). *Informe Integrado 305 (b) y 303(d)*. Estado Libre Asociado de Puerto Rico. San Juan.
- Kay, D., Fleisher, J. M., Salmon, R. L., Jones, F., Wyer, M. D., Godfree, A. F., Zelenau-Jacqotte, Z., & Shore, R. (1994). Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: Results from randomised exposure. *The Lancet*, 344, 905-909.
- Keller, G. (2005). *Statistics for management and economics* (7th ed.). United States of America: Thomson South Western.
- Kueh, C. S. W., Tam, T. Y., Lee, T. W., Wang, S. L., Lloyd, O. L., Yu, I. T. S., Wang, T. W., Tam, J. S., & Bassett, D. C. J. (1995). Epidemiological study of swimming-

- associated illnesses relating to bathing-beach water quality. *Water Science Technology*, 31, 1-4.
- Lee, S. H., Levy, D. A., Craun, G. F., Beach, M. J., & Calderón, R. L. (2002). *Surveillance for waterborne disease outbreaks*. United States: MMWR Surveillance Summary.
- Manero, A., & Blanch, R. A. (1999). Identification of *Enterococcus spp.* with a biochemical key. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4425-4430.
- McBride, G. B., Salmond, C. E., Bandaranayake, D. R., Turner, S. J., Lewis, G. D., & Hill, D. G. (1998). Health effects of marine bathing in New Zealand. *International Journal of Environmental Health Research*, 8, 173-189.
- Pruss, A. 1998. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *Int J Epidemiol*, 27, 1-9.
- Quednau, M., Ahrne, S., & Molin, G. (1999). Genomic relationships between *Enterococcus faecium* strains from different sources and with different antibiotic resistance profiles evaluated by restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA using EcoRI and PvuII. *Appl Environ Microbiol*, 65, 1777-1780.
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., & Lukasik, J. (2002). Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol*, 68, 5796-5803.
- Scott, T. M., Jenkins, T. M., Lukasik, J., & Rose, J. B. (2005). Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environ Sci Technol*, 39, 283-287.

- Seyfried, P. L., Tobin, R. S., Brown, N. E., & Ness, P. F. (1985). A prospective study of swimming-related illness: II. Morbidity and the microbiological quality of water. *American Journal of Public Health*, 75(9), 1071-1075.
- Sloat, S., & Ziel, C. (1992). *The use of indicator organisms to assess public water safety*. Loveland, CO: Hach Company.
- Solley, W.B., Pierce, R.R., & Perlman, H.A. (1993). *Estimated use of water in the United States in 1990*. U.S. Geological Survey Circular 1081, 76 p
- Todar, K. (2008). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Retrieved from <http://www.textbookofbacteriology.net>.
- Toranzos, G., & Smith, H. H. (2007). *A prospective epidemiological study on the morbidity of bathers exposed to coastal waters in the Caribbean*. Water Resources Research Institute, UVI. U.S. Geological Survey 41st ACS Junior Technical Meeting & 26th Puerto Rico Interdisciplinary Scientific Meeting (PRISM). University of Puerto Rico at Cayey.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (1977). Clean Water Act, 303 U.S.C §1251.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (1986). *Ambient water quality criteria for bacteria*. (EPA440/5-84-002). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Research and Development Office of Water.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (1999). *Action plan for beaches and recreational waters*. (EPA 600/R-98-079). Washington, DC: Office of Research and Development and Office of Water.

- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2000a). *Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria—1986*. (EPA 823/D-00-001). Washington, DC: Office of Water.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2000b). *Beaches environmental assesment and coastal health act of 2000*. (Public law 106-284). Washington, DC.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2000c). *Improved enumeration methods for recreational water quality indicator Enterococci and Escherichia coli*. (EPA821/R-97/-004). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Water.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2000d). *Source water assesment using geographic information systems*. National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development. U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2003). *Bacterial water quality standards for recreational waters (Freshwater and Marine Waters Status Report)*. (EPA-823-R-03-008). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Water.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2004a). *National list of beaches*. (EPA-823-R-04-004). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Water.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2004b). *Water quality standard for coastal and great lakes recreational waters*. (Proposed Rule. 40 CFR Part 131). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Water.

- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2005a). *Microbial source tracking guide document*. (EPA/600/R-05-064). Cincinnati, OH.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2005b). *The EMPACT Beaches Project: Results from a study on microbiological monitoring in recreational waters*. (EPA-600/R-04-023). Cincinnati, OH.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2006a). *Method 1600: Enterococci in water by membrane filtration using membrane-Enterococcus indoxyl- $\beta$ -D-glucoside agar (mEI)*. (EPA-821-R-06-009). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Water.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2006b). *Water quality standards for coastal recreation waters*. (EPA 823-F-06-012). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Water.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2007a). *EPA's BEACH Report: 2006 Swimming Season*. (EPA 823-R-07-005). Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency Office of Water.
- U.S. Environmental Protection Agency [USEPA]. (2007b). *Report of the experts scientific workshop on critical research needs for the development of new or revised recreational water quality criteria*. (EPA 823-F-07-006). Washington, DC: US Government.
- Von Schirnding, Y. E. R., Kfir, R., Cabelli, V., Franklin, L., & Joubert, G. (1992). Morbidity among bathers exposed to polluted seawater. *South African Medical Journal*, 81(6), 543-546.

- Wheeler, A. L., Hartel, P. G., Godfrey, D. G., Hill, J. L., & Segars, W. I. (2002). Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ Qual*, 31(4), 1286-93.
- World Health Organization. (1998). *Guidelines for safe recreational-water environments: coastal and fresh waters*. Geneva: 70.
- Wilhelm, L.J., & Maluk, T.L. (1998). *Fecal-indicator bacteria in surface waters of the Santee River Basin and coastal drainages, North and South Carolina, 1995-98*. U.S. Geological Survey FS-085-98.

## **TABLAS**

Tabla 1

*Valores de CFU obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental en el año 2006 en el balneario de Patillas.*

Fecha	Extremo izquierdo de la playa n=32	Caño agua arriba del puente n=31	Balneario frente a los baños n=33	Canal pluvial n=4
11/01/06	674	362	23	ND
23/01/06	1139	900	290	ND
30/01/06	23	93	192	ND
07/02/06	323	246	30	ND
22/02/06	194	168	138	ND
28/02/06	92	178	85	ND
07/03/06	1	444	6	ND
20/03/06	49	215	4	ND
04/04/06	20	220	108	ND
18/04/06	54	112	4	ND
02/05/06	1	20	30	ND
16/05/06	94	182	154	ND
31/05/06	199	790	43	ND
07/06/06	1	125	7	600
13/06/06	790	1150	64	600
19/06/06	538	5100	58	97
27/06/06	783	190	426	ND
06/07/06	525	195	20	1
11/07/06	413	571	66	ND
18/07/06	ND	ND	12	ND
31/07/06	65	388	7	ND
08/08/06	308	279	216	ND
15/08/06	404	600	600	ND
22/08/06	876	187	37	ND
28/08/06	190	1820	100	ND
06/09/06	503	ND	162	ND
11/09/06	54	1	12	ND
19/09/06	72	720	18	ND
03/10/06	120	752	20	ND
17/10/06	558	1460	391	ND
31/10/06	27	288	33	ND
28/11/06	1	1	1	ND
12/12/06	72	101	17	ND

ND=No determinado.



Tabla 2

*Valores de CFU obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental en el año 2007 en el balneario de Patillas.*

Fecha	Extremo izquierdo de la playa n=24	Caño agua arriba del puente n=25	En el balneario frente a los baños n=26
10/01/07	41	82	12
23/01/07	27	154	110
29/01/07	21	860	2030
06/02/07	99	80	11
06/03/07	90	20	29
19/03/07	40	127	11
03/04/07	560	61	37
10/04/07	ND	ND	190
18/04/07	545	800	1500
23/04/07	329	326	52
01/05/07	458	1620	127
07/05/07	83	133	1
15/05/07	90	335	9
29/05/07	ND	774	513
04/06/07	132	338	56
12/06/07	600	600	1480
18/06/07	446	692	79
26/06/07	600	600	64
02/07/07	190	289	180
09/07/07	149	634	51
18/07/07	192	840	32
30/07/07	156	963	189
07/08/07	600	600	469
13/08/07	126	613	11
27/08/07	600	1860	38
04/09/07	212	625	42

ND=No determinado

Tabla 3

*Valores de CFU obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental en el año 2008 en el balneario de Patillas.*

Fecha	Extremo izquierdo de la playa n=29	Caño agua arriba del puente n=29	Balneario frente a los baños n=33
08/01/2008	13	268	93
15/01/2008	104	30	1
22/01/2008	97	602	486
28/01/2008	100	160	20
04/02/2008	1700	240	1
27/02/2008	232	744	16
03/03/2008	600	1560	272
10/03/2008	217	893	1
17/03/2008	48	1580	12
31/03/2008	156	269	10
14/04/2008	1670	2120	105
22/04/2008	ND	ND	240
28/04/2008	488	456	20
12/05/2008	136	212	36
20/05/2008	116	84	10
27/05/2008	352	1064	184
02/06/2008	ND	ND	34
09/06/2008	76	236	4
24/06/2008	160	512	68
01/07/2008	ND	ND	1
08/07/2008	80	264	1
22/07/2008	24	284	80
29/07/2008	ND	ND	1
05/08/2008	500	524	32
18/08/2008	84	232	370
25/08/2008	1084	240	224
02/09/2008	68	44	52
08/09/2008	160	536	206
15/09/2008	8	164	24
30/09/2008	108	120	1
28/10/2008	452	108	24
12/11/2008	88	76	24
12/11/2008	48	152	52

ND=No determinado

Tabla 4

*Valores de CFU obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental en el año 2009 en el balneario de Patillas.*

Fecha	Extremo izquierdo de la playa n=22	Caño agua arriba del puente n=22	Balneario frente a los baños n=23
07/01/2009	268	180	8
21/01/2009	200	328	112
26/01/2009	16	142	8
03/02/2009	624	300	76
11/02/2009	384	848	72
17/02/2009	168	312	20
02/03/2009	400	300	112
09/03/2009	68	80	182
16/03/2009	116	68	1
30/03/2009	20	60	1
13/04/2009	28	36	24
27/04/2009	4	140	12
11/05/2009	16	92	4
26/05/2009	26	568	28
08/06/2009	48	1256	112
15/06/2009	144	444	4
23/06/2009	352	712	80
30/06/2009	ND	ND	8
06/07/2009	432	240	260
13/07/2009	152	284	76
21/07/2009	240	240	372
29/07/2009	112	340	8
03/08/2009	140	240	12

ND=No determinado

Tabla 5

*Valores del promedio de CFU por mes de los valores obtenidos por la Junta de Calidad Ambiental desde el año 2006 hasta el 2009 en el balneario de Patillas.*

Fechas	Extremo izquierdo de la playa n=22	Caño agua arriba del puente n=22	Balneario frente a los baños n=23	Canal pluvial
enero 2006	612	452	168	ND
febrero 2006	203	197	84	ND
marzo 2006	25	330	5	ND
abril 2006	25	117	47	ND
mayo2006	147	486	99	ND
junio2006	528	1641	139	432
julio2006	334	385	26	1
agosto2006	445	722	238	ND
septiembre2006	210	361	64	ND
octubre2006	235	833	148	ND
noviembre2006	1	1	1	ND
diciembre2006	72	101	17	ND
enero 2007	30	365	717	ND
febrero 2007	99	80	11	ND
marzo 2007	65	74	20	ND
abril 2007	478	396	445	ND
mayo 2007	210	716	163	ND
junio 2007	445	558	420	ND
julio 2007	172	682	113	ND
agosto 2007	442	1024	173	ND
septiembre 2007	212	625	42	ND
enero 2008	79	265	150	ND
febrero 2008	966	492	9	ND
marzo 2008	255	1076	74	ND
abril 2008	1079	1288	122	ND
mayo 2008	201	453	77	ND
junio 2008	118	374	35	ND
julio 2008	52	274	21	ND
agosto 2008	556	332	209	ND
septiembre 2008	86	216	71	ND
octubre 2008	452	108	24	ND
noviembre 2008	68	114	38	ND
enero 2009	161	217	43	ND
febrero 2009	392	487	56	ND
marzo 2009	151	127	74	ND
abril 2009	21	330	16	ND
mayo 2009	21	330	16	ND
junio 2009	181	804	51	ND
julio 2009	234	276	179	ND
agosto 2009	140	240	12	ND

ND=No determinado

Tabla 6

*Todos los parámetros estadísticos del 2006 de todas las áreas del balneario de Patillas que son monitoreadas por la JCA.*

2006	Extremo izquierdo de la playa	Caño agua arriba del puente	Balneario frente a los baños	Canal pluvial
Numero de datos	32	34	34	34
Máximo	1139	5100	600	600
Mínimo	1	1	1	1
Promedio	286	576	102	325
Desviación estándar	309	944	141	321
Media	155	246	37	349
Moda	1	1	30	600
Varianza	95623.84577	891246.0624	19850.75189	102736.3333

Tabla 7

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2006 para el extremo izquierdo del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-190	190	17	0.53125	0.53125
190-380	380	4	0.125	0.65625
380-570	570	6	0.1875	0.84375
570-760	760	1	0.03125	0.875
760-950	950	3	0.09375	0.96875
950-1140	1140	1	0.03125	1

Tabla 8

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2006 para el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-850	850	26	0.838709677	0.838709677
850-1700	1700	3	0.096774194	0.935483871
1700-2550	2550	1	0.032258065	0.967741935
2550-3400	3400	0	0	0.967741935
3400-4250	4250	0	0	0.967741935
4250-5100	5100	1	0.032258065	1

n=31

Tabla 9

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2006 en punto de muestreo frente a los baños del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-100	100	23	0.696969697	0.696969697
100-200	200	5	0.151515152	0.848484849
200-300	300	2	0.060606061	0.909090909
300-400	400	1	0.03030303	0.939393939
400-500	500	1	0.03030303	0.96969697
500-600	600	1	0.03030303	1

n=33



Tabla 10

*Parámetros estadísticos obtenidos para los datos de la JCA de todas las áreas de muestreo durante todo el año.*

Parámetro estadístico	Resultado
Número de datos	100
Máximo	5100
Mínimo	1
Promedio	316.93
Desviación estándar	588.4235617
Media	146
Moda	1
Varianza	346242.288

Tabla 11

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2006 de todas las zonas de muestreo del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clase	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-638	638	97	0.97	0.97
638-1276	1276	2	0.02	0.99
1276-1914	1914	0	0	0.99
1914-2552	2552	0	0	0.99
2552-3190	3190	0	0	0.99
3190-3828	3828	0	0	0.99
3828-4466	4466	0	0	0.99
4466-5104	5104	1	0.01	1

n=100

Tabla 12

*Todos los parámetros estadísticos del 2007 de todas las áreas del balneario de Patillas que son monitoreadas por la JCA.*

2007	Extremo izquierdo de la playa	Caño agua arriba del puente	Balneario frente a los baños
Número de datos	24	25	26
Máximo	600	1860	2030
Mínimo	21	20	1
Promedio	266.0833333	561.04	281.6538462
Desviación estándar	219.0318453	458.4737797	534.4207288
media	173	600	54
moda	600	600	11
varianza	47974.94928	210198.2067	285605.5154

Tabla 13

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2007 para el extremo izquierdo del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-100	100	8	0.333333333	0.333333333
100-200	200	6	0.25	0.583333333
200-300	300	1	0.041666667	0.625
300-400	400	1	0.041666667	0.666666666
400-500	500	2	0.083333333	0.75
500-600	600	6	0.25	1

n=24

Tabla 14

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2007 para el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-310	310	8	0.32	0.32
310-620	620	7	0.28	0.6
620-930	930	7	0.28	0.88
930-1240	1240	1	0.04	0.92
1240-1550	1550	0	0	0.92
1550-1860	1860	2	0.08	1

n=25

Tabla 15

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2007 en punto de muestreo frente a los baños del balneario de Patillas.*

Intervalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-338	338	21	0.807692308	0.807692308
338-676	676	2	0.076923077	0.884615385
676-1014	1014	0	0	0.884615385
1014-1352	1352	0	0	0.884615385
1352-1690	1690	2	0.076923077	0.961538462
1690-2030	2030	1	0.038461538	1

n=26

Tabla 16

*Parámetros estadísticos obtenidos para los datos de la JCA de todas las áreas de muestreo durante todo el año 2007.*

Parámetro estadístico	Resultado
Número de datos	75
Máximo	2030
Mínimo	1
Promedio	369.8
Desviación estándar	445.1362075
Media	180
Moda	600
Varianza	198146.2432

Tabla 17

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2007 de todas las zonas de muestreo del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-290	290	44	0.586666667	0.586666667
290-580	580	10	0.133333333	0.72
580-870	870	15	0.2	0.92
870-1160	1160	1	0.013333333	0.933333334
1160-1450	1450	0	0	0.933333334
1450-1740	1740	3	0.04	0.973333334
1740-2030	2030	2	0.026666667	1

n=75



Tabla 18

*Todos los parámetros estadísticos del 2008 de todas las áreas del balneario de Patillas que son monitoreadas por la JCA..*

2008	Extremo izquierdo de la playa	Cañ agua arriba del puente	Balneario frente a los baños
Número de datos	29	29	33
Máximo	1700	2120	486
Mínimo	8	30	1
Promedio	309.2758621	474.9655172	81.96969697
Desviación estándar	444.9606641	515.5162103	118.8687524
Media	116	264	24
Moda	48	240	1
Varianza	197989.9926	265756.9631	14129.7803

Tabla 19

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2008 para el extremo izquierdo del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Número datos por clase	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-283	283	21	0.724137931	0.724137931
283-566	566	4	0.137931034	0.862068965
566-849	849	1	0.034482759	0.896551724
849-1132	1132	1	0.034482759	0.931034483
1132-1415	1415	0	0	0.931034483
1415-1700	1700	2	0.068965517	1

n=29

Tabla 20

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2008 para el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Número datos por clase	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-353	353	18	0.620689655	0.620689655
353-706	706	5	0.172413793	0.793103448
706-1059	1059	2	0.068965517	0.862068965
1059-1412	1412	1	0.034482759	0.896551724
1412-1765	1765	2	0.068965517	0.965517241
1765-2120	2120	1	0.034482759	1

n =29

Tabla 21

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2008 en punto de muestreo frente a los baños del balneario de Patillas.*

Intervalo de clases	Límite superior de clase	Número datos por clase	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-81	104	24	0.727272727	0.757575758
81-162	162	2	0.060606061	0.787878761
162-243	243	4	0.121212121	0.909090882
243-324	324	1	0.03030303	0.939393912
324-405	405	1	0.03030303	0.969696942
405-486	486	1	0.03030303	0.999999973

n=33

Tabla 22

*Parámetros estadísticos obtenidos para los datos de la JCA de todas las áreas de muestreo durante todo el año 2008.*

Parámetro estadístico	Resultados
Número de datos	91
Máximo	2120
Mínimo	1
Promedio	279.6483516
Desviación estándar	419.766797
Media	116
Moda	1
Varianza	176204.1639

Tabla 23

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2008 de todas las zonas del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Número datos por clase	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-303	303	70	0.769230769	0.769230769
303-606	606	12	0.131868132	0.901098901
606-909	909	2	0.021978022	0.923076923
909-1212	1212	2	0.021978022	0.945054945
1212-1515	1515	0	0	0.945054945
1515-1818	1818	4	0.043956044	0.989010989
1818-2121	2121	1	0.010989011	1

n=91

Tabla 24

*Parámetros estadísticos del 2009 de todas las áreas del balneario de Patillas que son monitoreadas por la JCA.*

2009	Extremo izquierdo de la playa	Caño agua arriba del puente	Balneario frente a los baños
Número de datos	22	22	23
Máximo	624	1256	372
Mínimo	4	36	1
Promedio	179.9090909	327.7272727	69.2173913
Desviación estándar	167.8553541	293.6601829	93.42471764
Media	142	262	24
Moda	16	240	8
Varianza	28175.41991	86236.30303	8728.177866

Tabla 25

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2009 para el extremo izquierdo del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-125	125	10	0.454545455	0.454545455
125-250	250	6	0.272727273	0.727272728
250-375	375	2	0.090909091	0.818181819
375-500	500	3	0.136363636	0.954545455
500-625	625	1	0.045454545	1

n=22



Tabla 26

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2009 para el caño aguas arriba del puente del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-251	251	11	0.5	0.5
251-502	502	7	0.318181818	0.818181818
502-753	753	2	0.090909091	0.909090909
753-1004	1004	1	0.045454545	0.954545455
1004-1256	1256	1	0.045454545	1

n=22

Tabla 27

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2009 en punto de muestreo frente a los baños del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-74	74	17	0.739130435	0.739130435
74-148	148	6	0.260869565	0.869565217
148-222	222	1	0.043478261	0.913043478
222-296	296	1	0.043478261	0.956521739
296-372	372	1	0.043478261	1

n=23

Tabla 28

*Parámetros estadísticos obtenidos para los datos de la JCA de todas las áreas de muestreo durante todo el año 2009.*

Parámetros estadísticos	Resultados
Número de datos	67
Máximo	1256
Mínimo	1
Promedio	190.4477612
Desviación estándar	225.2856963
Media	112
Moda	8
Varianza	50753.64496

Tabla 29

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos por la JCA en el 2009 de todas las zonas del balneario de Patillas.*

Intérvalo de clases	Límite superior de clase	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
0-179	179	41	0.611940299	0.611940299
179-358	358	16	0.23880597	0.850746269
358-537	537	5	0.074626866	0.925373135
537-716	716	3	0.044776119	0.970149254
716-895	895	1	0.014925373	0.985074627
895-1074	1074	0	0	0.985074627
1074-1256	1256	1	0.014925373	1

n=67

Tabla 30

*Parámetros estadísticos obtenidos de los datos de la JCA dividido por área de muestreo durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009.*

	Máximo	Mínimo	Promedio	Desviación estándar	Media	Moda	Varianza	Número datos
2006								
Caño agua arriba del puente	5100	1	576	944	246	1	891246	34
Extremo izquierdo de la playa	1139	1	286	309	155	1	95624	32
Balneario frente a los baños	600	1	102	141	37	30	19851	34
2007								
Caño agua arriba del puente	1860	20	561	458	600	600	210198	25
Extremo izquierdo de la playa	600	21	266	219	173	600	47975	24
Balneario frente a los baños	2030	1	282	534	54	11	285606	26
2008								
Caño agua arriba del puente	2120	30	475	516	264	240	265757	29
Extremo izquierdo de la playa	1700	8	309	445	116	48	197990	29
Balneario frente a los baños	486	1	82	119	24	1	14130	33
2009								
Caño agua arriba del puente	1256	36	328	294	262	240	86236	22
Extremo izquierdo de la playa	624	4	180	168	142	16	28175	22
Balneario frente a los baños	372	1	69	93	24	8	8728	23

Tabla 31

*Parámetros estadísticos de correlación entre áreas de muestreo desde aguas arriba del Puente hasta frente a los baños obtenidos de los datos de la JCA durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009.*

	Años			
	2006	2007	2008	2009
Máximo	-0.915637824	0.108810539	-0.962826795	-0.970556193
Mínimo	0	-0.8429887	-0.958187	-0.9020938
Promedio	-0.99182003	-0.84162001	-0.995928	-0.99657997
Desviación estándar	-0.94811315	0.230693339	-0.93726491	-0.98920605
Media	-0.99723002	-0.95084249	-0.9910476	-0.99998823
Moda	0.8660254	-0.8660254	-0.9437773	-0.8808123
Varianza	-0.902597	0.310498	-0.9663058	-0.9610363

Tabla 32

*Análisis de correlación entre los parámetros estadísticos por área de muestreo de los datos obtenidos por la JCA durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009.*

	Máximos	Mínimos	Promedio	Desviación estándar	Media	Moda	Varianza
Caño agua Arriba del puente	-0.848	0.969	-0.942	-0.882	-0.217	0.187	-0.847
Extremo izquierdo De la playa	-0.111	-0.059	-0.631	-0.211	-0.517	-0.226	-0.089
Balneario frente a los baños	-0.370	0	-0.388	-0.344	-0.626	-0.791	-0.290

Tabla 33

*Datos de los valores del promedio geométrico de CFU obtenidos de los datos de la JCA desde los años 2006 al 2009 en el balneario de Patillas (frente a los baños) dividido en meses.*

Meses	2006	2007	2008	2009
enero	109	139	31	19
febrero	71	11	4	48
marzo	5	18	13	12
abril	21	153	80	17
mayo	58	28	40	11
junio	58	143	21	23
julio	18	86	3	88
agosto	148	58	138	12
septiembre	33	42	23	N/D
octubre	64	N/D	24	N/D
noviembre	1	N/D	35	N/D
diciembre	72	N/D	N/D	N/D

N/D=No determinado



Tabla 34

*Parámetros físicos obtenidos en el muestreo del balneario público de Patillas.*

VARIABLES	Valor mínimo	Valor máximo	Promedio	Desviación estándar
Hora	10:10	12:40	10:00	12:43
CFU/100ml	1.00	17.00	2.49	2.67
Distancia a la orilla (pies)	0.00	194.00	50.81	55.52
Temperatura del agua (°C)	28.40	32.00	29.70	0.72
Temperatura del aire (°C)	24.80	26.50	25.90	0.79
Lluvias desde una semana antes (mm)	1.50	94.50	32.77	44.04
Velocidad del viento(km/hr)	2.50	4.00	3.33	0.58
Densidad de bañistas en el agua	7.00	12.00	9.67	2.07
Densidad de bañistas en la playa	17.00	77.00	45.00	24.88
Embarcaciones	3.00	9.00	5.67	2.52
Animales	2.00	5.00	4.00	1.43
p H	7.37	8.23	7.89	0.27
Turbidez (NTU)	0.00	10.00	9.77	1.51
Conductividad (mS/cm)	27.30	54.70	48.04	6.59
Oxígeno Disuelto (mg/l)	1.44	8.64	4.17	1.85
Salinidad (%)	2.10	3.61	3.10	0.44

Tabla 35

*Correlación entre los parámetros físico obtenidos en el muestreo del balneario.*

Variables	p H	Turbidez	Conductividad	Oxígeno disuelto	Salinidad
Hora	0.417**	0.239	-0.014	0.004	-0.013
CFU/100ml	-0.063	0.083	-0.111	-0.191	-0.136
Distancia a la orilla (pies)	-0.014	0.098	0.118	0.067	0.089
Temperatura del agua (° C)	0.177	0.13	0.141	0.181	0.149
Temperatura del aire (°C)	0.968**	-0.119	0.621**	0.808**	0.694**
Lluvias desde una semana antes (mm)	-0.967**	0.131	-0.619**	-0.823**	-0.692**
Velocidad del viento (km/hr)	-0.016	0.309*	0.226	-0.184	0.251
Densidad de bañistas en el agua	-0.045	0.318*	0.202	-0.221	0.224
Densidad de bañistas en la playa	0.176	0.251	0.349**	0.023	0.388**
Embarcaciones	0.774**	0.047	0.576**	0.536**	0.643**
Animales	-0.426**	0.384*	-0.162	-0.690**	-0.183
p H	-	-0.124	0.465**	0.742**	0.547**
Turbidez (NTU)	-	-	-0.107	-0.247	-0.066
Conductividad (mS/cm)	-	-	-	0.537**	0.963**
Oxígeno disuelto (mg/l)	-	-	-	-	0.588**
Salinidad (%)	-	-	-	-	-

\*  $\alpha < 0.05$  / \*\*  $\alpha < 0.01$

Tabla 36

*Datos de análisis estadístico de los valores de CFU por punto de muestreo en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas durante las fechas de 12/10/08, 19/10/08 y 26/10/08.*

Puntos Muestreo	CFU 12/10/2008	CFU 19/10/2008	CFU 26/10/2008	Promedio CFU	Desviación Estándar
1	1	3	2	2	1.0
2	3	1	5	3	2.0
3	1	1	1	1	0.0
4	1	4	5	3	2.1
5	1	1	1	1	0.0
6	1	1	1	1	0.0
7	3	2	6	4	2.1
8	1	17	1	6	9.2
9	1	1	1	1	0.0
10	2	1	5	3	2.1
11	1	2	1	1	0.6
12	1	8	3	4	3.6
13	5	3	1	3	2.0
14	1	1	5	2	2.3
15	1	3	1	2	1.2
16	3	1	7	4	3.1
17	1	1	1	1	0.0
18	3	1	3	2	1.2
19	6	4	1	4	2.5

Tabla 37

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos durante el muestreo realizado el 12/10/08 en el balneario de Patillas.*

Intérvalo de clase	Límite superior	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
( 0-1 )	1	12	0.631578947	0.631578947
( 1-2 )	2	1	0.052631579	0.684210526
( 2-3 )	3	4	0.210526316	0.894736842
( 3-4 )	4	0	0	0.894736842
( 4-5 )	5	1	0.052631579	0.947368421
( 5-6 )	6	1	0.052631579	1

n=19

Tabla 38

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos durante el muestreo realizado el 19/10/08 en el balneario de Patillas.*

Intérvalo de clase	Límite superior	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
( 0-3 )	3	15	0.789473684	0.789473684
( 3-6 )	6	2	0.105263158	0.894736842
( 6-9 )	9	1	0.052631579	0.947368421
( 9-12 )	12	0	0	0.947368421
( 12-15 )	15	0	0	0.947368421
(15-17)	17	1	0.052631579	1

n=19

Tabla 39

*Distribución de frecuencias, frecuencias relativas y frecuencias acumulativas de los datos obtenidos durante el muestreo realizado el 26/10/08 en el balneario de Patillas.*

Intérvalo de clase	Límite superior	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia acumulativa
( 0-2 )	2	11	0.578947368	0.578947368
( 2-4 )	4	2	0.105263158	0.684210526
( 4-6 )	6	5	0.263157895	0.947368421
( 6-8 )	8	1	0.052631579	1

n=19

Tabla 40

*Datos obtenidos de CFU en el mismo Transecto en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas en las fechas del 12/10/08, 19/10/08 y de 26/10/08.*

Transecto	Valores CFU								
	12/10/2008			19/10/2008			26/10/2008		
1	1	3	1	3	1	1	2	5	1
2	1	1	1	4	1	1	5	1	1
3	3	1	1	2	17	1	6	1	1
4	2	1	1	1	2	8	5	1	3
5	5	1	1	3	1	3	1	5	1
6	3	1	3	1	1	1	7	1	3

Tabla 41

*Datos de correlación entre CFU obtenidos y distancia a la orilla (Transectos) en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas en las fechas del 12/10/08, 19/10/08 y de 26 /10/08.*

Transectos	Fechas		
	12/10/2008	19/10/2008	26/10/2008
1	0	-0.86603	-0.24019
2	0	-0.86603	-0.86603
3	-0.86603	-0.05579	-0.86603
4	-0.86603	0.924473	-0.5
5	-0.86603	0	0
6	0	0	-0.65465



Tabla 42

*Datos obtenidos de CFU en la misma zona (Zona 1 profundidad de tobillo), (Zona 2 profundidad de rodilla) y (Zona 3 profundidad de pecho) en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas en las fechas del 12/10/08,19/10/08 y de 26/10/08.*

Fecha	Zona 1 CFU						Zona 2 CFU						Zona 3 CFU					
12/10/2008	1	1	3	2	5	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
19/10/2008	3	4	2	1	3	1	1	1	17	2	1	1	1	1	1	8	3	1
26/10/2008	2	5	6	5	1	7	5	1	1	1	5	1	1	1	1	3	1	3

Tabla 43

*Datos de correlación entre CFU obtenidos y Zonas (Zona 1 profundidad de tobillo), (Zona 2 profundidad de rodilla) y (Zona 3 profundidad de pecho) en los diferentes días de muestreo en el balneario de Patillas en las fechas del 12/10/08,19/10/08 y de 26/10/08.*

Fecha	Zona 1	Zona 2	Zona 3
12/10/2008	0.740153	-0.654654	0.654654
19/10/2008	-0.61791	-0.124063	0.247227
26/10/2008	0.274338	-0.20702	0.621059

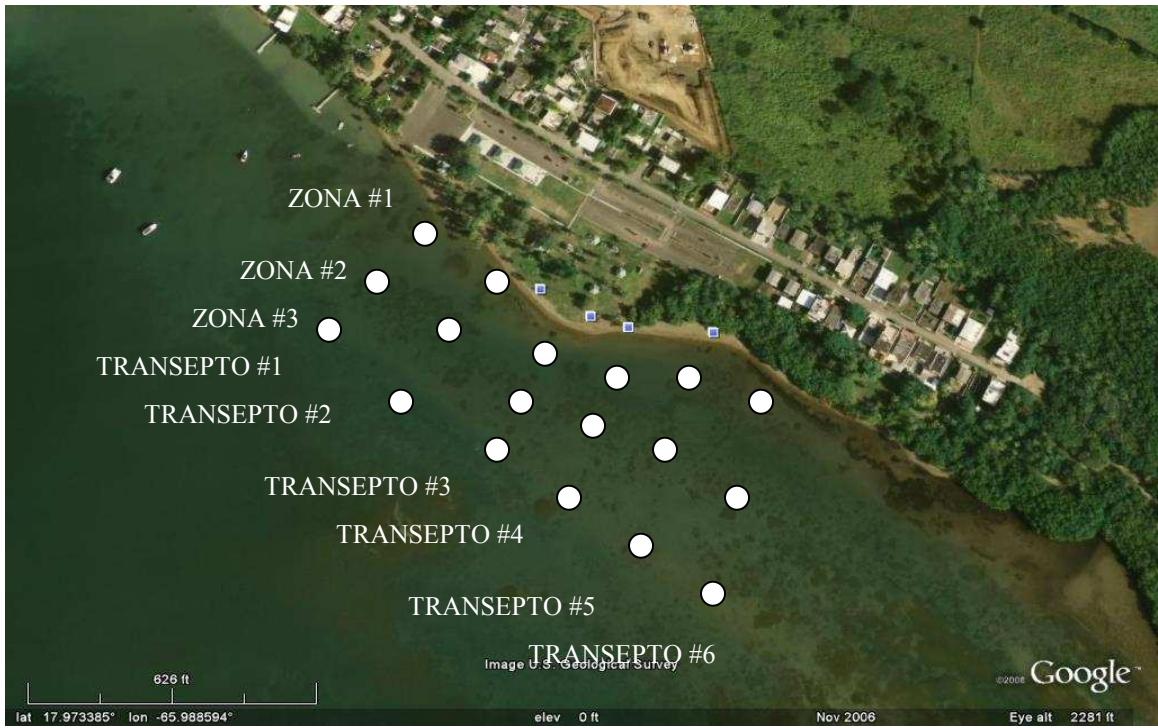
## **FIGURAS**



*Figura 1.* Foto aérea del área de villa pesquera en Patillas.



Figura 2. Foto aérea de los puntos de muestreo de la JCA.



*Figura 3.* Foto aérea de los puntos de muestreo de la investigación divididos en zonas y transeptos.

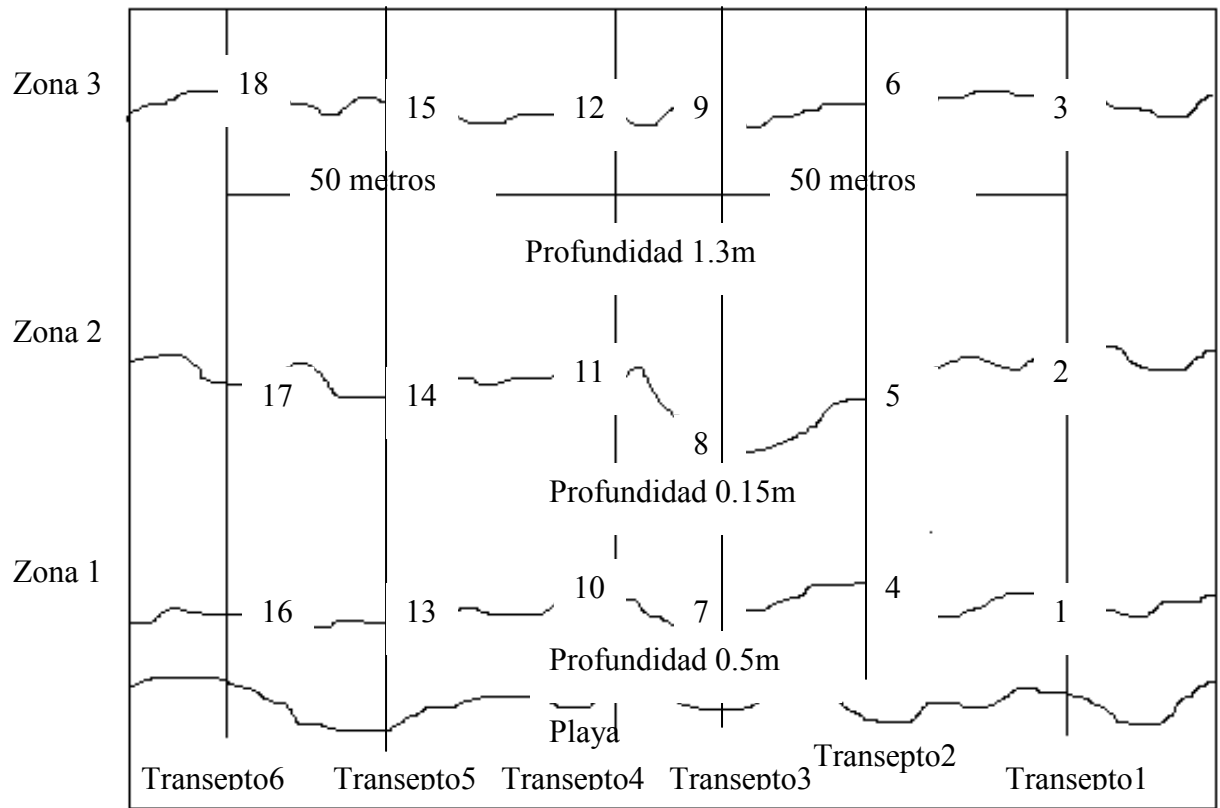


Figura 4. Esquema de la intersección de las zonas y transeptos del muestreo.

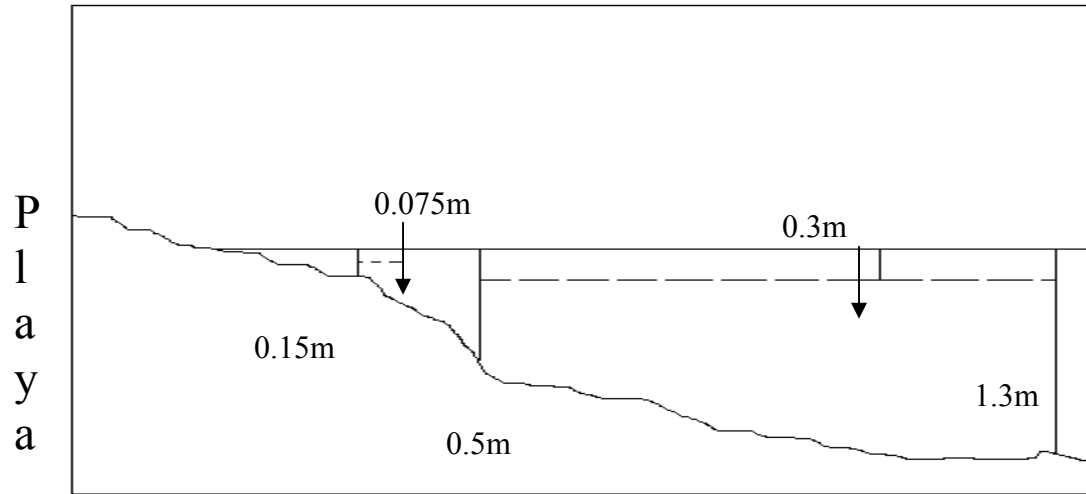


Figura 5. Localización de la profundidad del muestreo en las zonas.



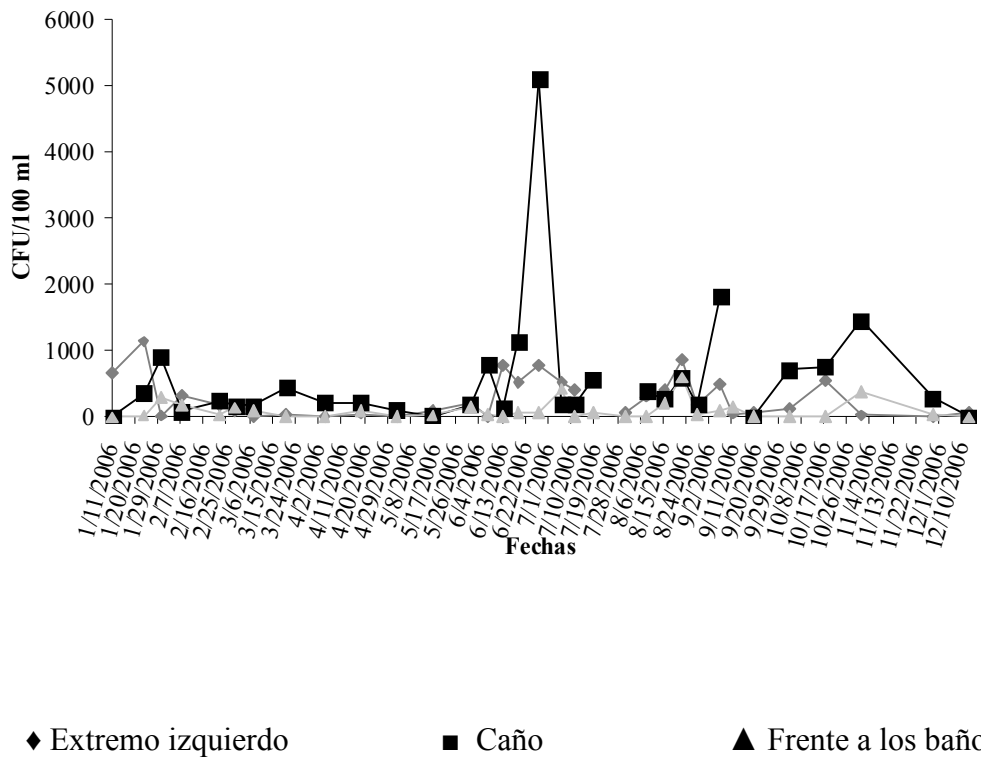
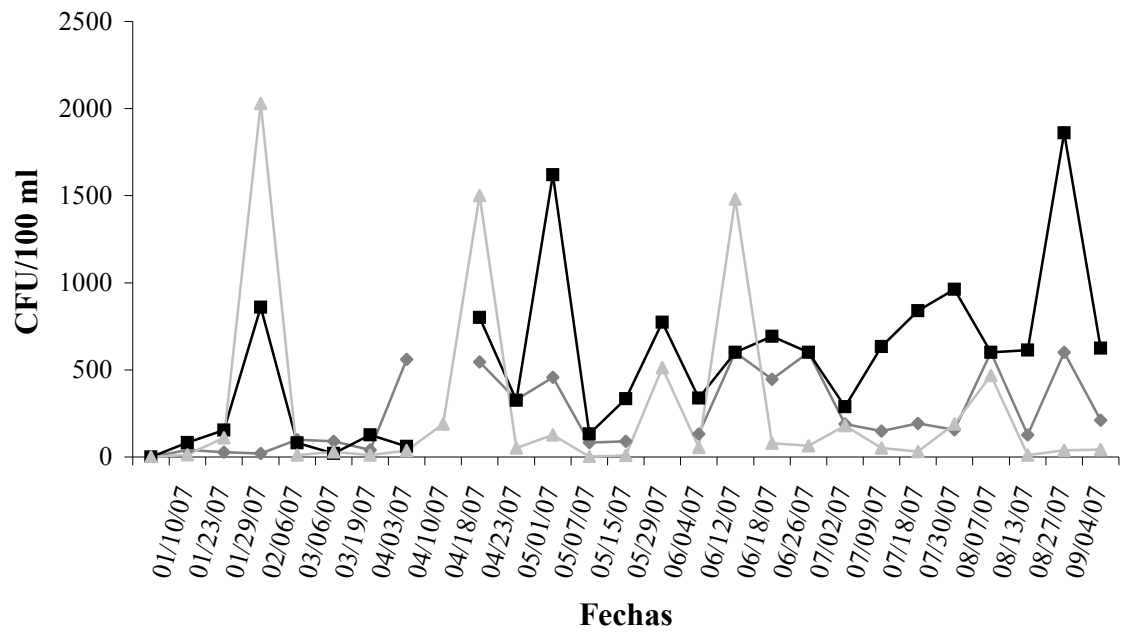


Figura 6. Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2006.



◆ Extremo izquierdo    ■ Caño    ▲ Frente a los baños

Figura 7. Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2007.

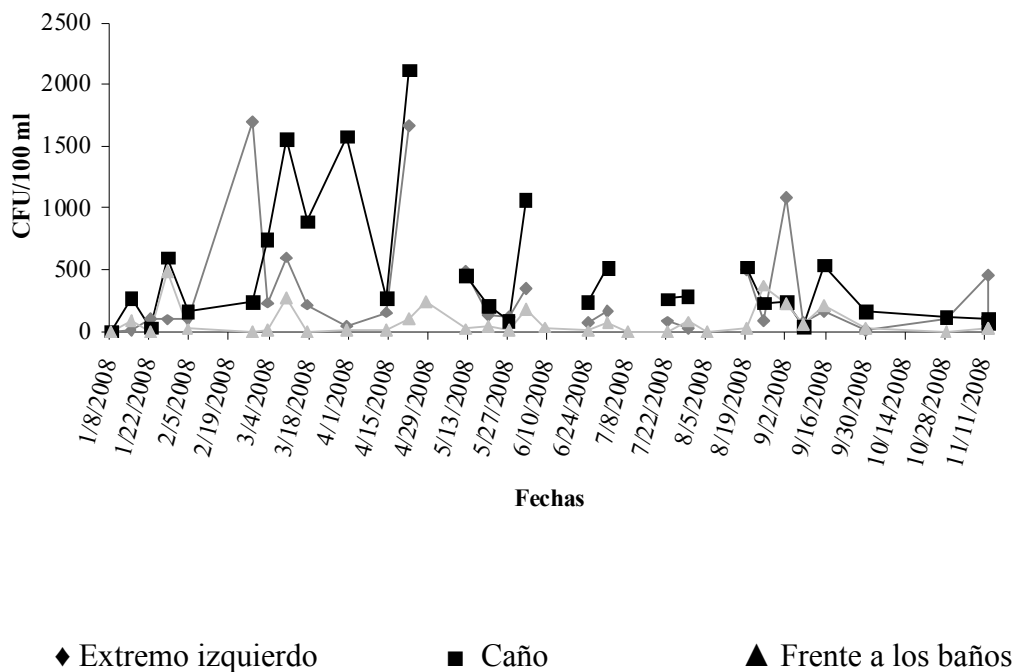


Figura 8. Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2008.

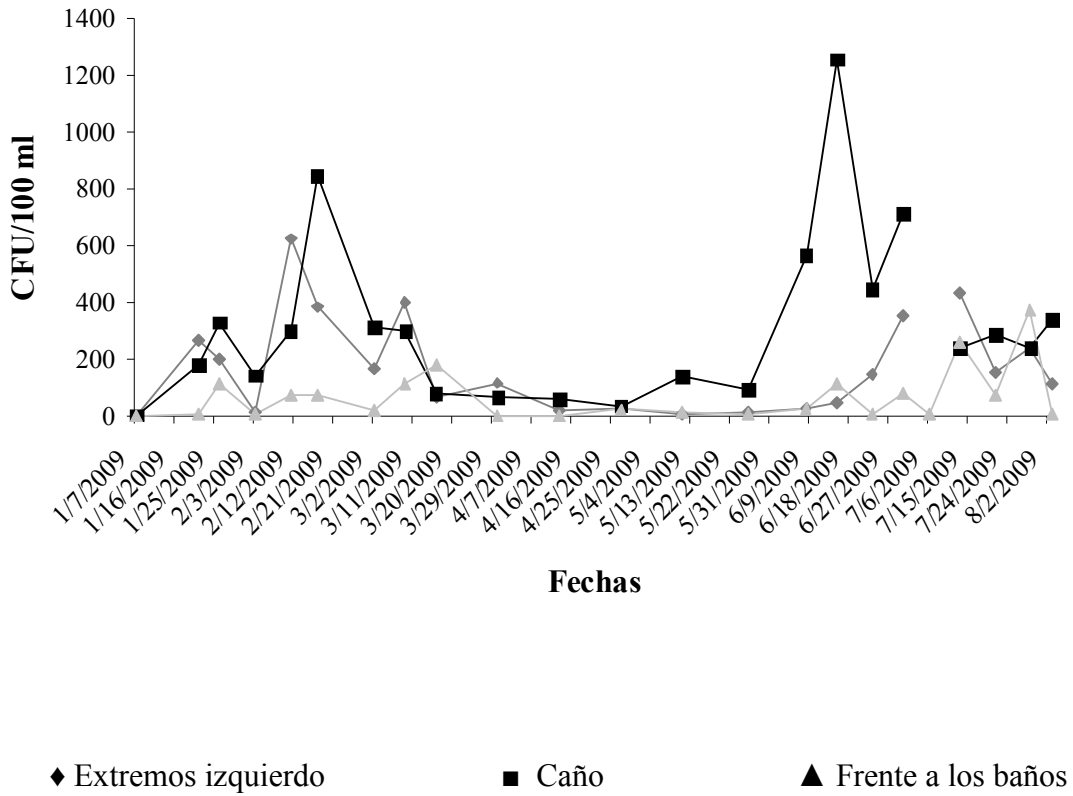
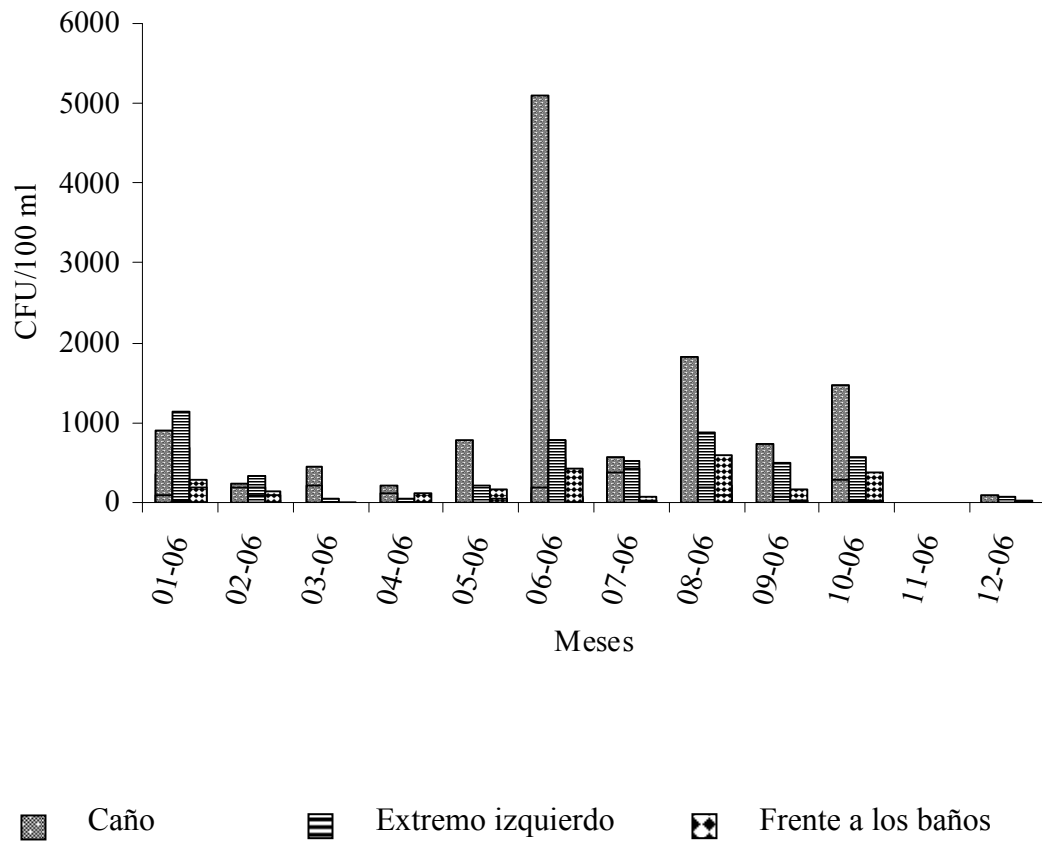
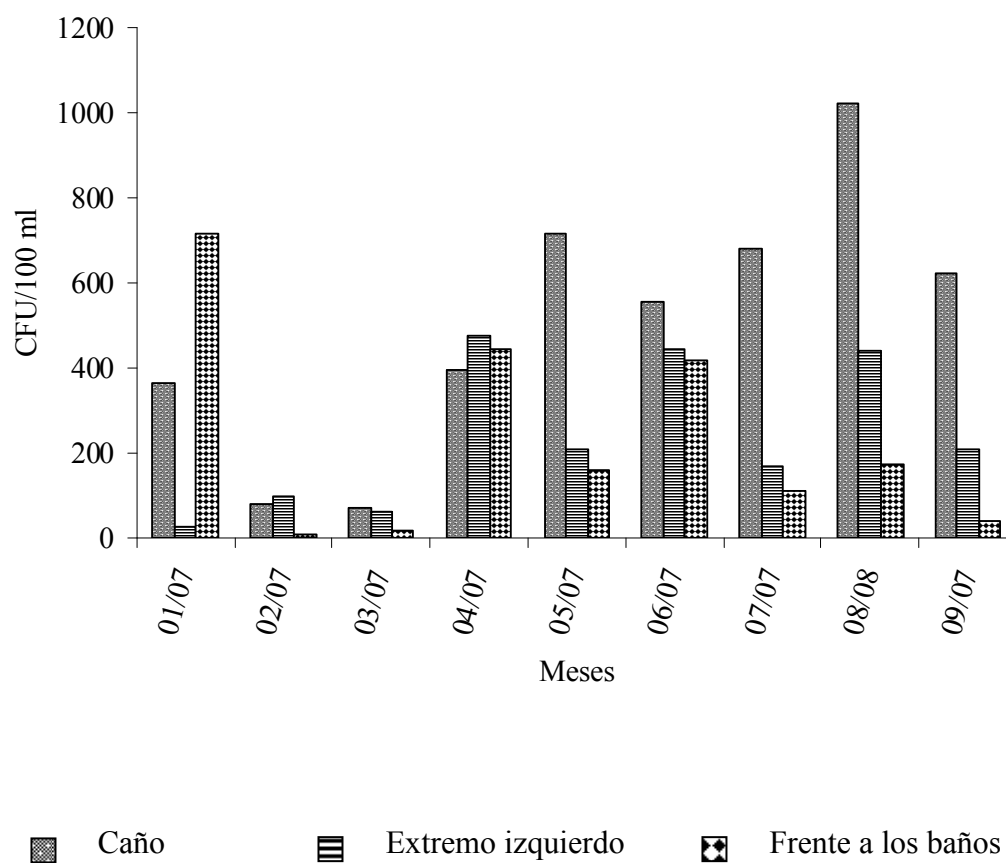


Figura 9. Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2009.



*Figura 10.* Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2006 agrupados en meses.



*Figura 11.* Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2007 agrupados en meses.

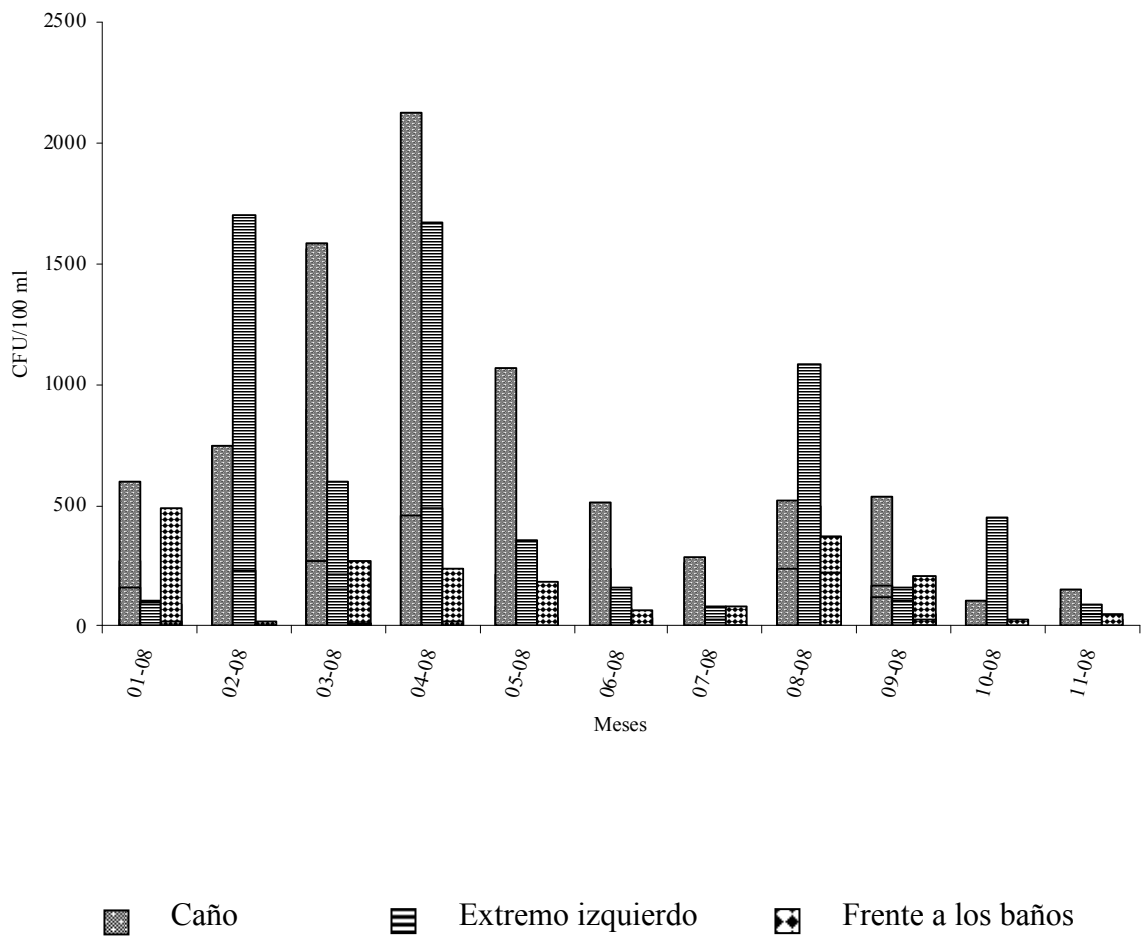
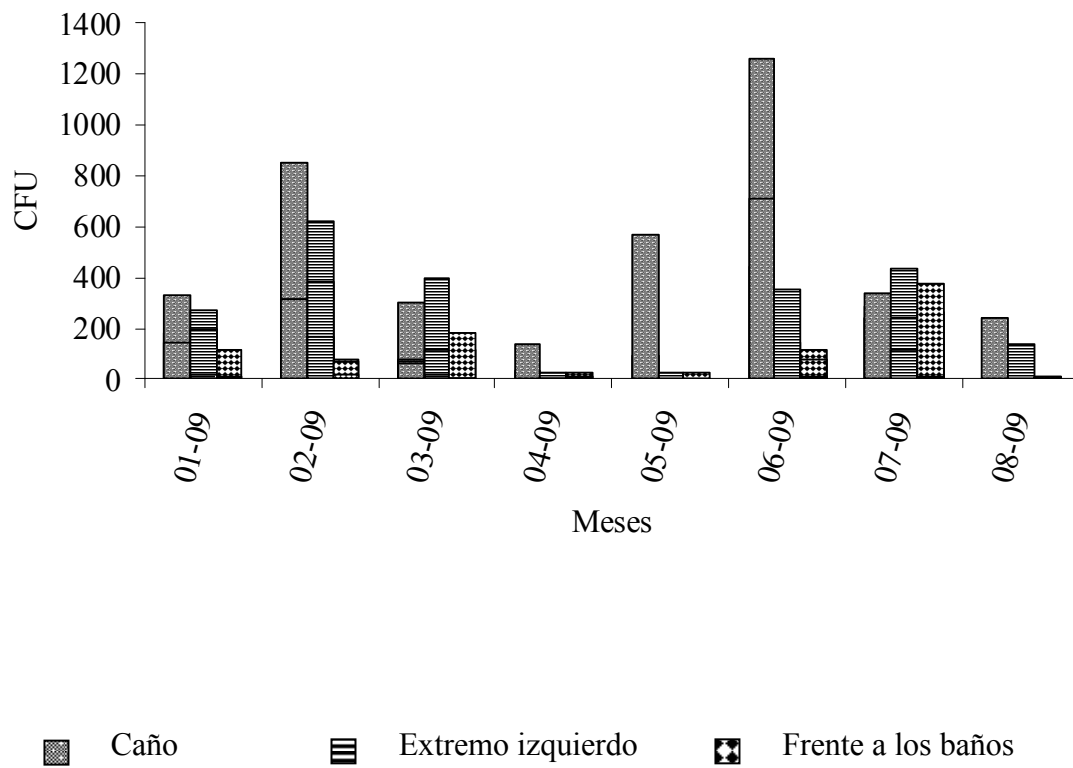
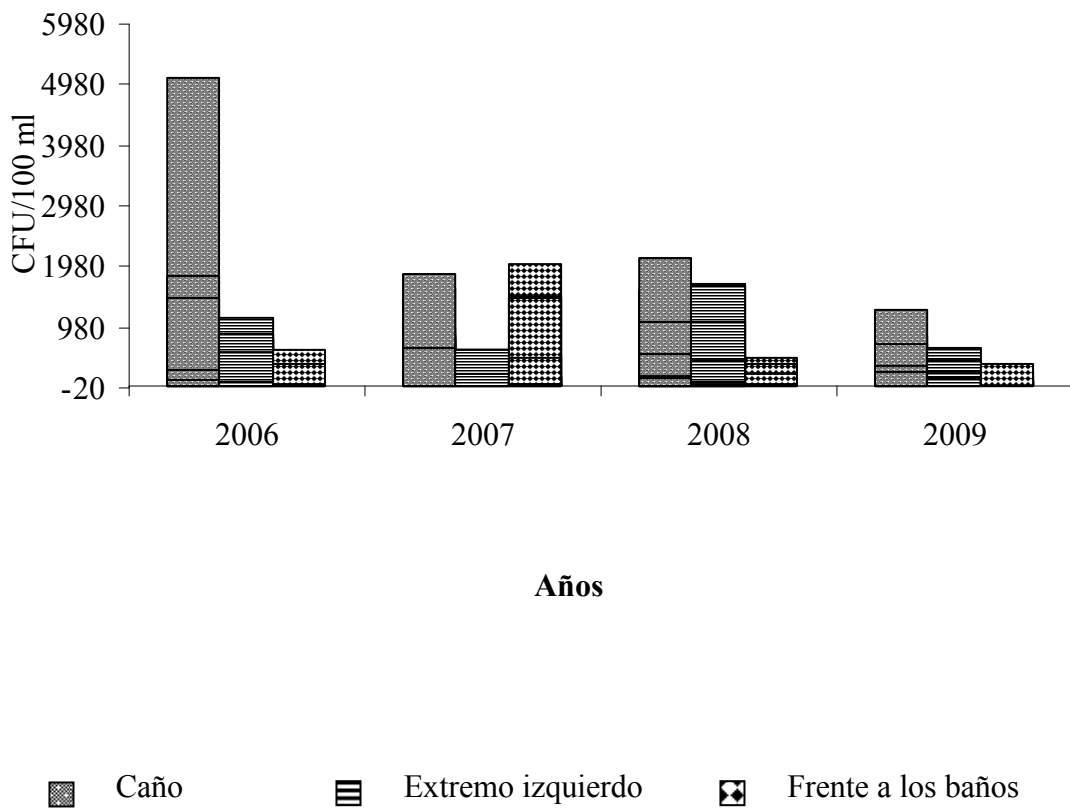


Figura 12. Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2008 agrupados en meses

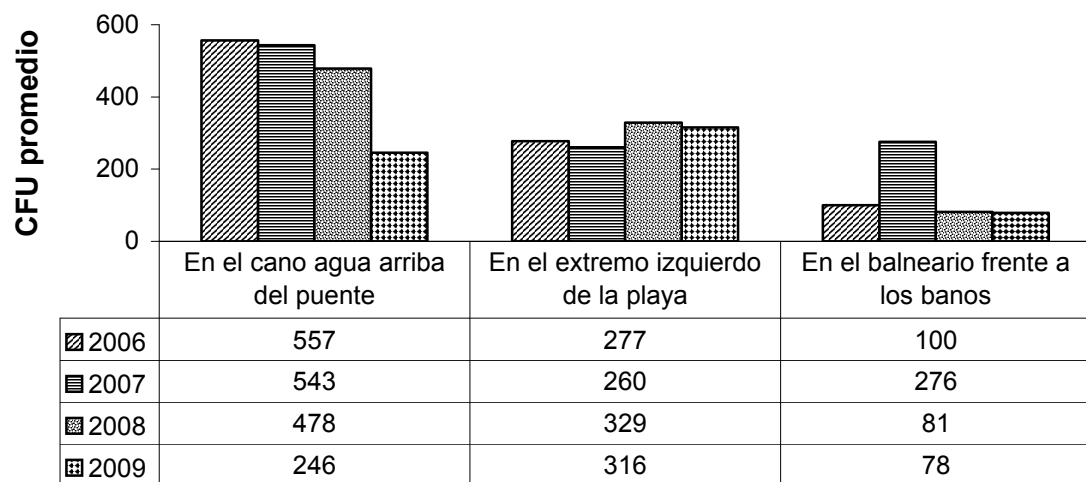


*Figura 13.* Distribución de los datos obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante el 2009 agrupados en meses.

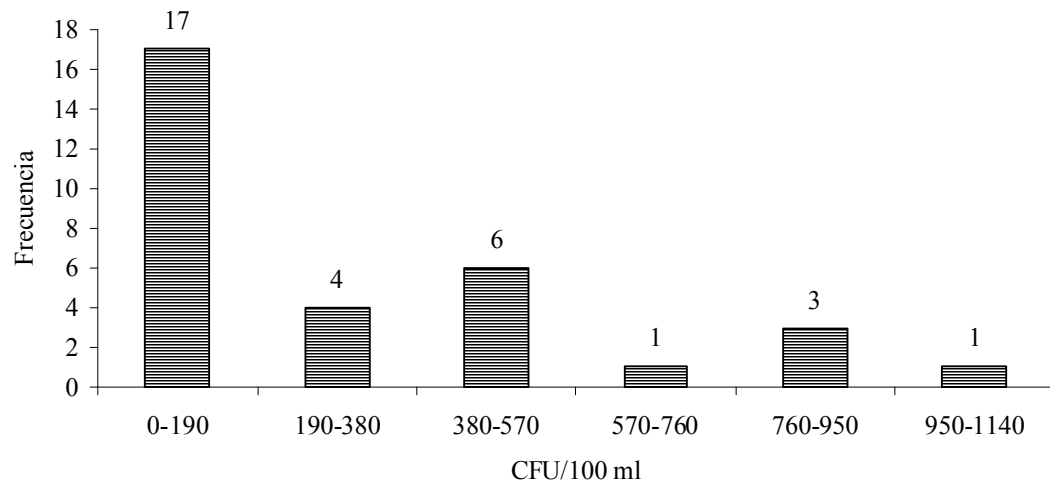




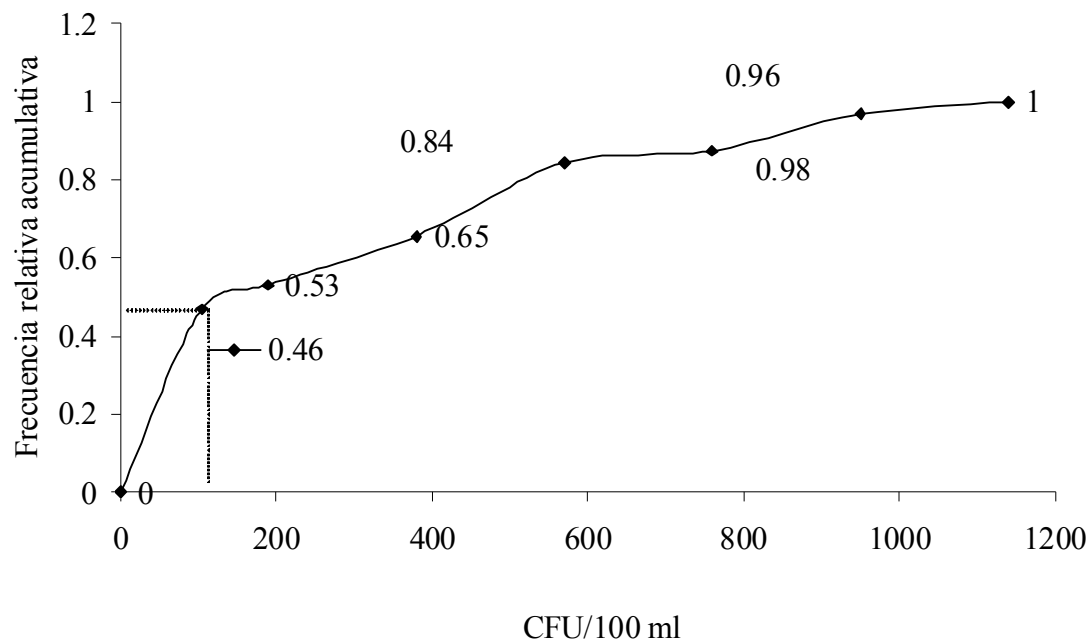
*Figura 14.* Distribución de los datos de CFU promedio por zona obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009 agrupados en meses.



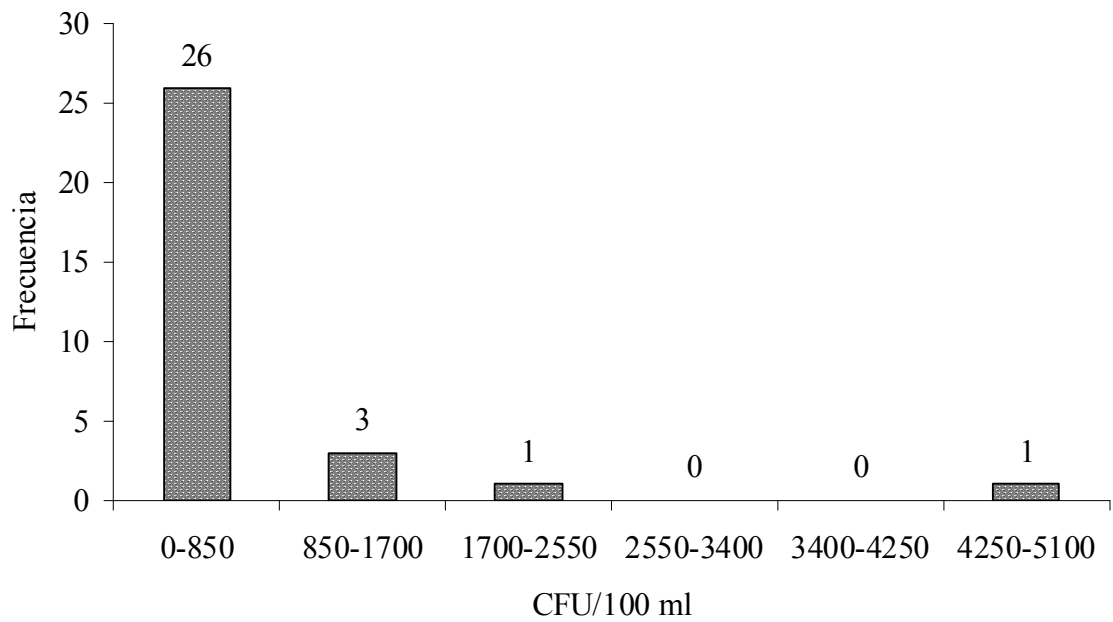
*Figura 15.* Distribución de los datos de CFU promedio obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009 agrupados en meses.



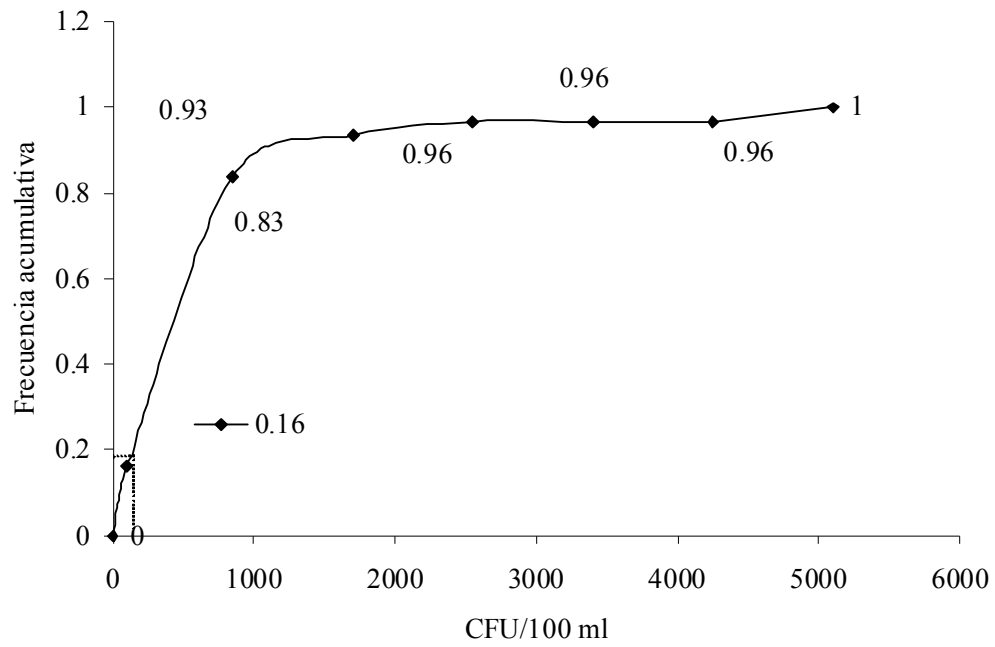
*Figura 16.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el extremo izquierdo del balneario durante el año 2006 dividido en seis clases.



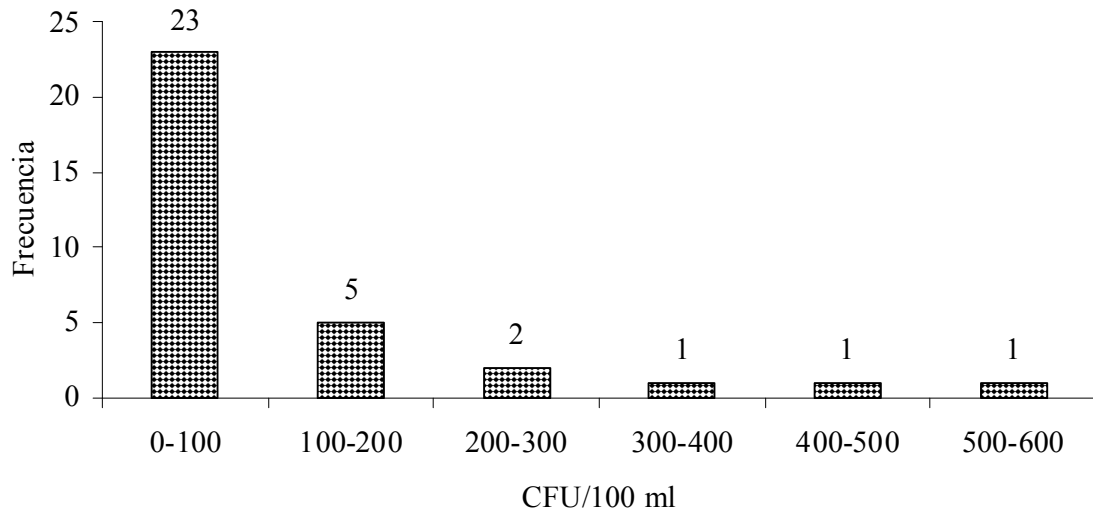
*Figura 17.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el extremo izquierdo del balneario durante el año 2006.



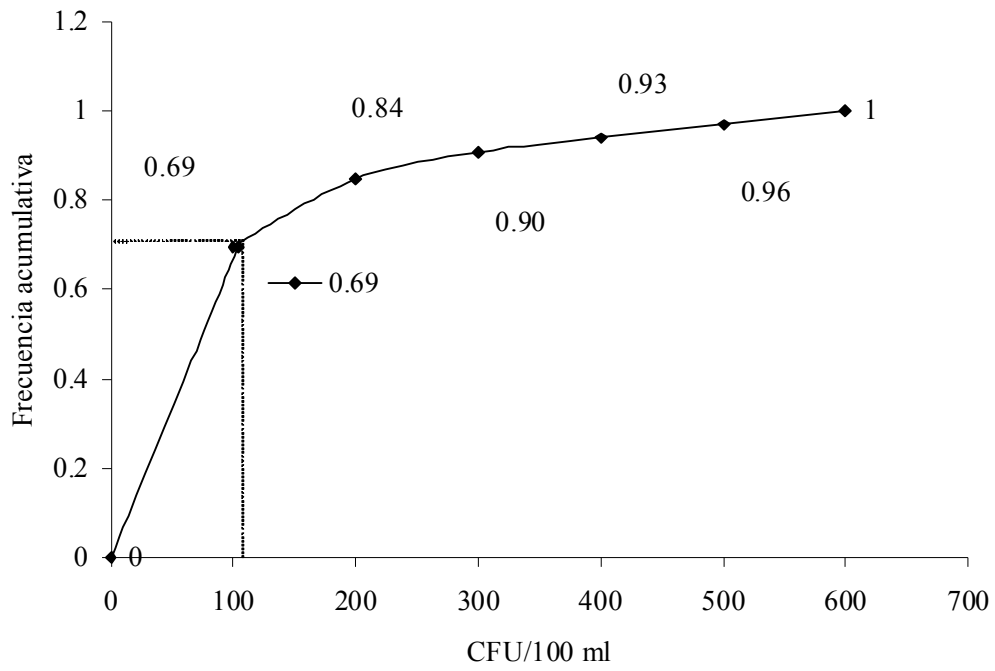
*Figura 18.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en caño aguas arriba del puente durante el 2006 dividido en seis clases.



*Figura 19.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el caño aguas arriba del puente durante el 2006.

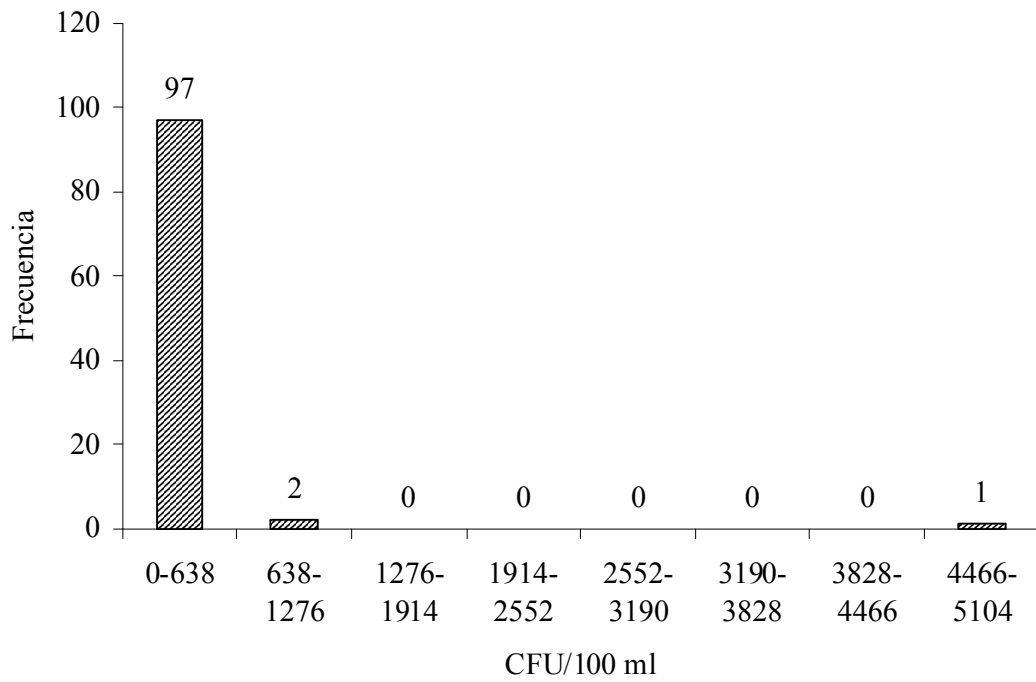


*Figura 20.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas frente a los baños durante el 2006 dividido en seis clases.

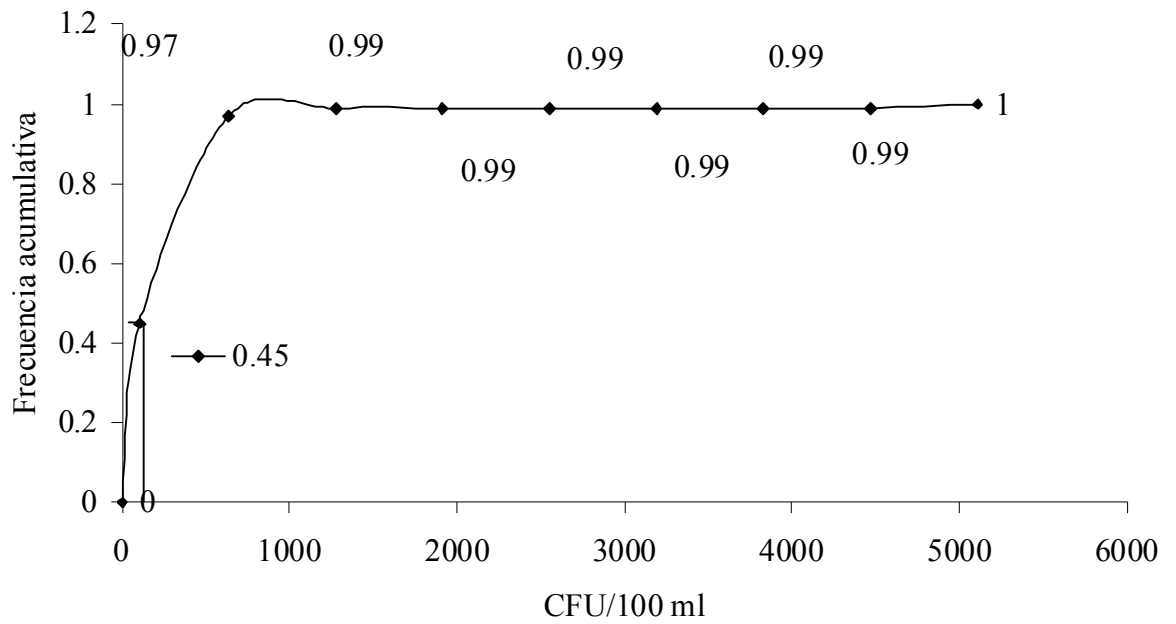


*Figura 21.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas frente a los baños durante el 2006.

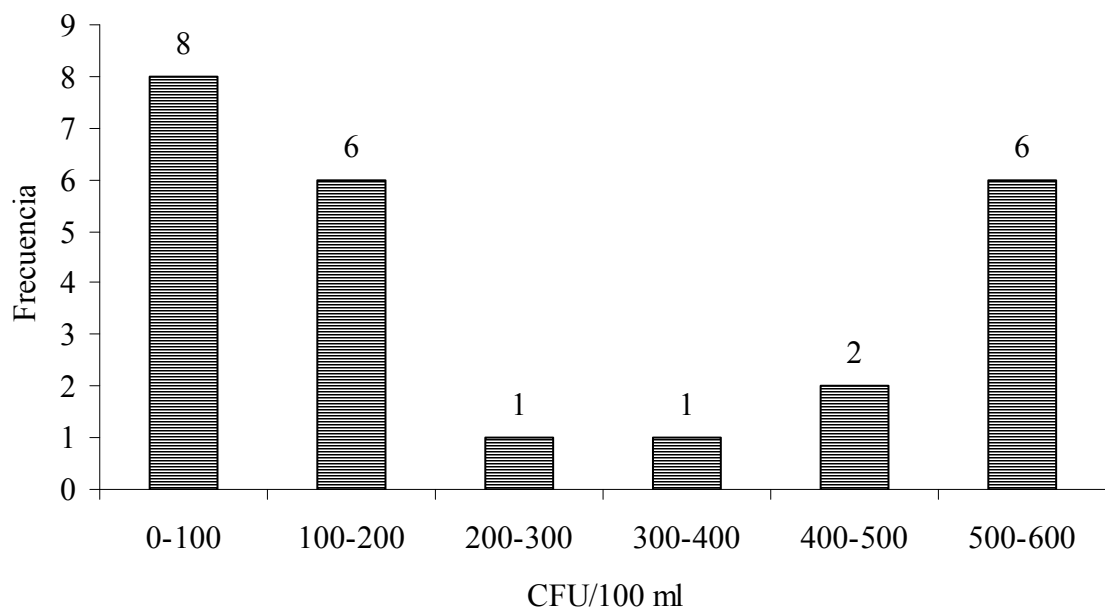




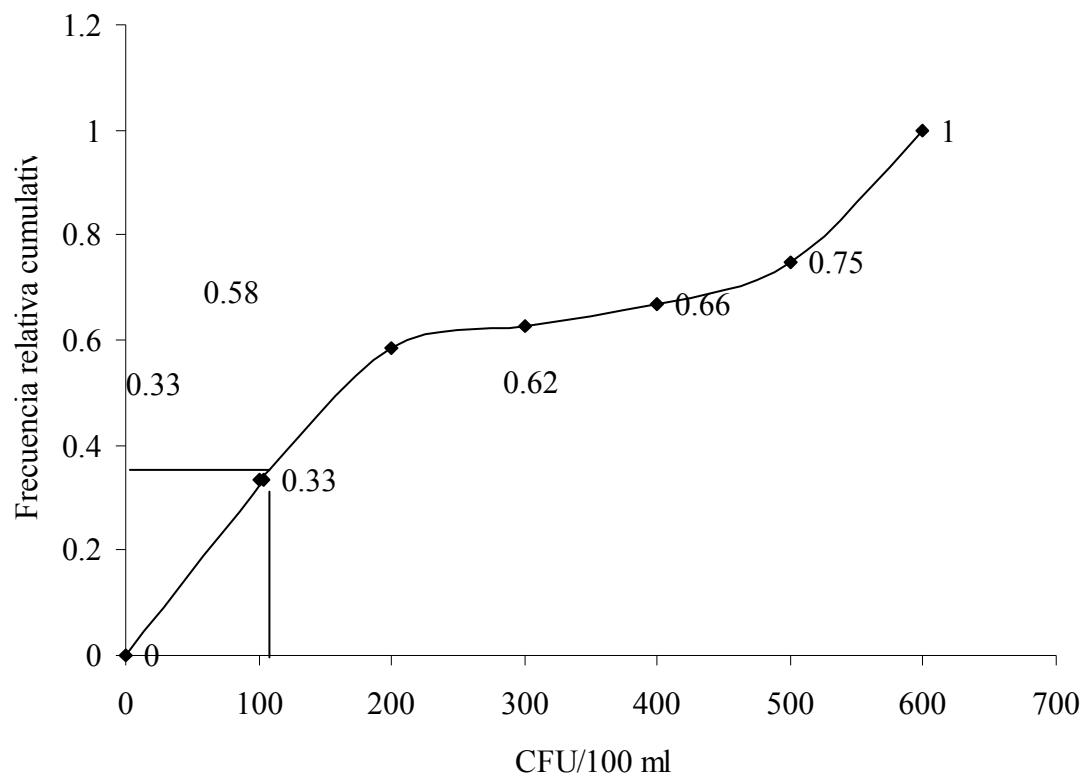
*Figura 22.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las zonas durante el 2006 dividido en ocho clases.



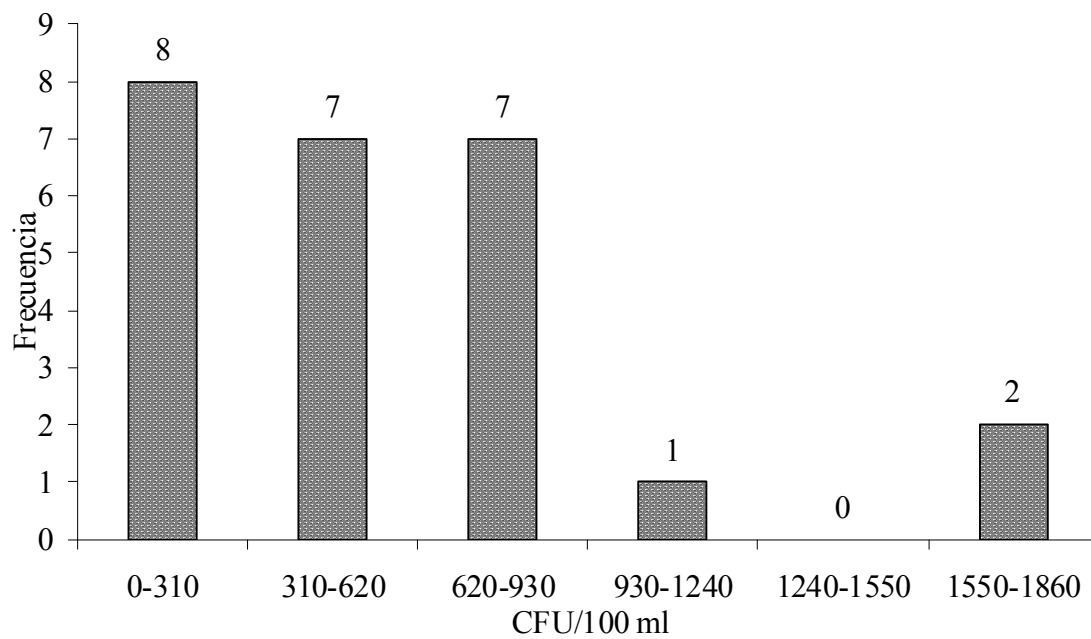
*Figura 23.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en todas las áreas durante el 2006.



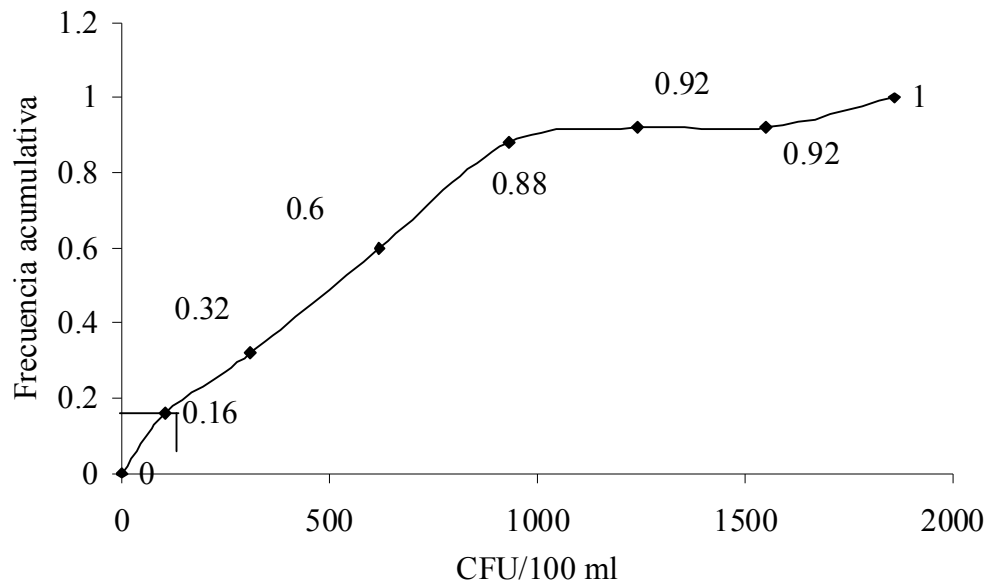
*Figura 24.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el extremo izquierdo del balneario durante el 2007 dividido en seis clases.



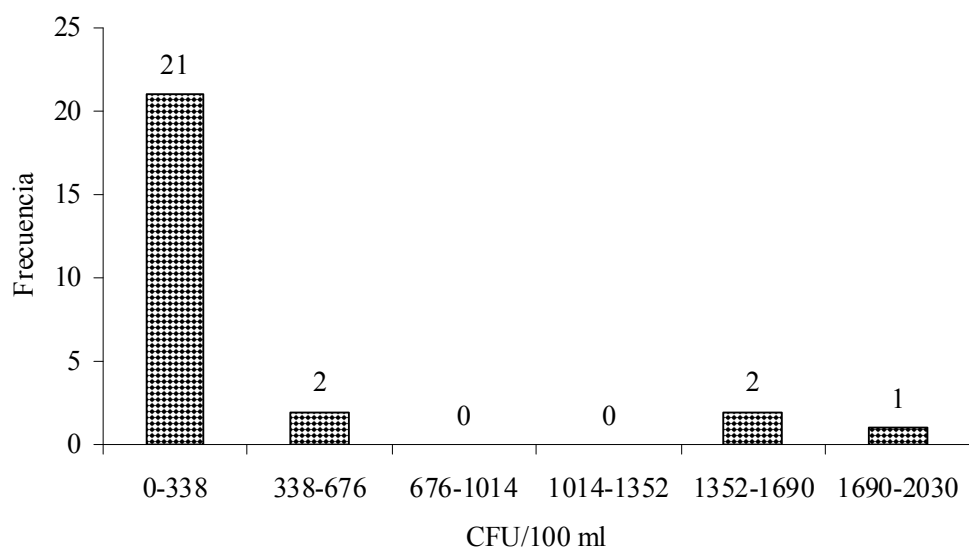
*Figura 25.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el extremo izquierdo del balneario durante el 2007.



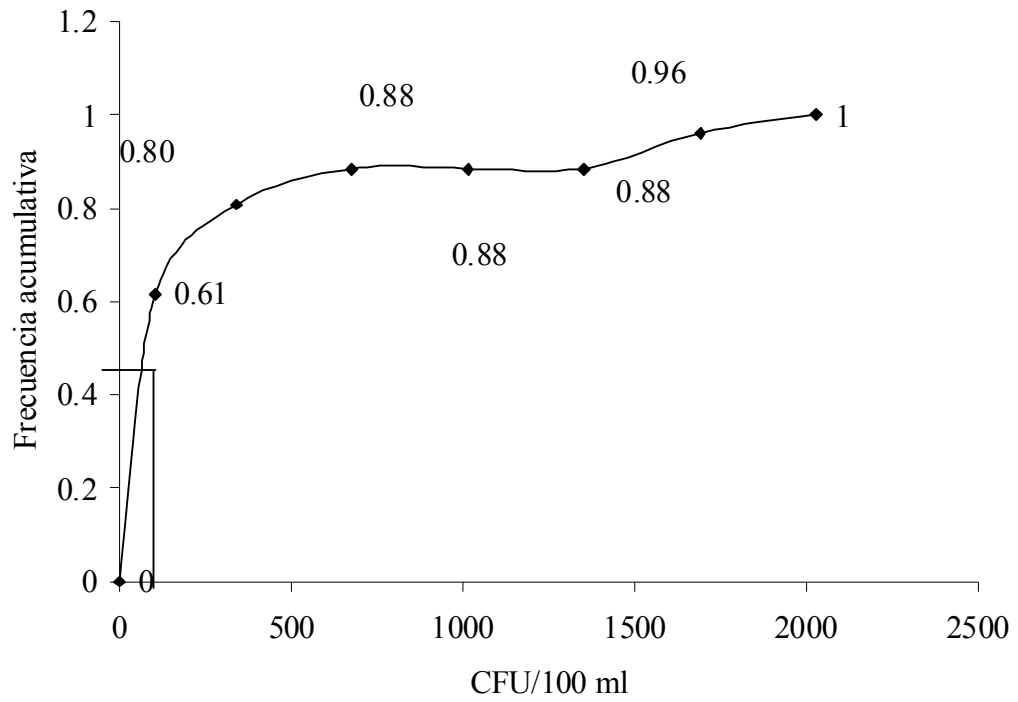
*Figura 26.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el caño aguas arriba del puente durante el 2007 dividido en seis clases.



*Figura 27.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en caño aguas arriba del puente durante el 2007.

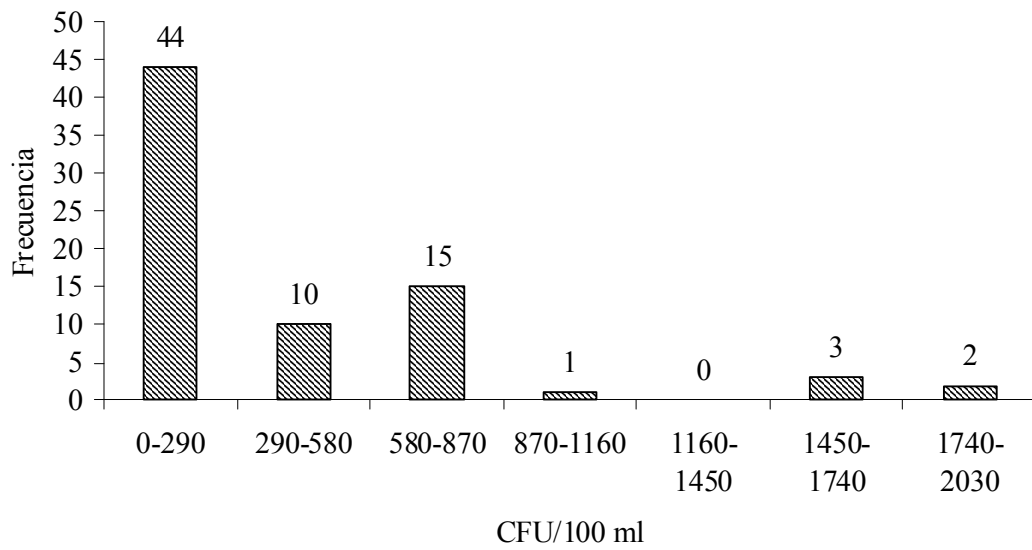


*Figura 28.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas frente a los baños durante el año 2007 dividido en seis clases.

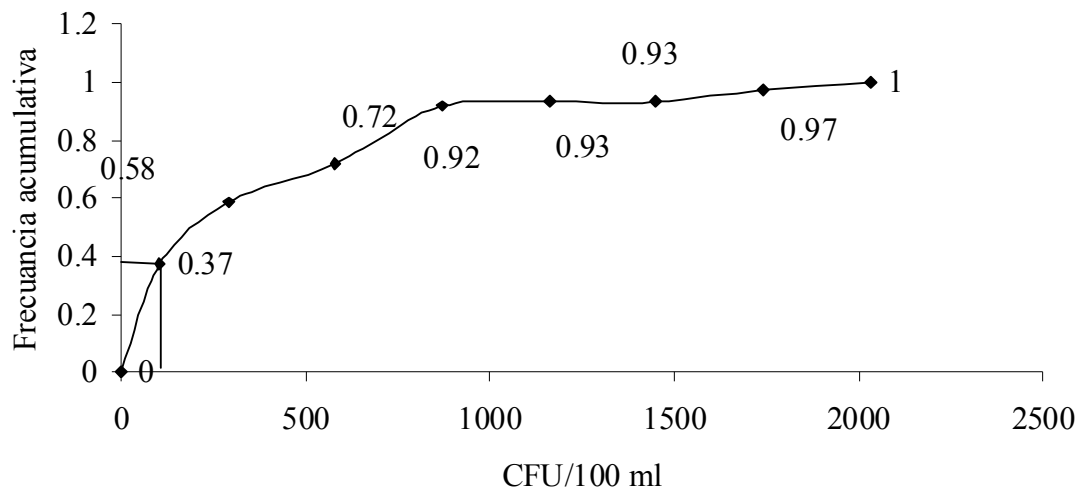


*Figura 29.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas frente a los baños durante el 2007.

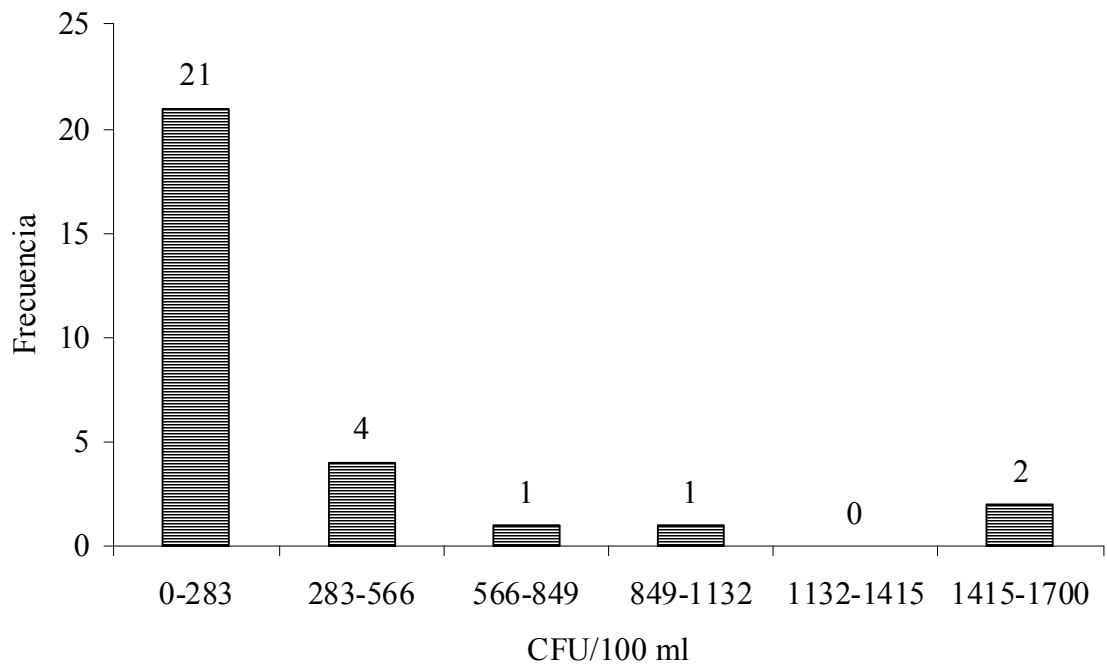




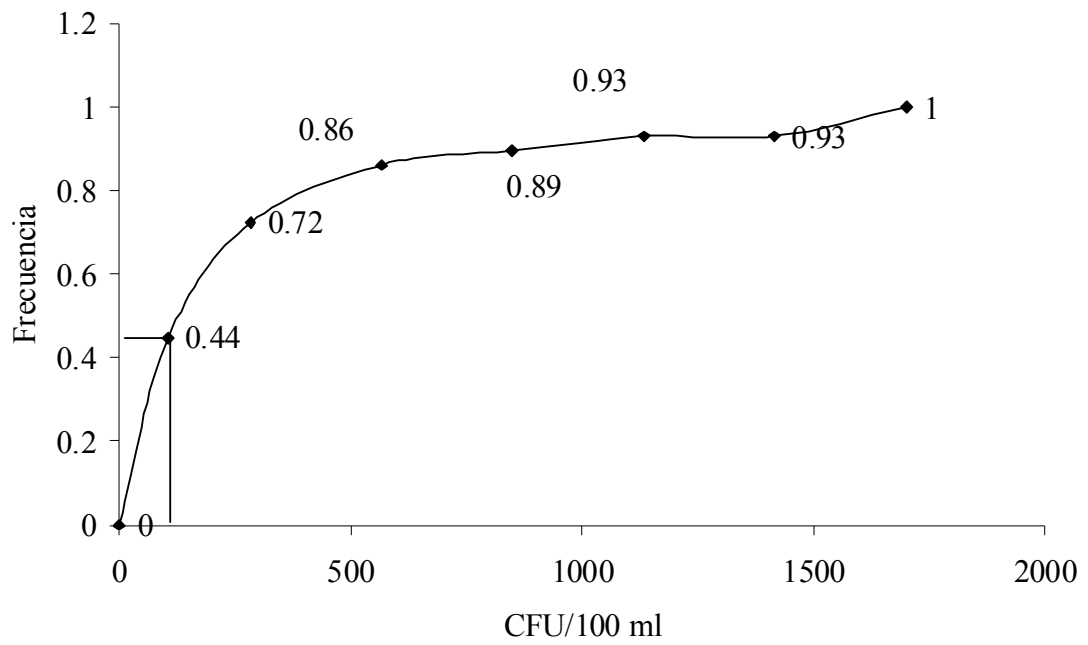
*Figura 30.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las zonas durante el año 2007 dividido en ocho clases.



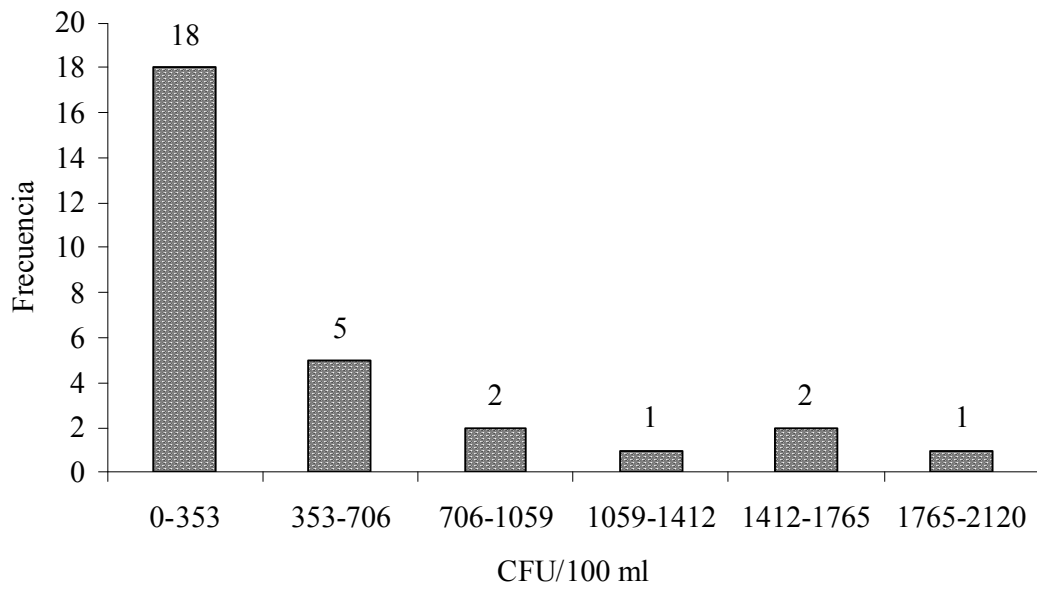
*Figura 31.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en todas las áreas durante el 2007.



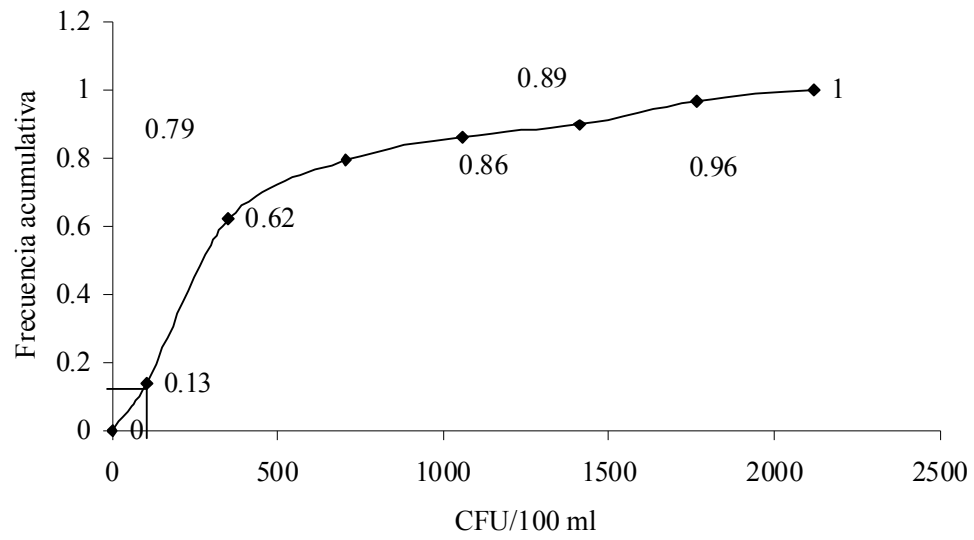
*Figura 32.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el extremo izquierdo durante el año 2008 dividido en seis clases.



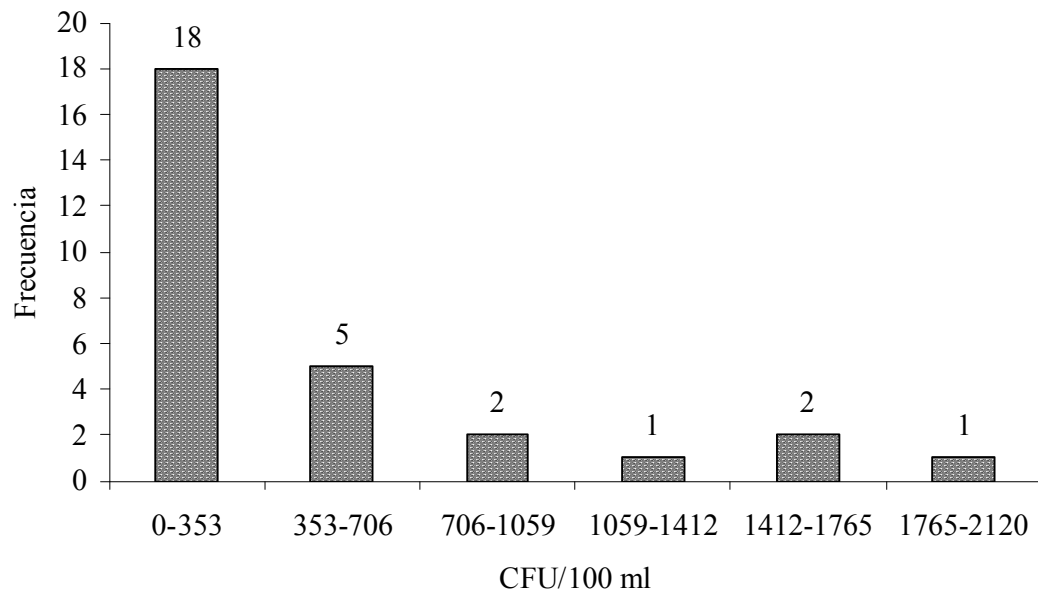
*Figura 33.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el extremo izquierdo durante el 2008.



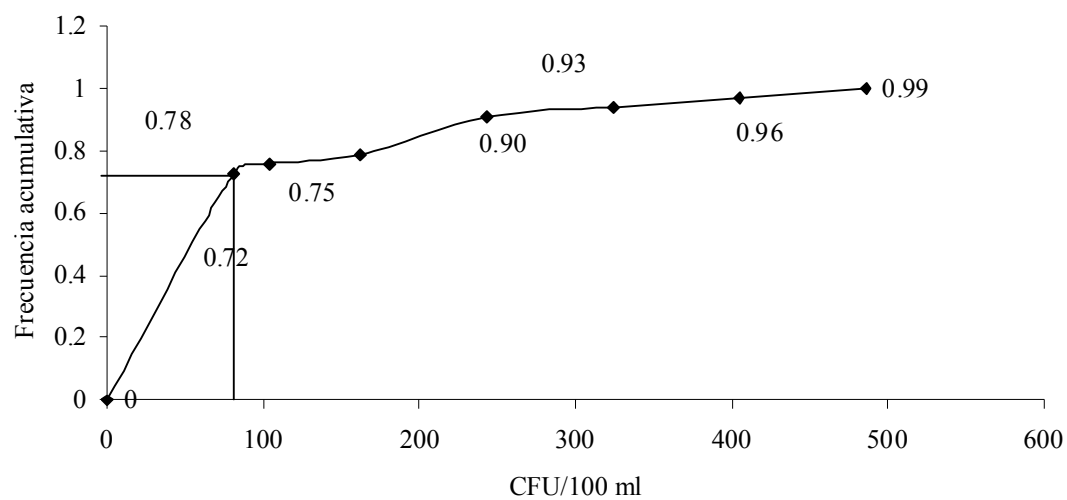
*Figura 34.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el caño aguas arriba del puente durante el 2008 dividido en seis clases.



*Figura 35.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en caño aguas arriba del puente durante el 2008.

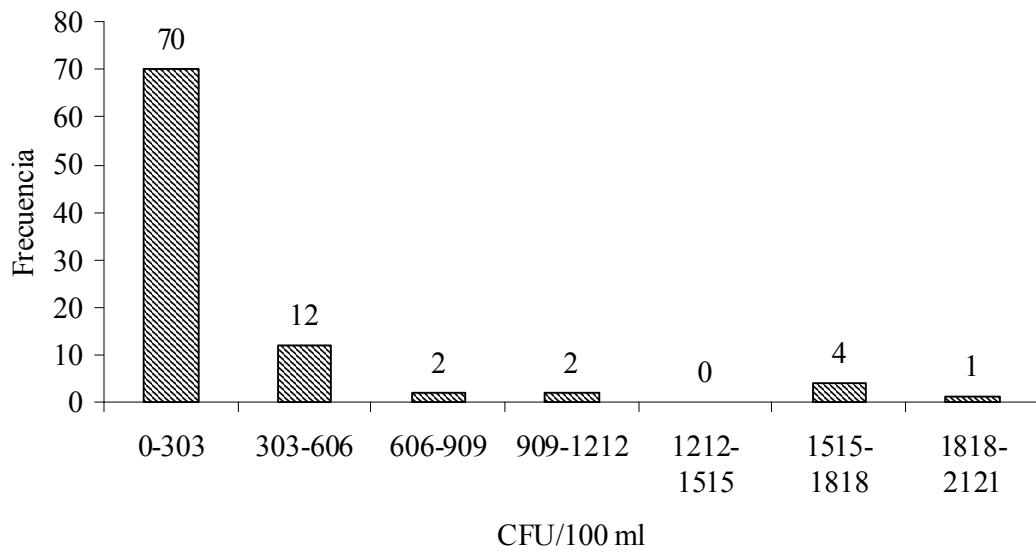


*Figura 36.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas frente a los baños durante el 2008 dividido en seis clases.

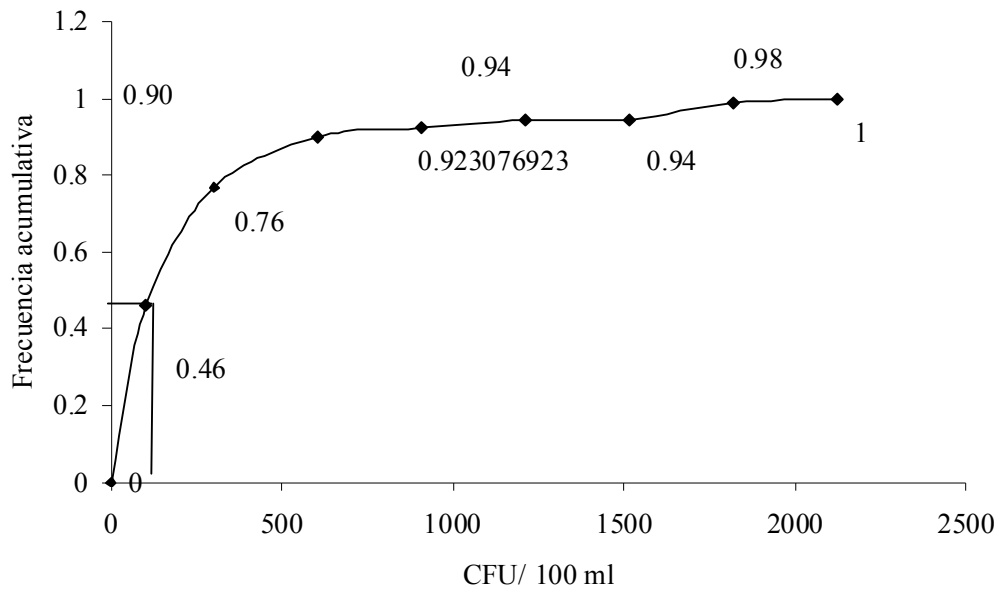


*Figura 37.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas frente a los baños durante el 2008.

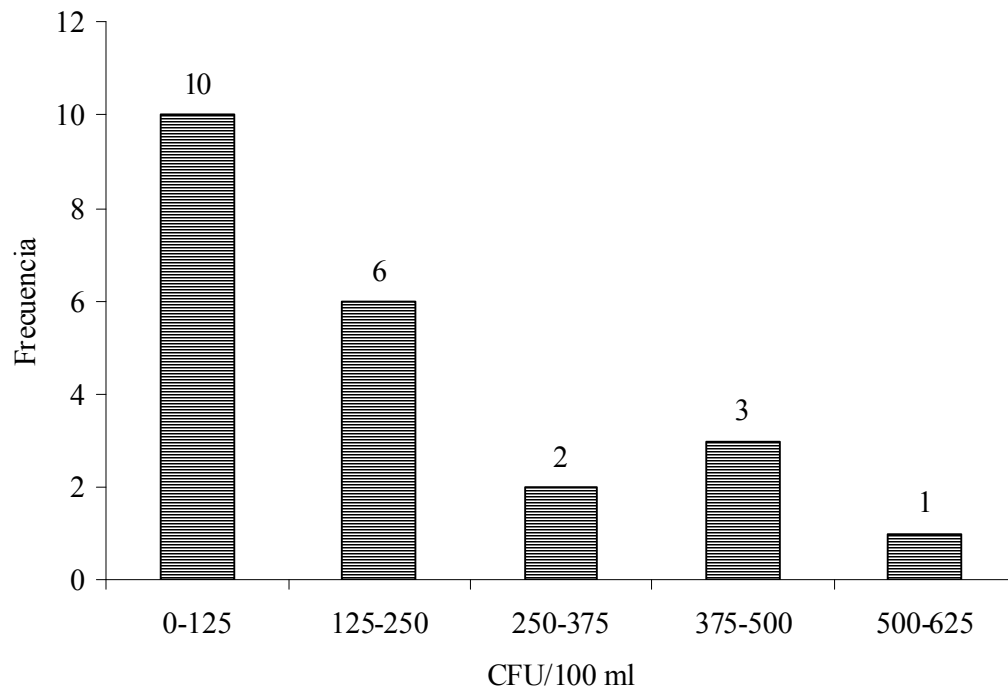




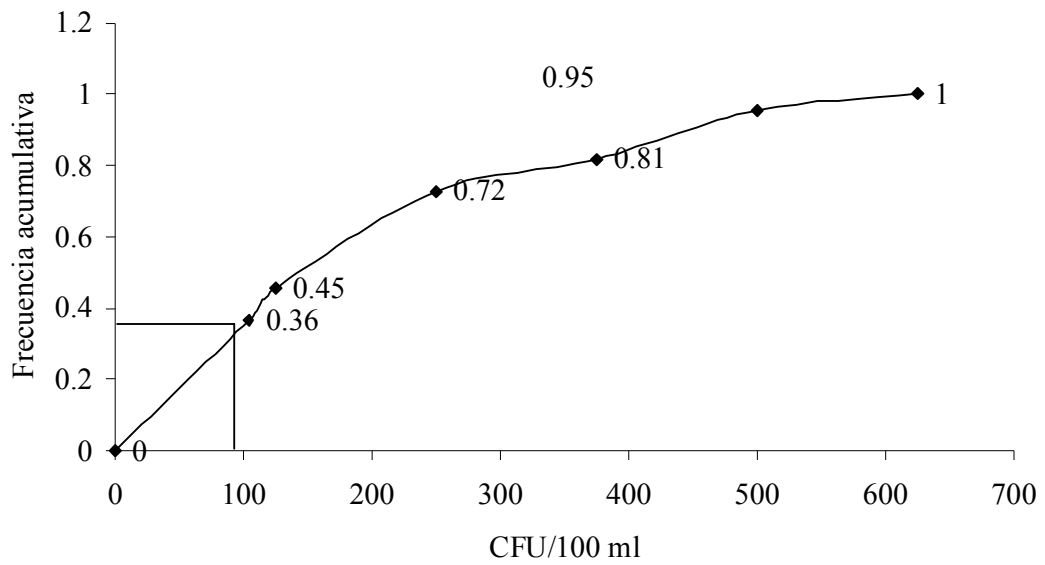
*Figura 38.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las zonas durante el 2008 dividido en ocho clases.



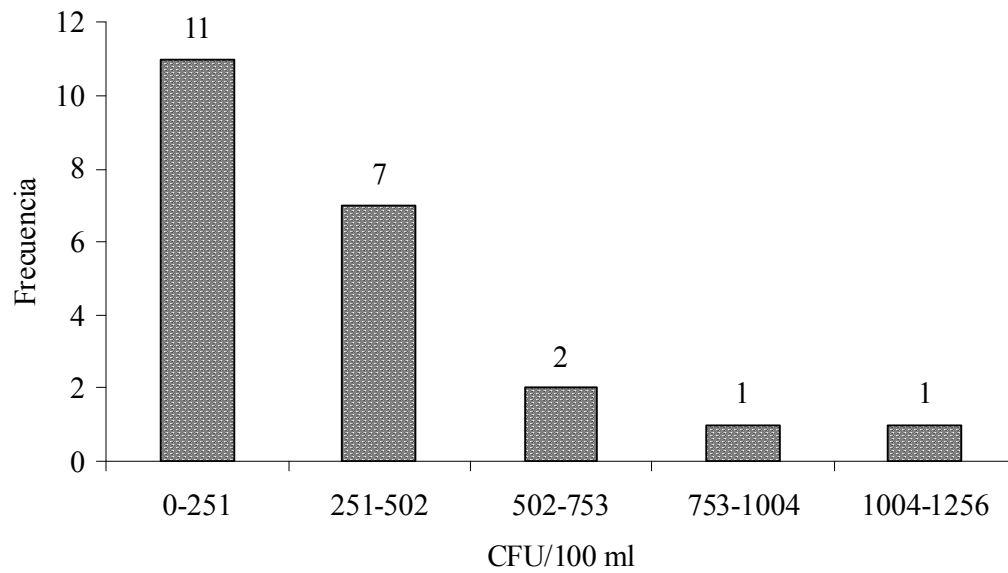
*Figura 39* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en todas las áreas durante el 2008.



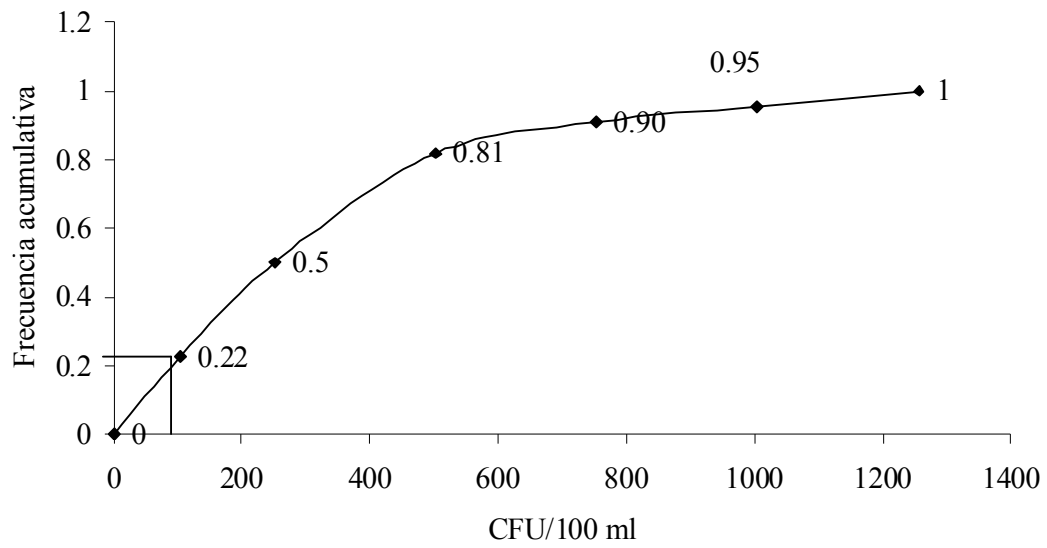
*Figura 40.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en extremo izquierdo durante el 2009 dividido en seis clases.



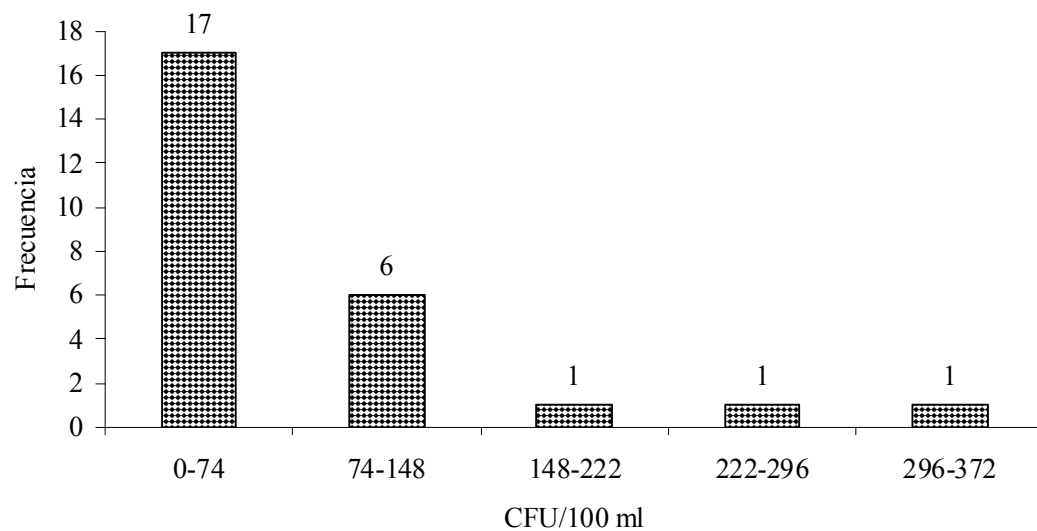
*Figura 41.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el extremo izquierdo durante el 2009.



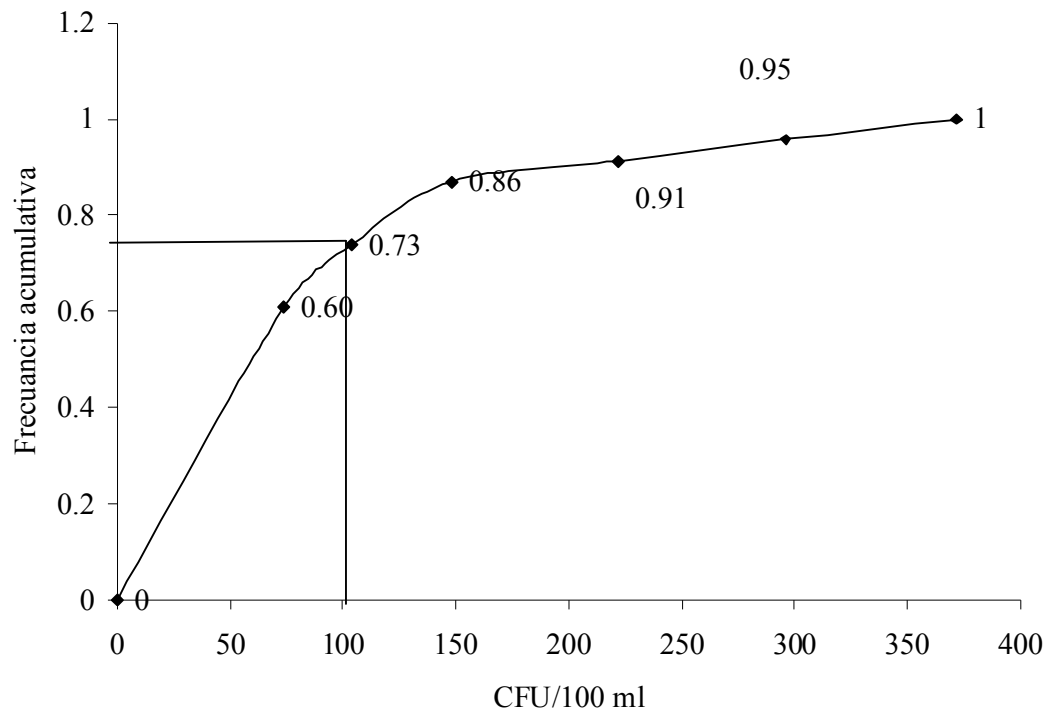
*Figura 42.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el caño aguas arriba del puente durante el 2009 dividido en cinco clases



*Figura 43.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas en el caño aguas arriba del puente durante el 2009.

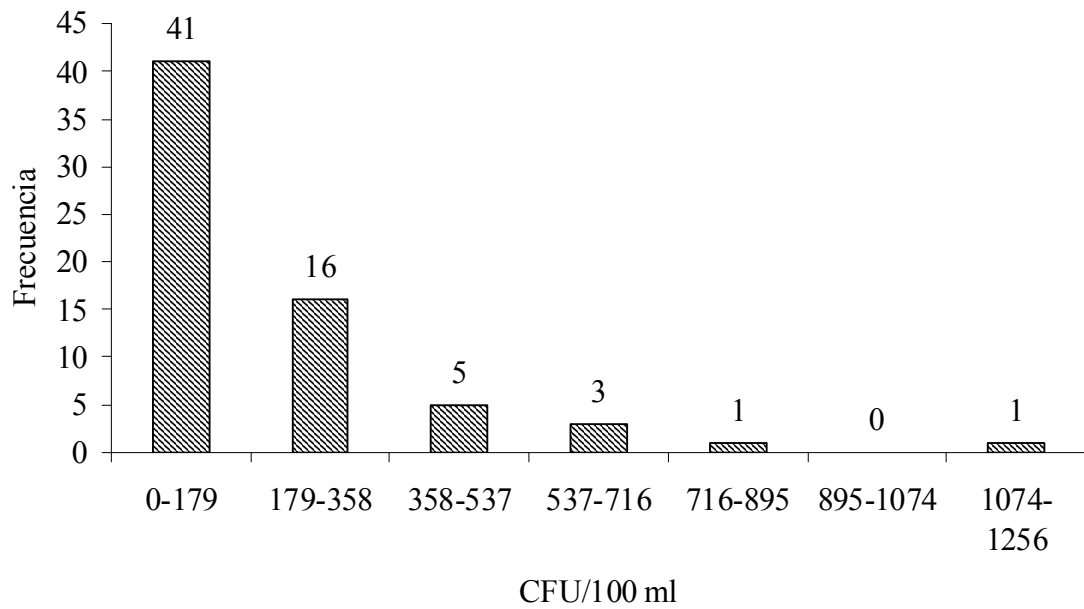


*Figura 44.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas frente a los baños durante el 2009 dividido en cinco clases.

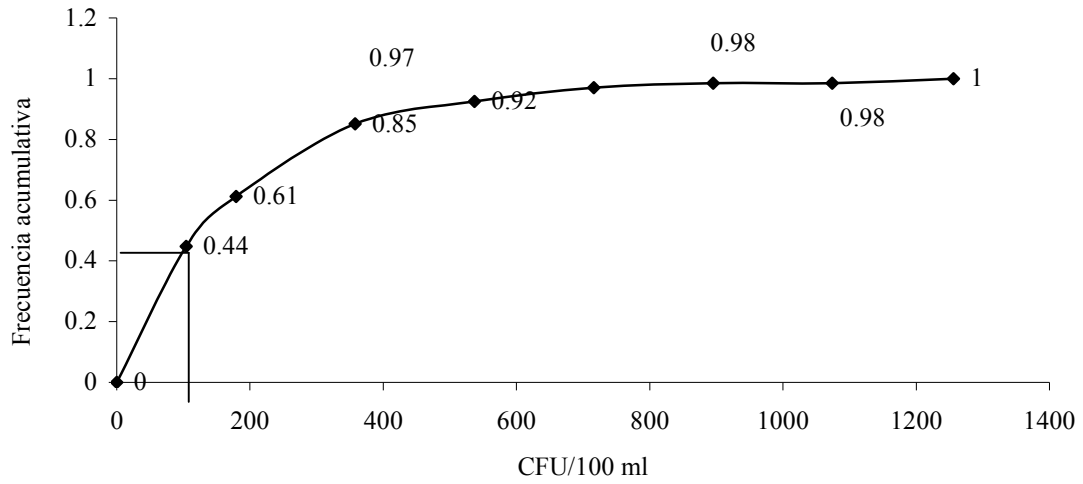


*Figura 45.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas frente a los baños durante el 2009.

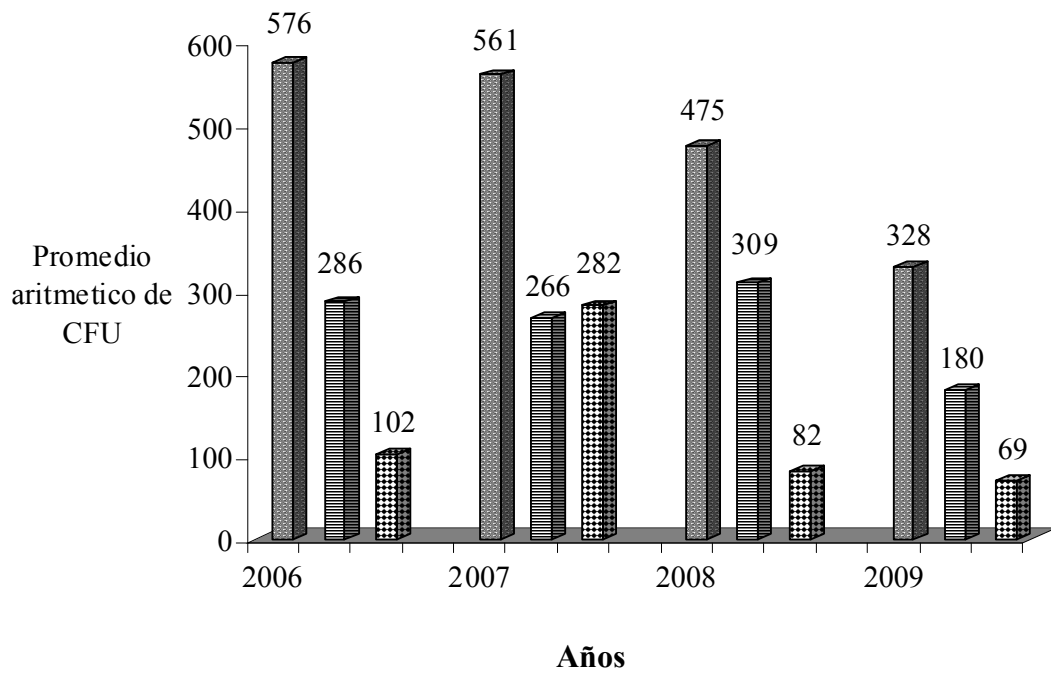




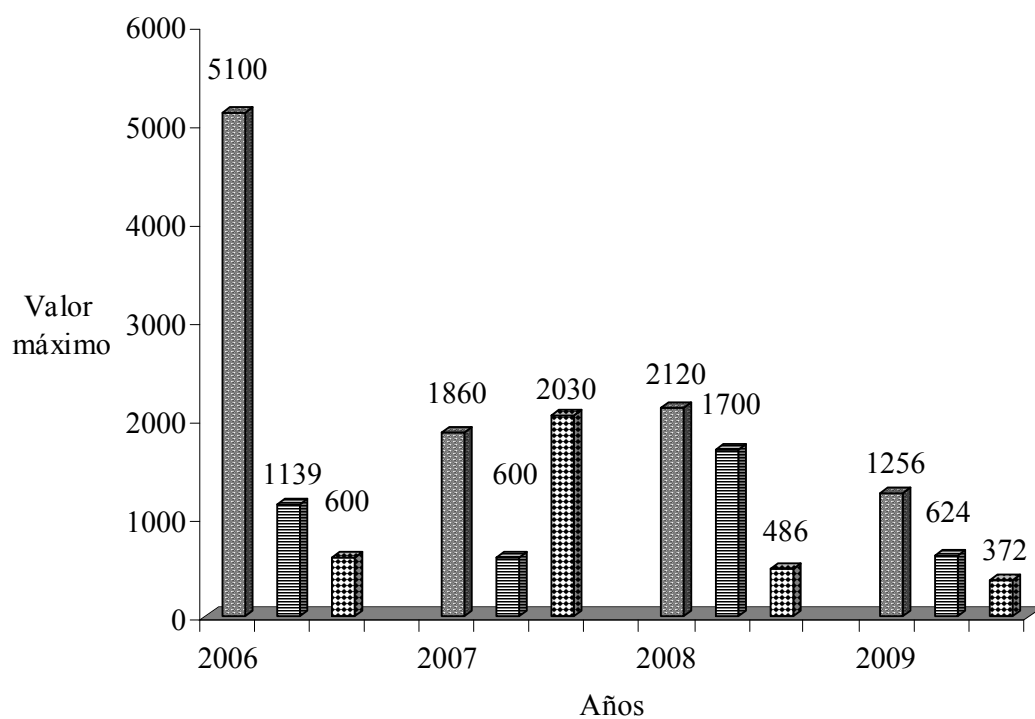
*Figura 46.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las áreas durante el 2009 dividido en siete clases.



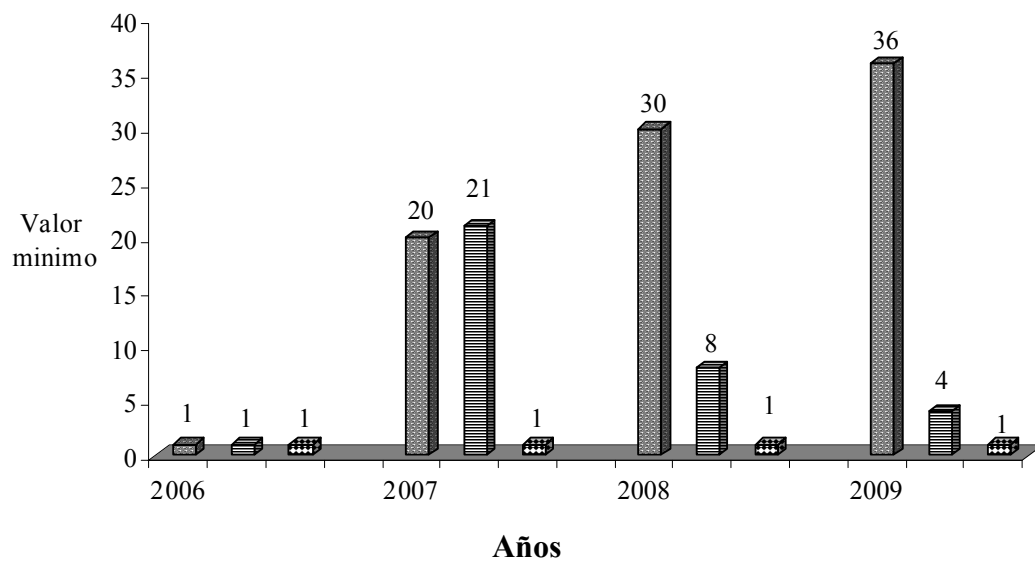
*Figura 47.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las áreas durante el 2009.



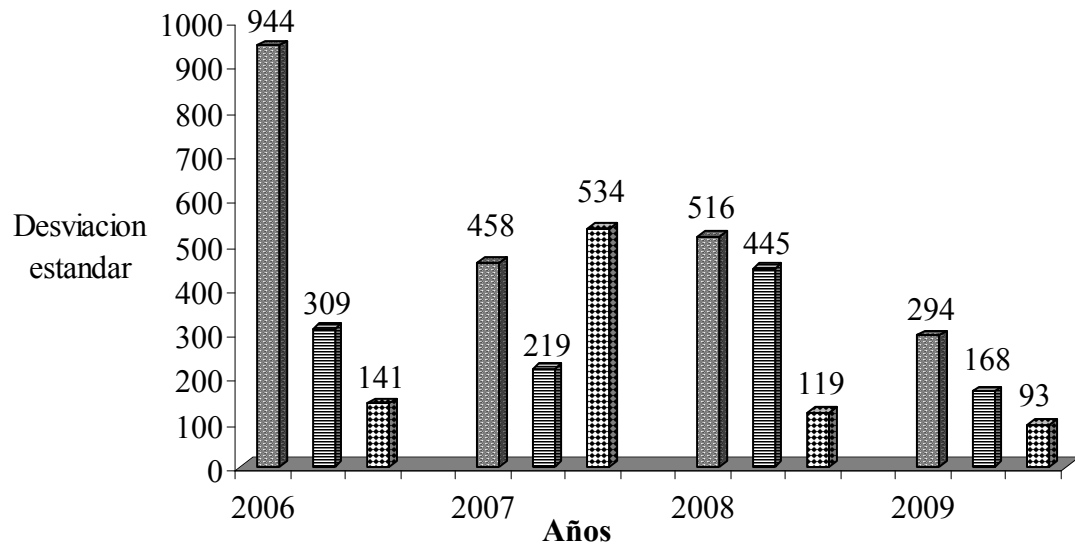
*Figura 48.* Comparación de los datos estadísticos de promedio de CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las áreas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.



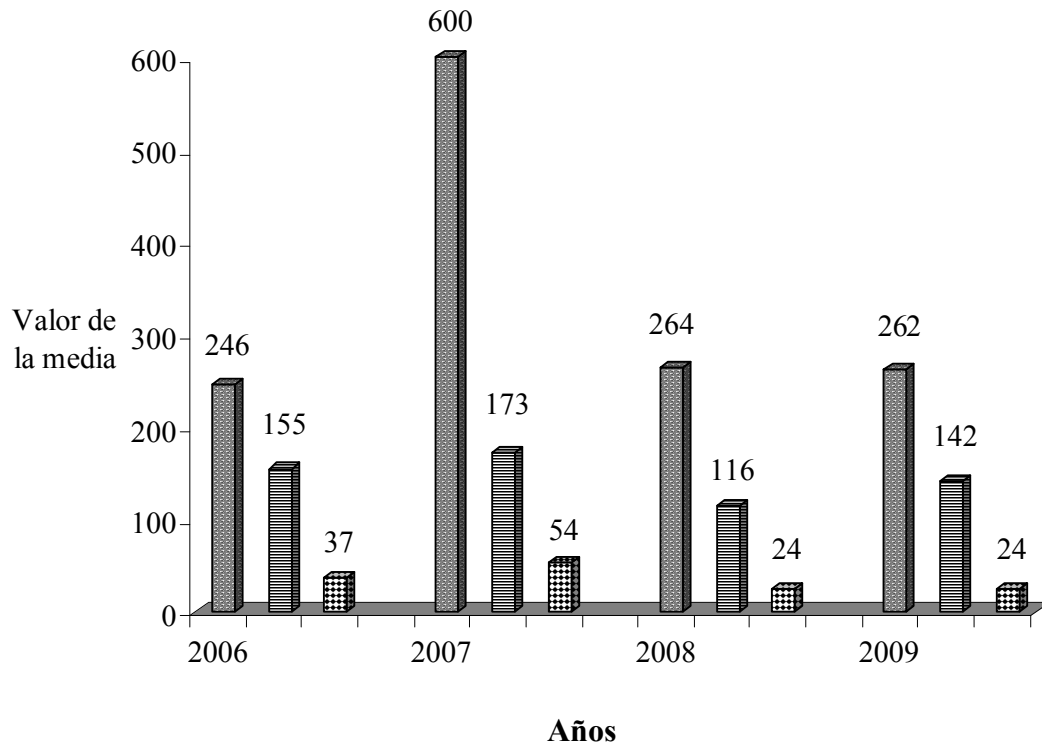
*Figura 49.* Comparación de los datos estadísticos de valores máximos de CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las áreas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.



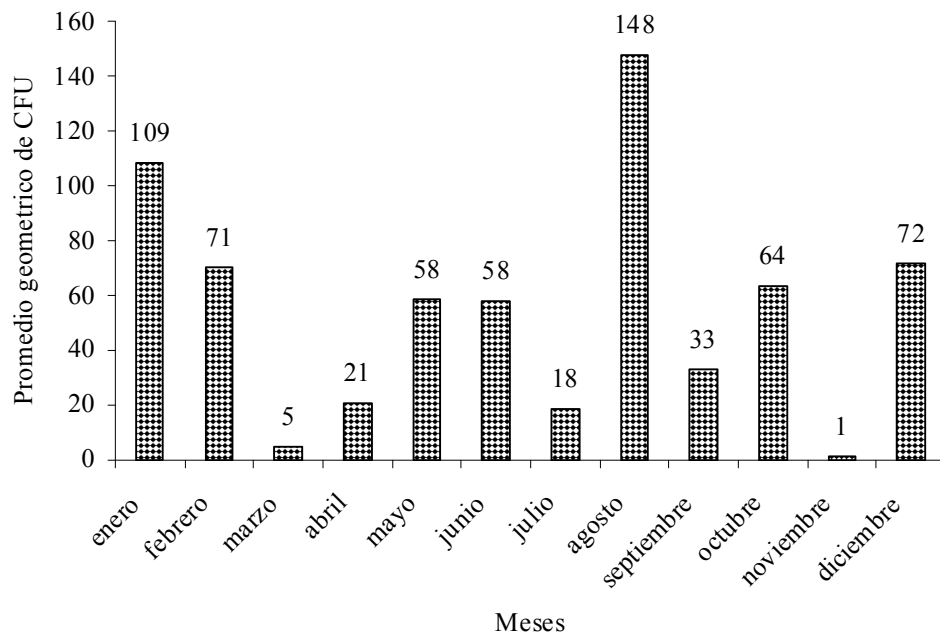
*Figura 50.* Comparación de los datos estadísticos de los valores mínimos CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las áreas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.



*Figura 51.* Comparación de los datos estadísticos de la desviación estándar de CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las áreas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.

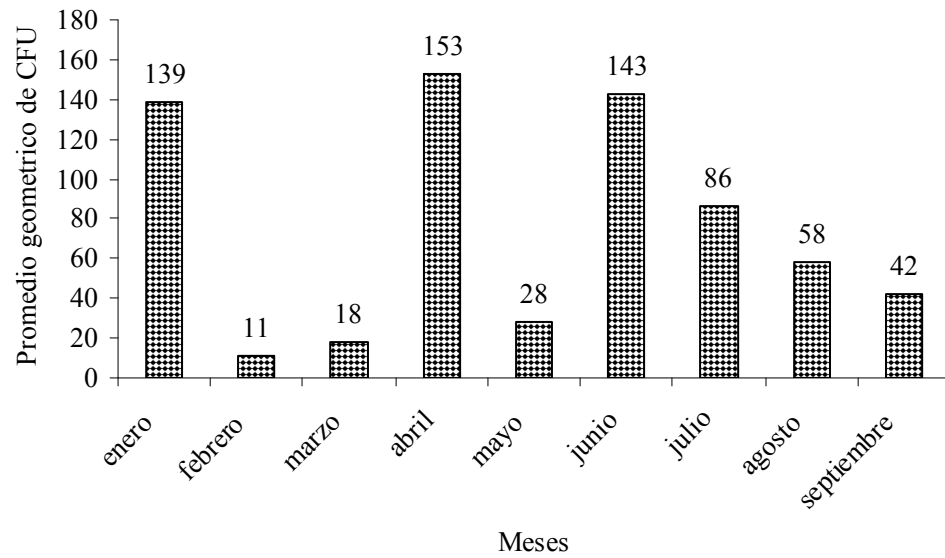


*Figura 52.* Comparación de los datos estadísticos de la media CFU en cada área de muestreo (caño aguas arriba del puente, extremo izquierdo, frente a los baños) utilizando los resultados de CFU obtenidos de los muestreos realizados por la JCA en el balneario de Patillas de todas las áreas en los años 2006, 2007, 2008 y 2009.

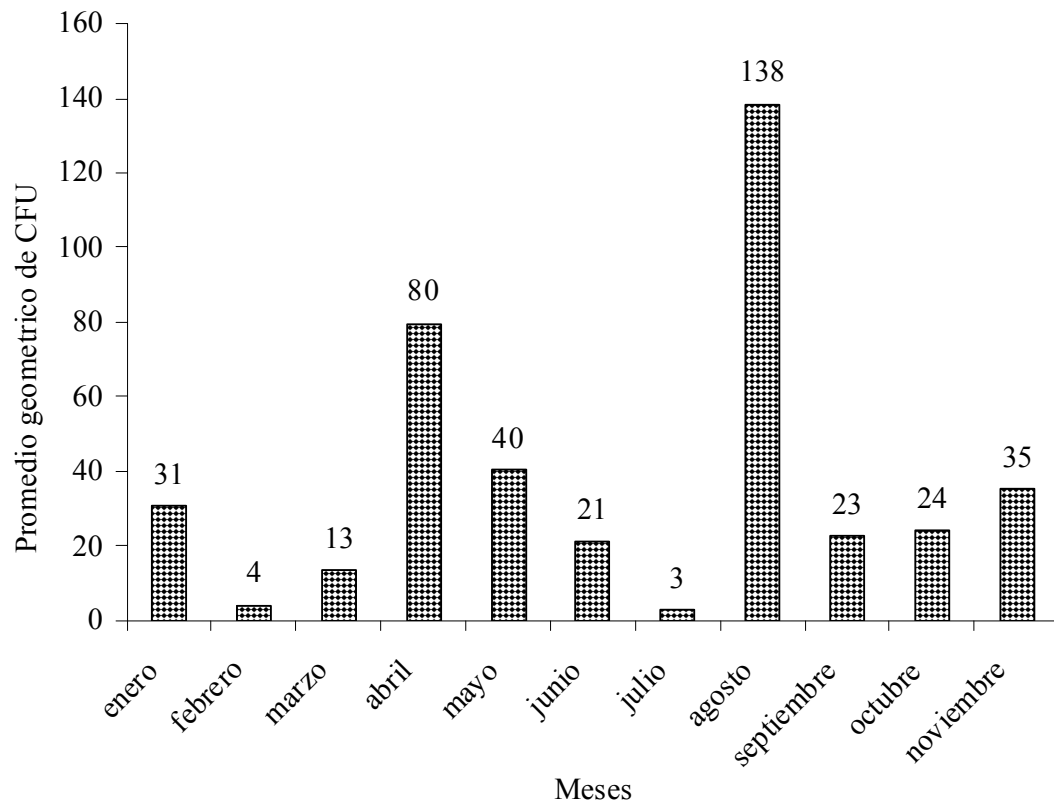


*Figura 53.* Valores del promedio geometrico de CFU obtenido de los valores de la JCA en el 2006 en el balneario de Patillas.

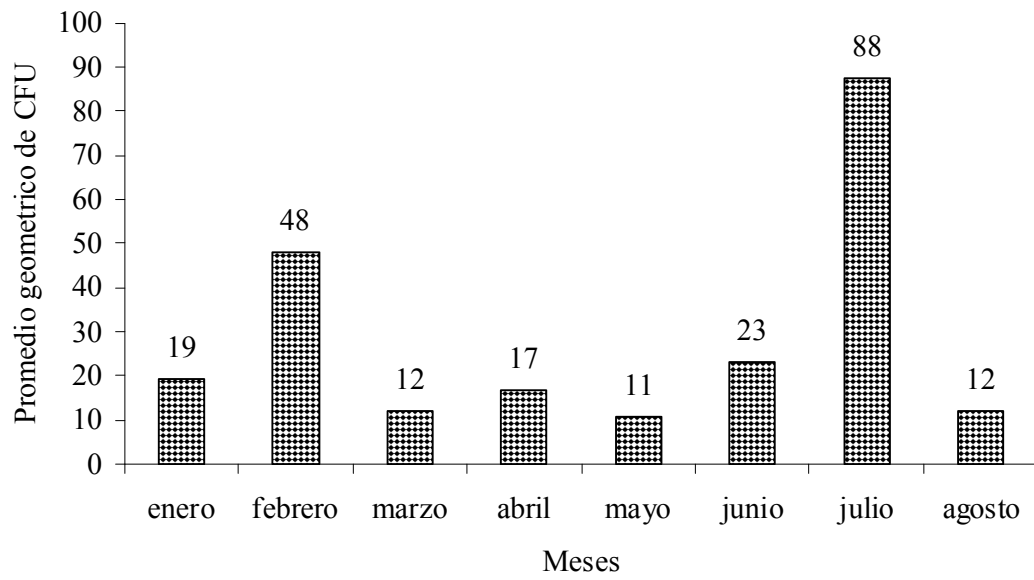




*Figura 54.* Valores del promedio geométrico de CFU obtenido de los valores de la JCA en el 2007 en el balneario de Patillas.



*Figura 55.* Valores del promedio geométrico de CFU obtenido de los valores de la JCA en el 2008 en el balneario de Patillas.



*Figura 56.* Valores del promedio geométrico de CFU obtenido de los valores de la JCA en el 2009 en el balneario de Patillas.

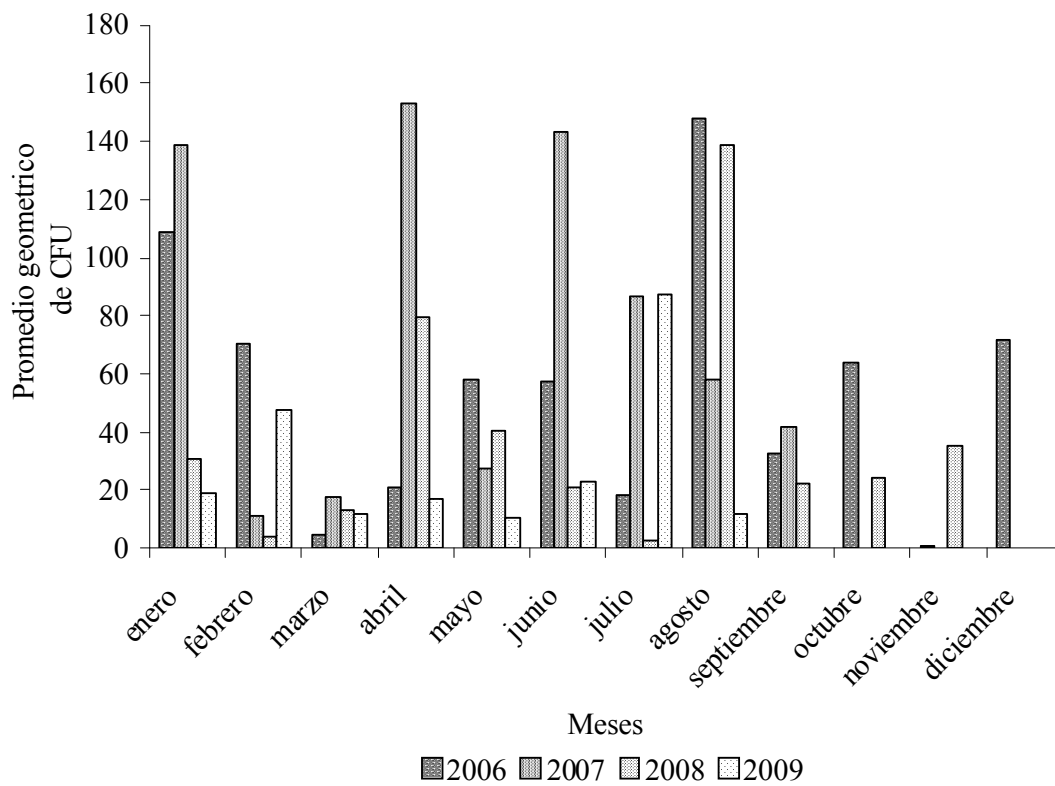
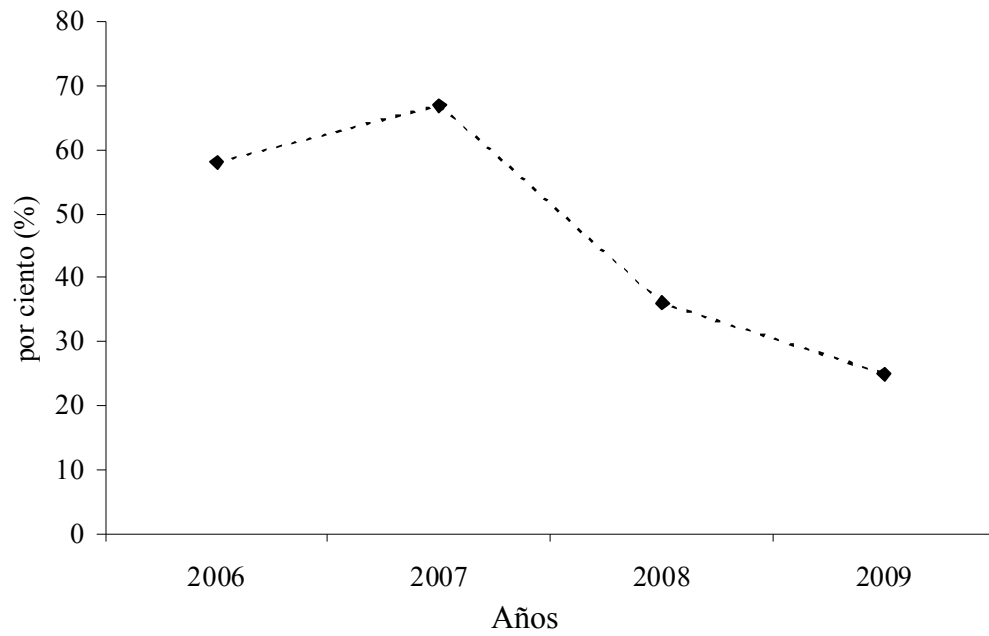
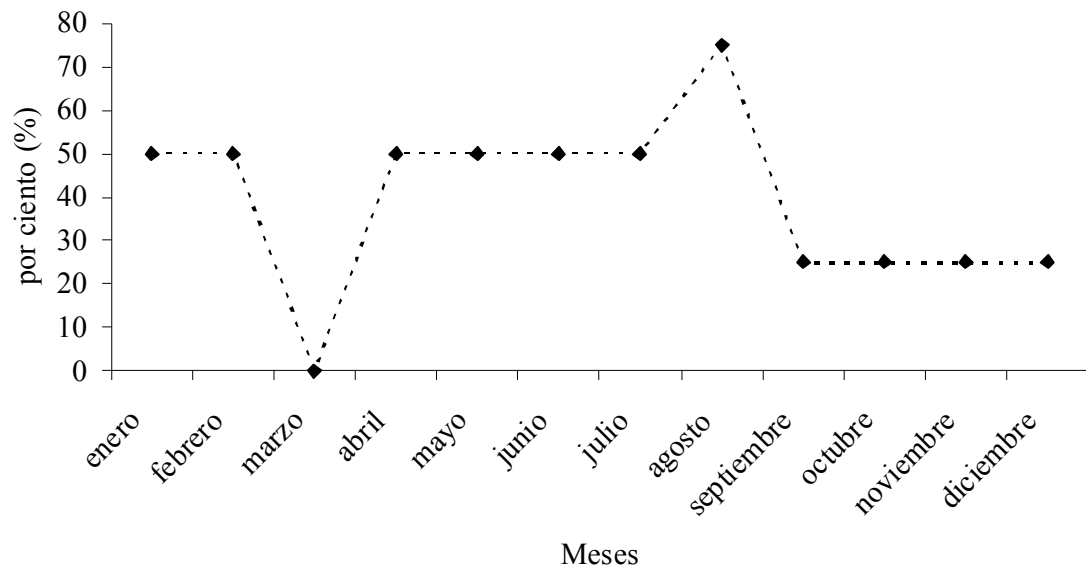


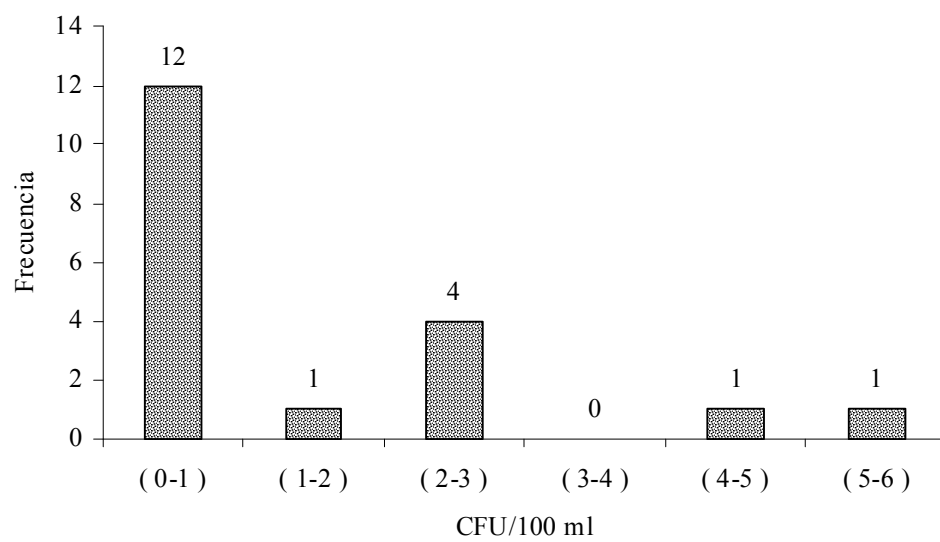
Figura 57. Valores obtenido del promedio geométrico de CFU de los datos de la JCA por mes desde el 2006 hasta el 2009.



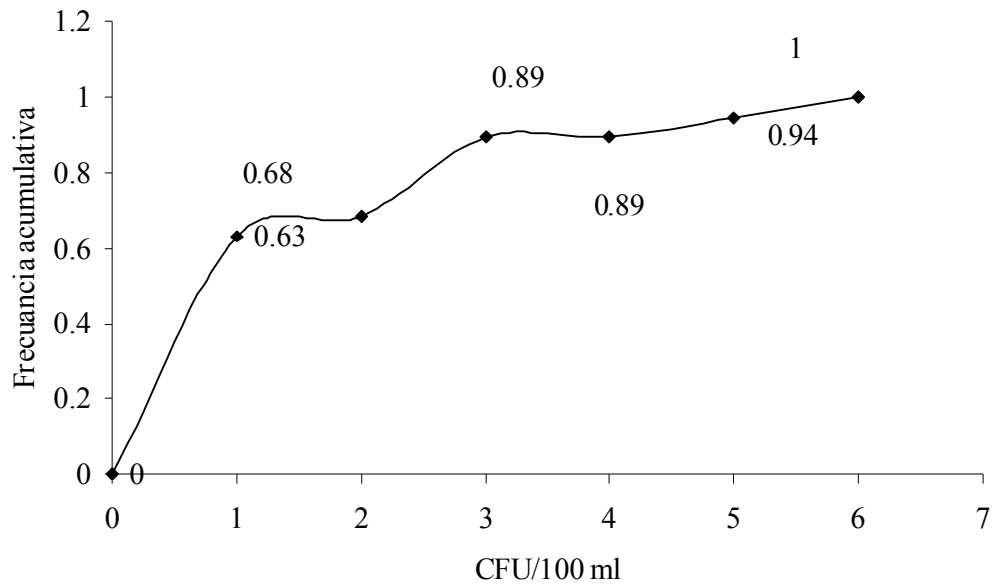
*Figura 58.* El por ciento de veces que en cada año se sobrepasó el límite del promedio geométrico de 35 CFU de los datos obtenidos de la JCA en el balneario de Patillas.



*Figura 59.* El por ciento de veces que en cada mes se sobrepaso el límite del promedio geométrico de 35 CFU de los datos obtenido de la JCA en el balneario de Patillas.

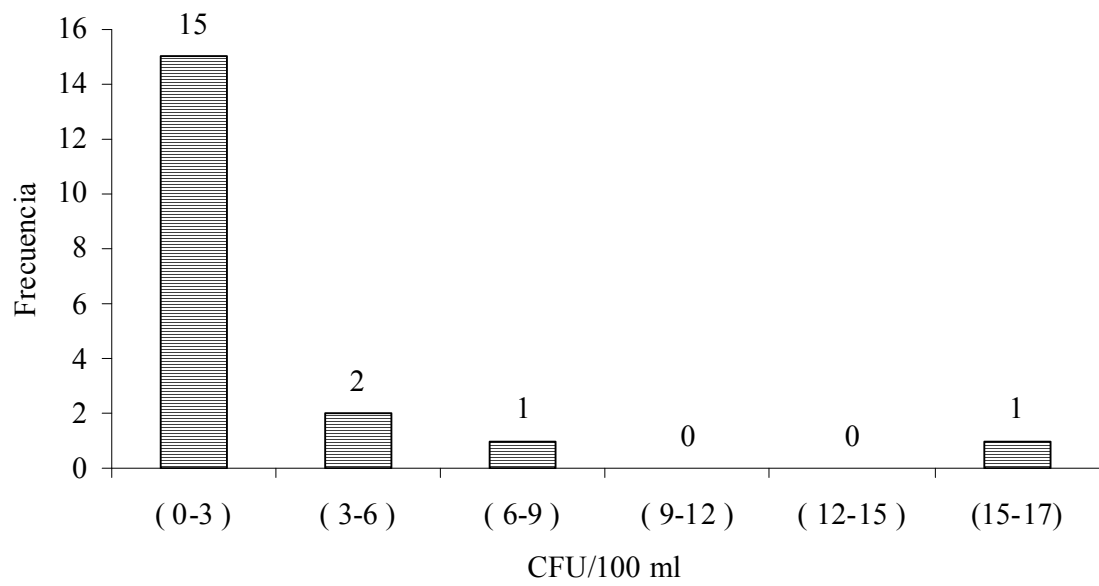


*Figura 60.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 12 de octubre del 2009.

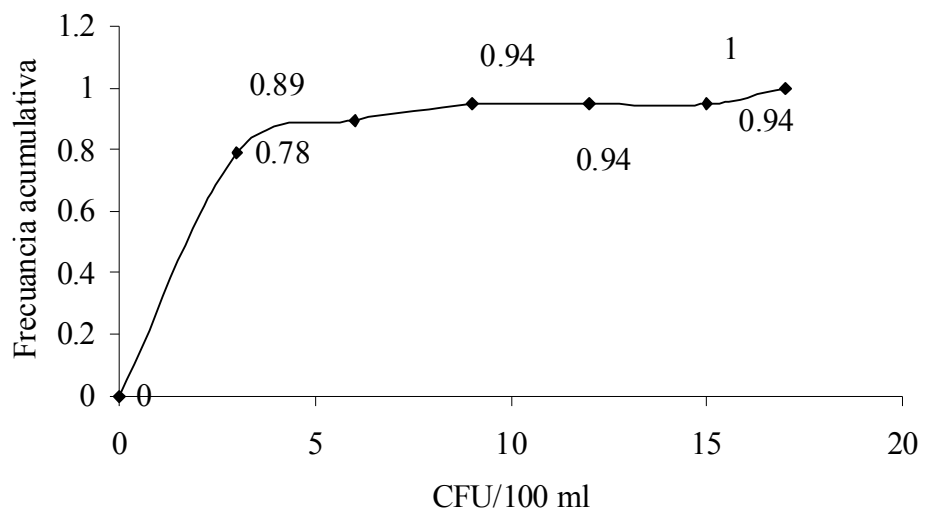


*Figura 61.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 12 de octubre del 2009.

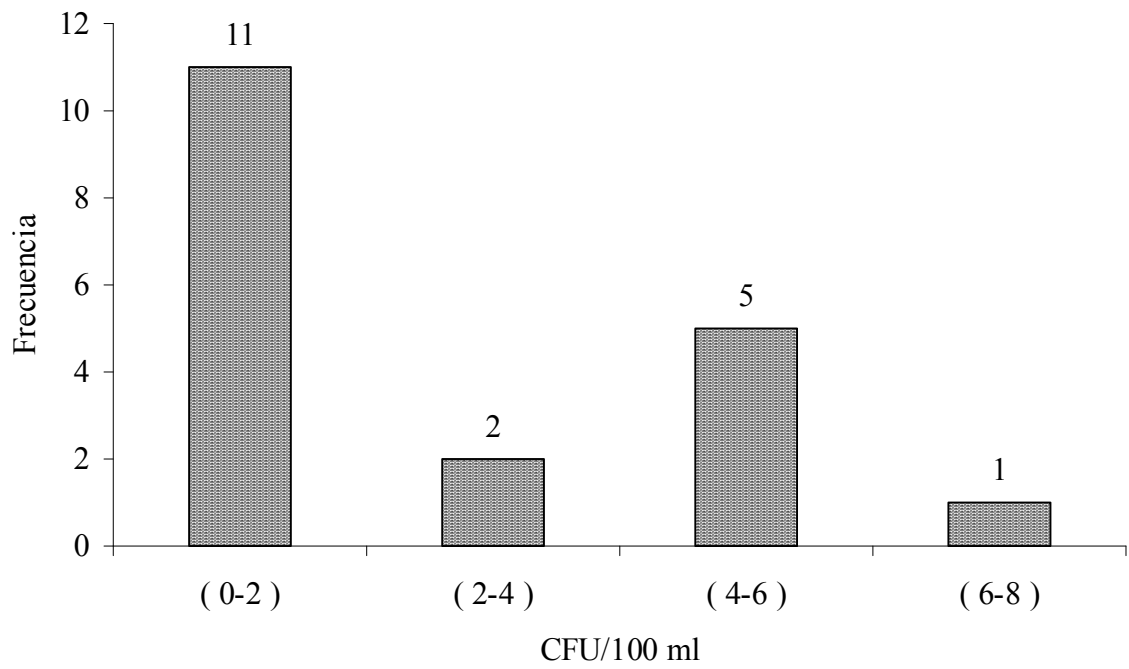




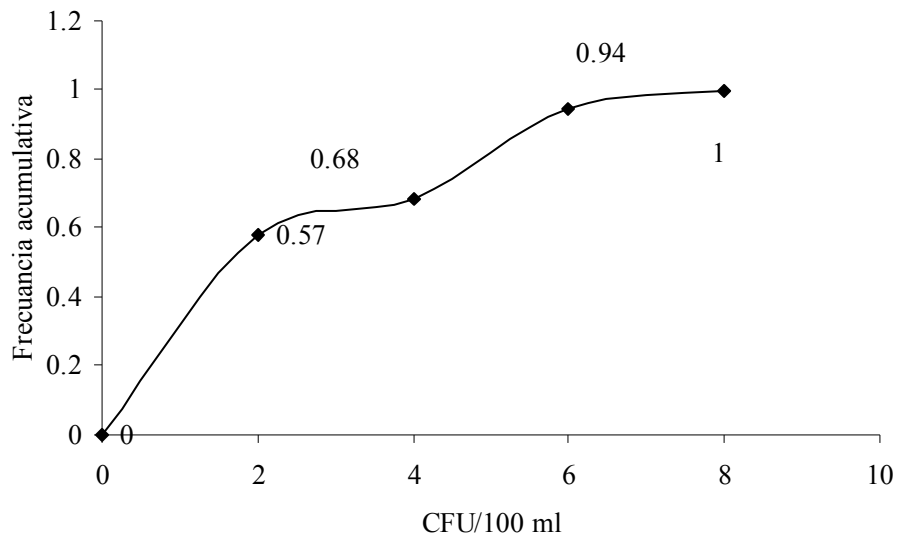
*Figura 62.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 19 de octubre del 2009.



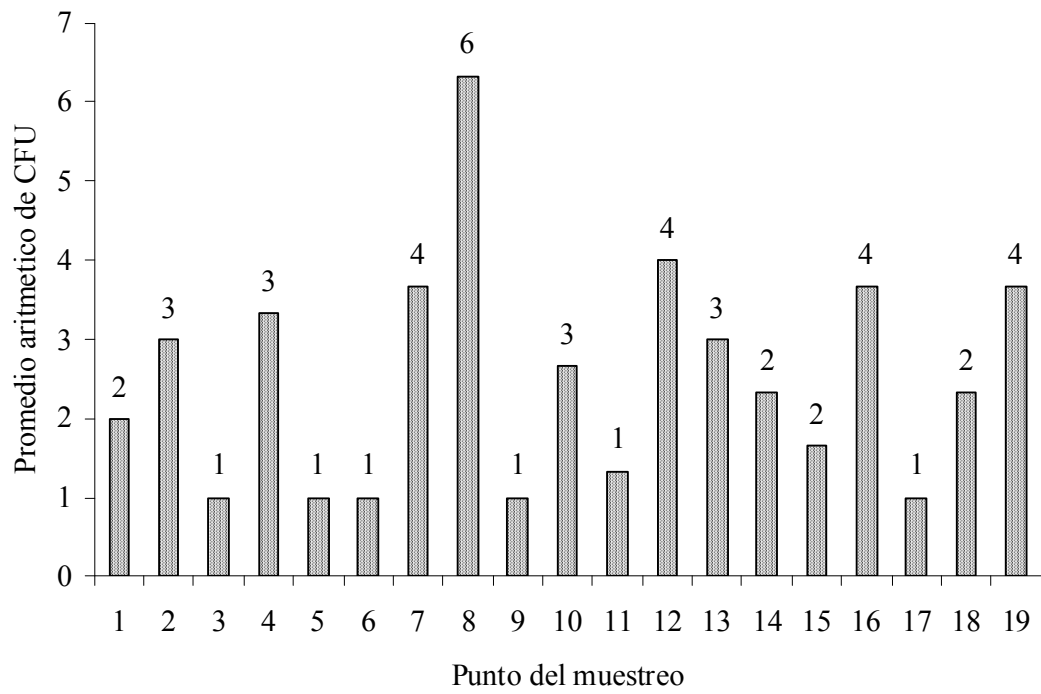
*Figura 63.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 19 de octubre del 2009.



*Figura 64.* Histograma de la distribución de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 25 de octubre del 2009.



*Figura 65.* Distribución de frecuencia acumulativa de los datos de CFU obtenidos de los muestreos realizados en el balneario de Patillas el 25 de octubre del 2009.



*Figura 66.* Datos del promedio de los valores de CFU obtenidos en el mismo punto de muestreo los diferentes días.

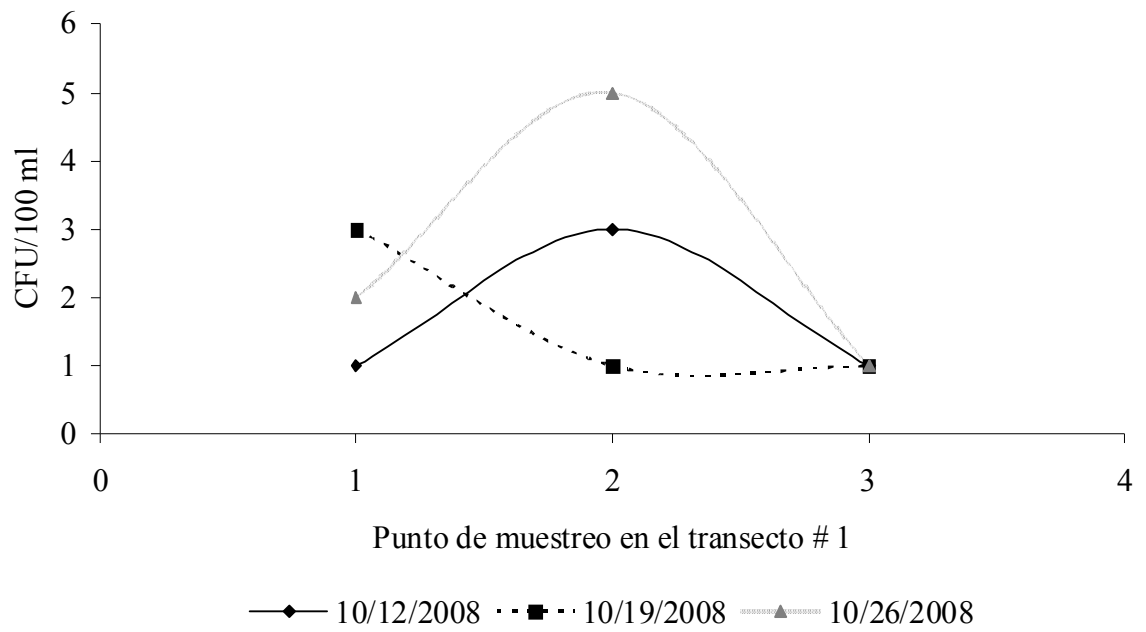


Figura 67. Datos de CFU obtenidos en el transecto#1 en los tres diferentes días.

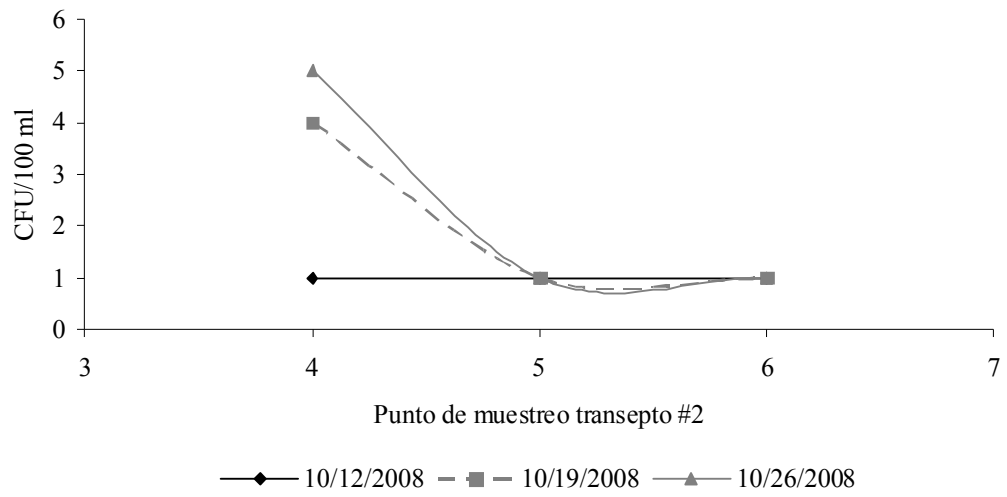
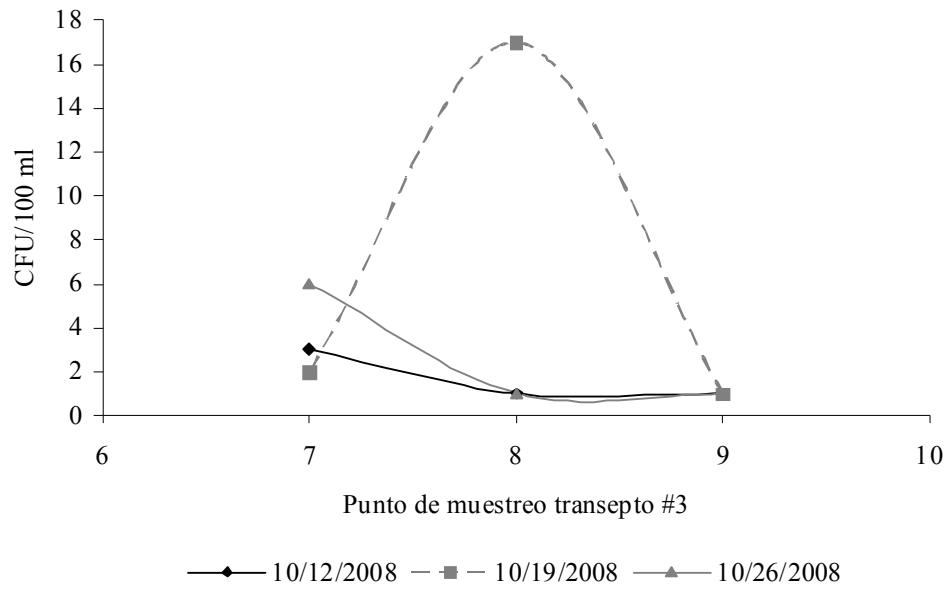
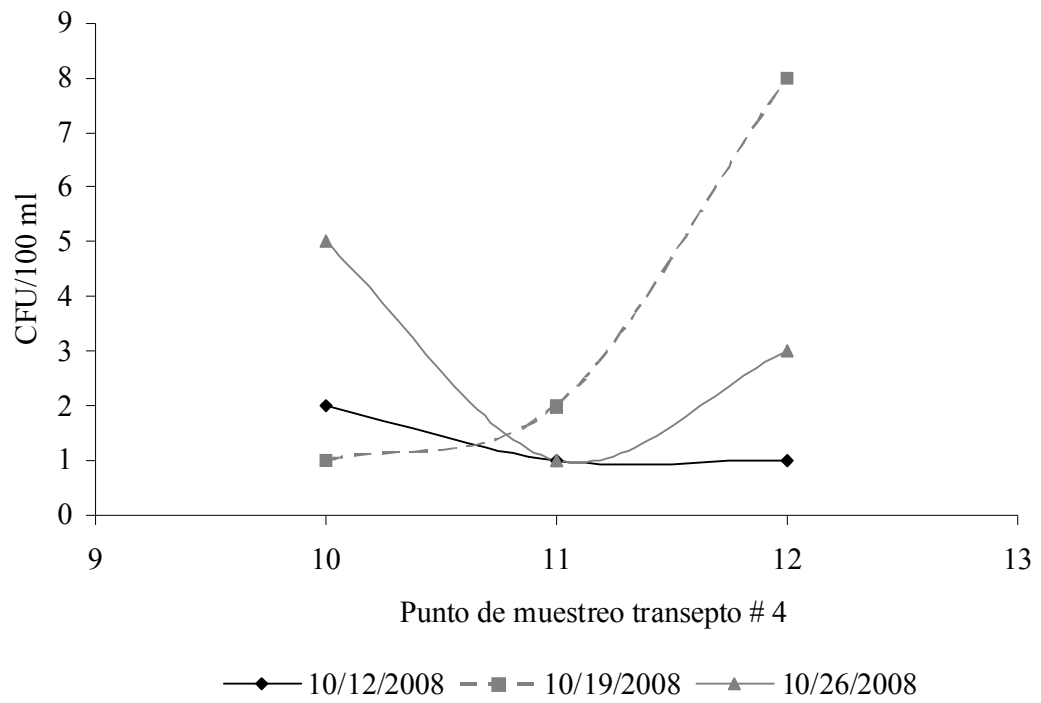


Figura 68. Datos de CFU obtenidos en el transepto # 2 en los tres diferentes días.



*Figura 69.* Datos de CFU obtenidos en el transepto# 3 en los tres diferentes días.





*Figura 70.* Datos de CFU obtenidos en el transepto# 4 en los tres diferentes días.

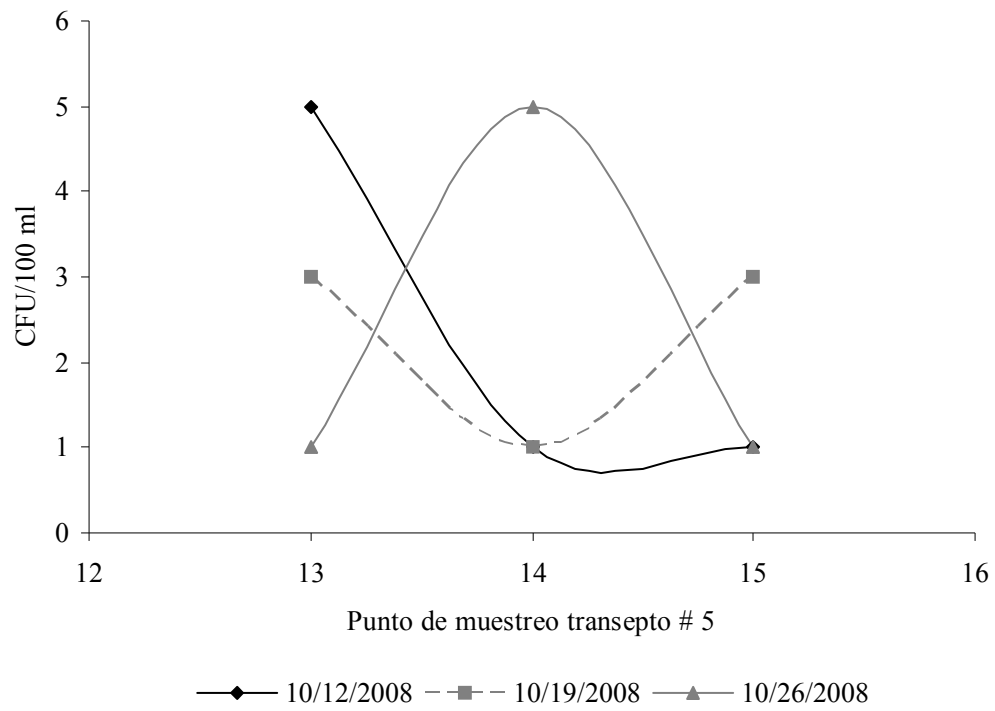


Figura 71. Datos de CFU obtenidos en el transepto# 5 en los tres diferentes días.

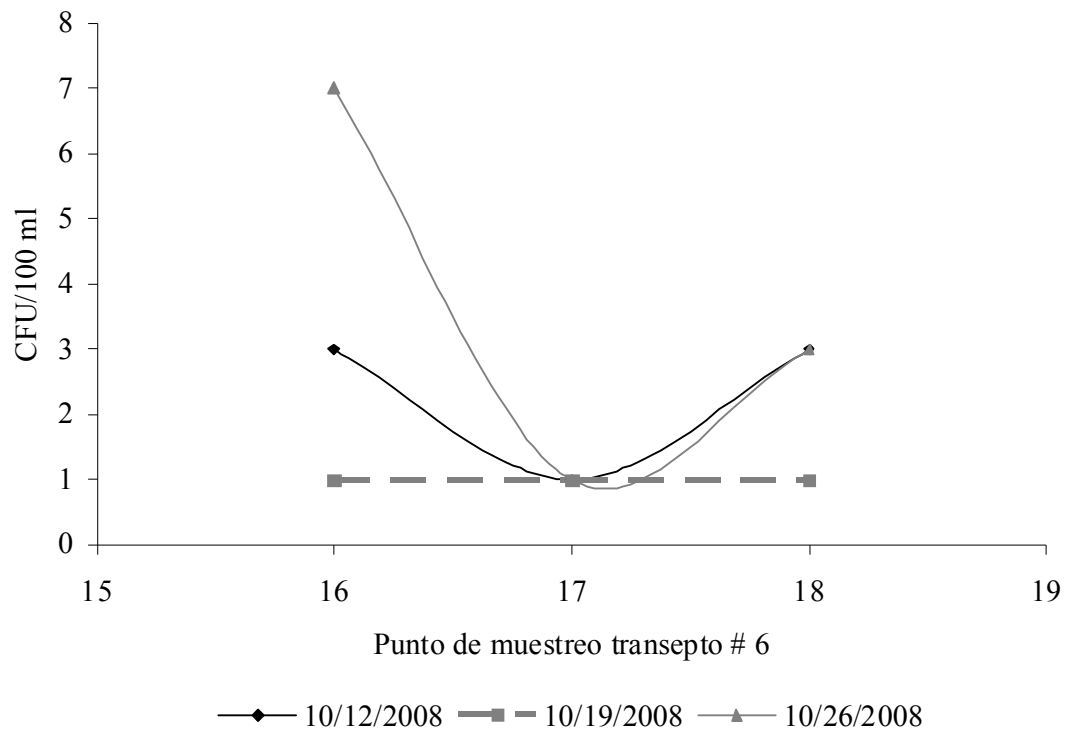


Figura 72. Datos de CFU obtenidos en el transepto# 6 en los tres diferentes días.

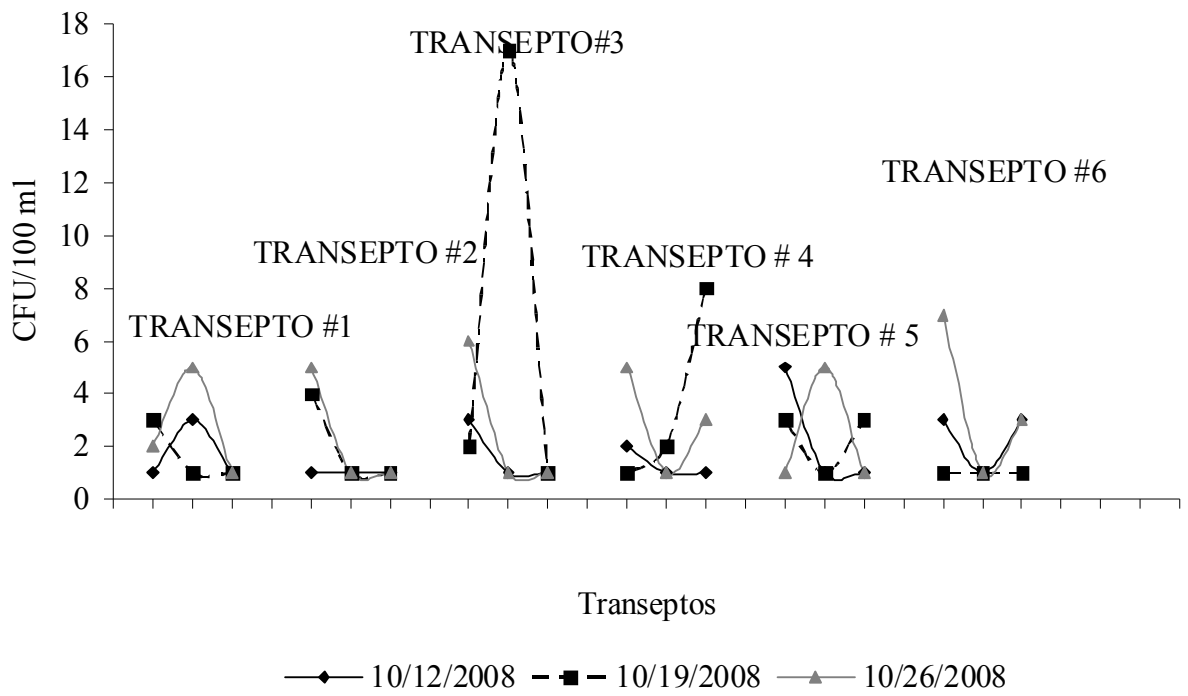


Figura 73. Datos de CFU obtenidos en todos los transectos del balneario de Patillas los tres diferentes días.

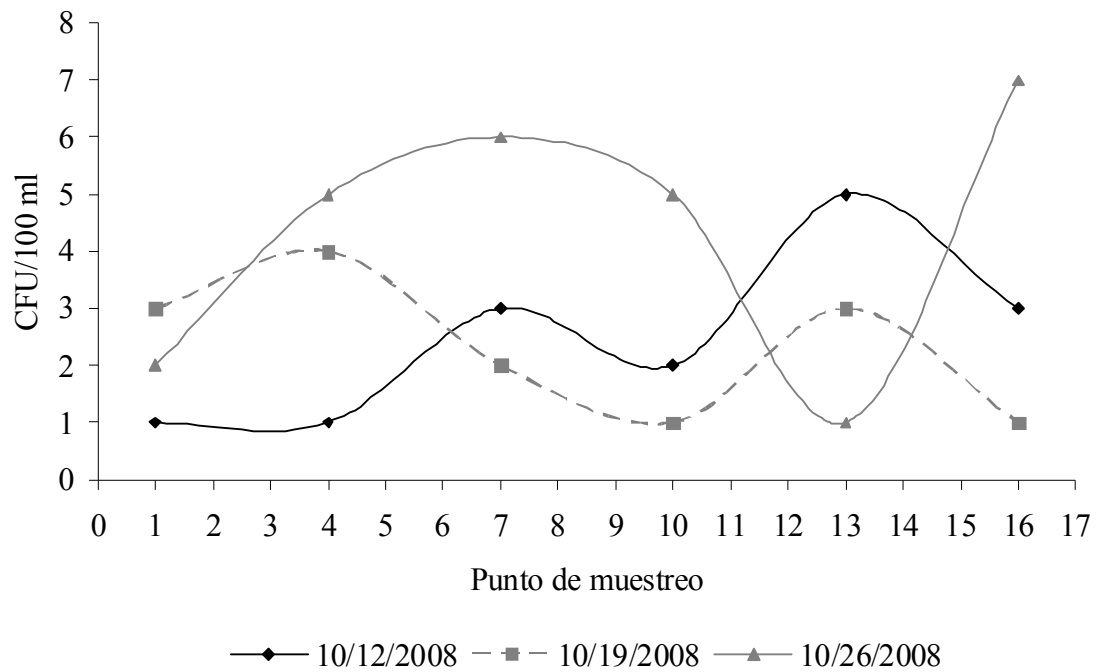


Figura 74. Datos de CFU obtenidos en las zonas #1 del balneario de Patillas los tres diferentes días.

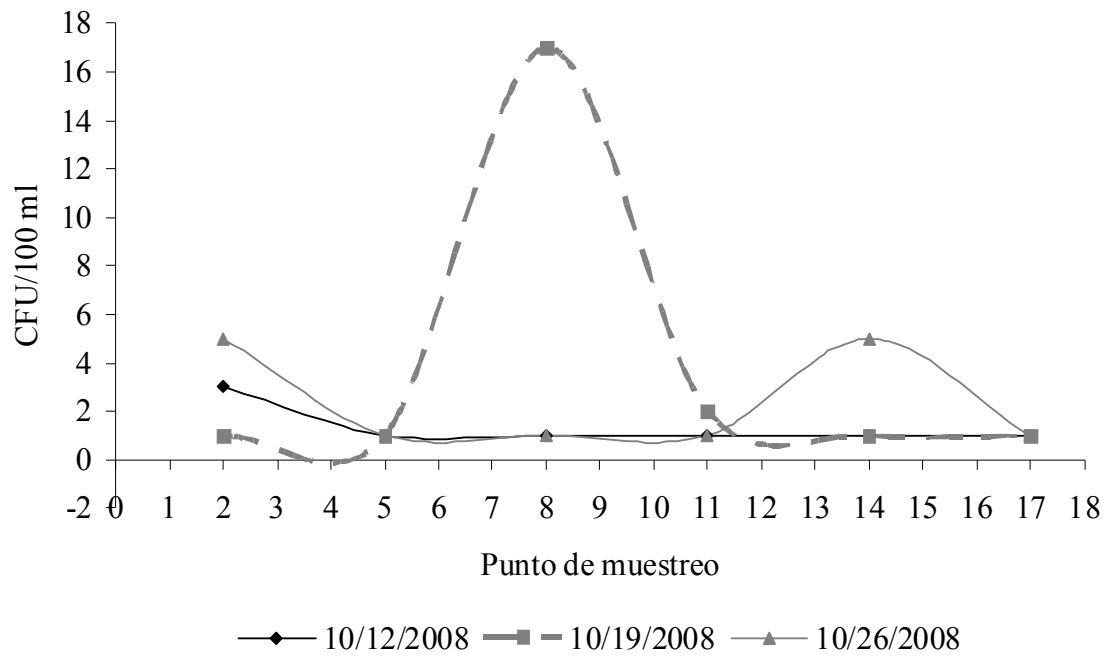


Figura 75. Datos de CFU obtenidos en las zonas #2 del balneario de Patillas los tres diferentes días.

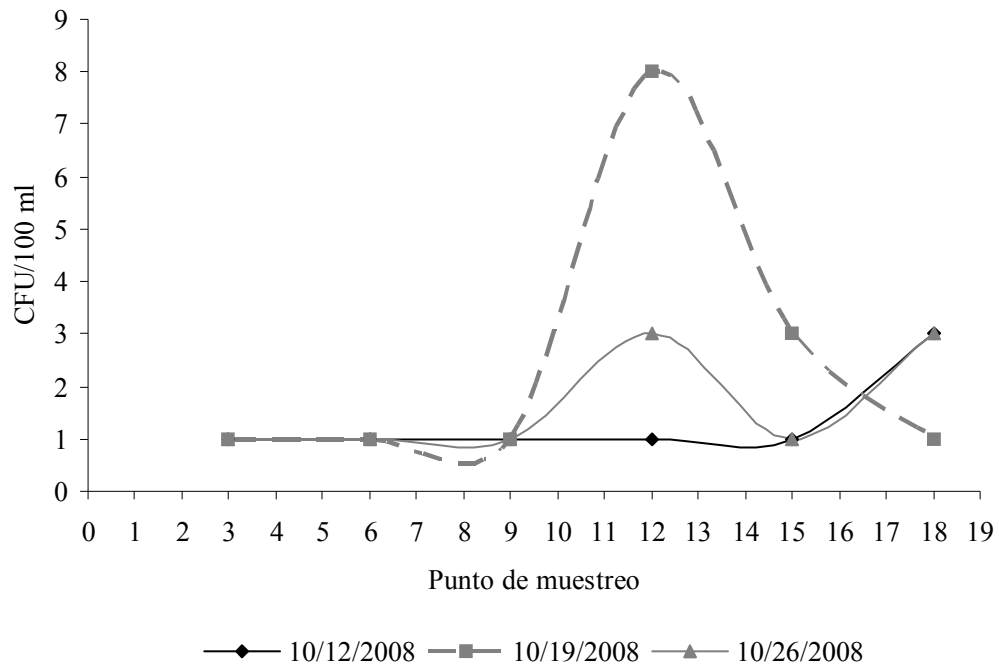


Figura 76. Datos de CFU obtenidos en las zonas #3 del balneario de Patillas los tres diferentes días.

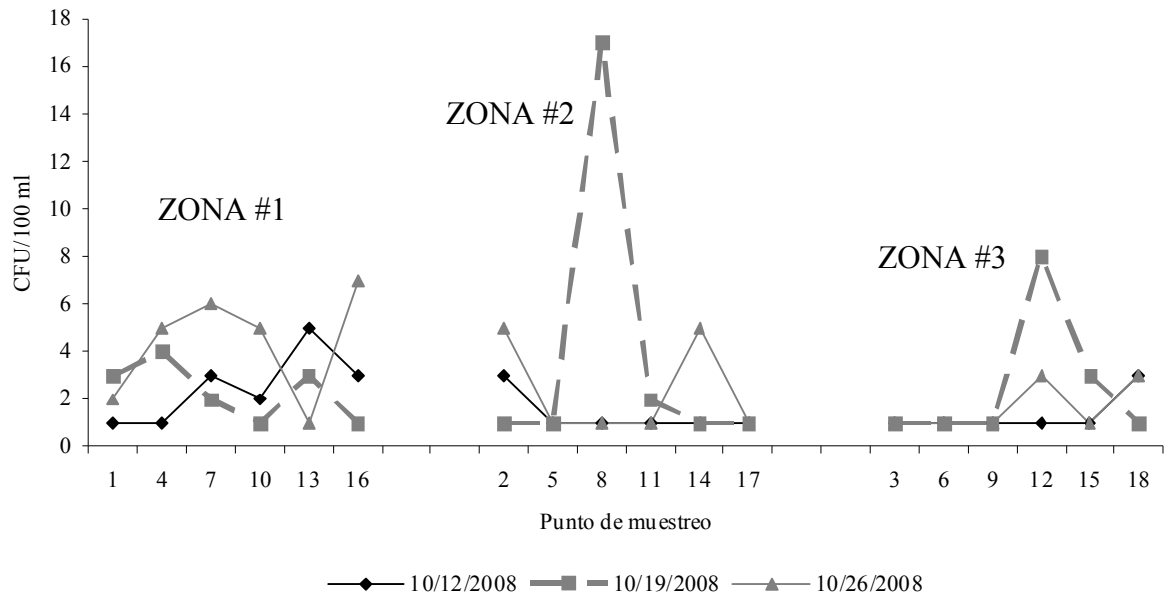


Figura 77. Datos de CFU obtenidos en todas las zonas del balneario de Patillas los tres diferentes días.



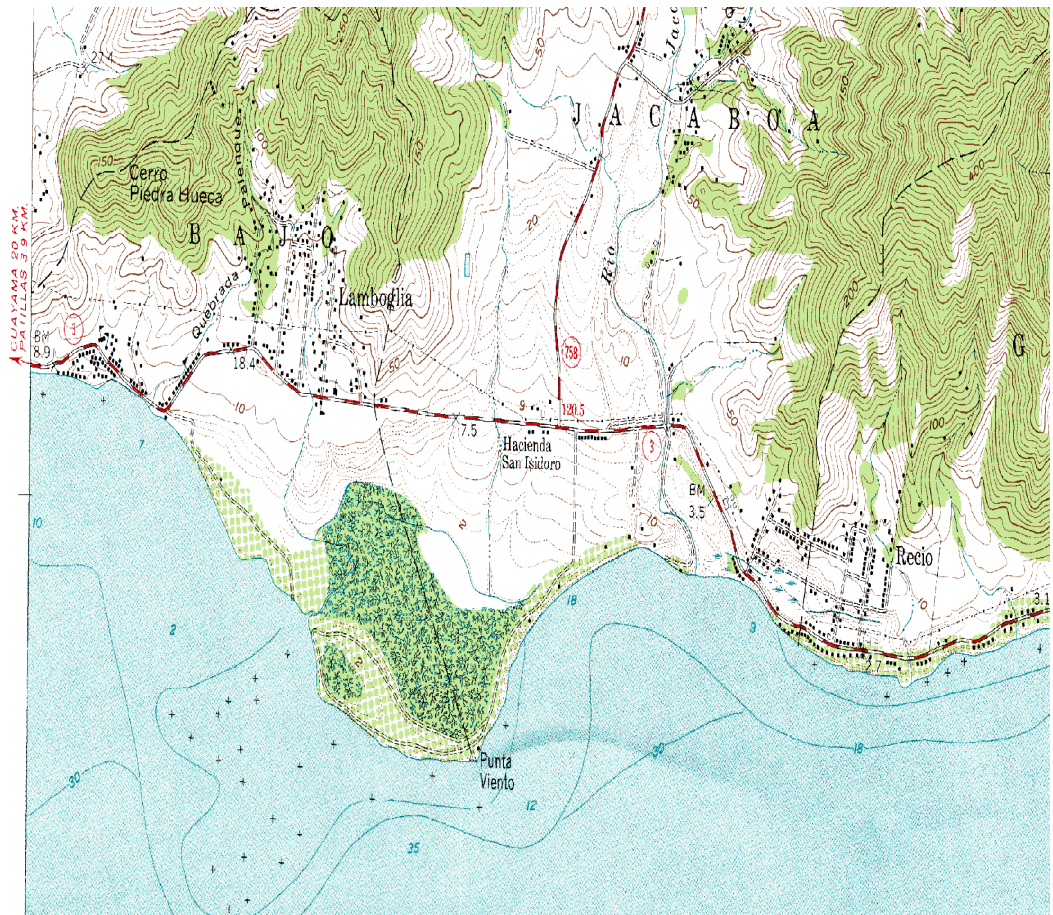


Figura 78. Mapa de contorno del área de Patillas (USGS).