

# ASSESSMENT OF THE ORIGIN OF MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF GROUNDWATER AT A RURAL WATERSHED IN CHILE

## DETERMINACIÓN DEL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL AGUA SUBTERRÁNEA EN UNA CUENCA RURAL EN CHILE

Mariela Valenzuela<sup>1\*</sup>, María A. Mondaca<sup>2</sup>, Marcelino Claret<sup>3</sup>, Claudio Pérez<sup>3</sup>, Bernardo Lagos<sup>4</sup>, Oscar Parra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Environmental Sciences Center EULA-Chile. (marvalenz@udec.cl). <sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences. (mmondaca@udec.cl). <sup>4</sup>Department of Statistics, Faculty of Physics and Mathematics. (bla@udec.cl). University of Concepción. P. O. Box. 160-C, Concepción, Chile. <sup>3</sup>National Institute of Agricultural Research INIA Quilamapu, Av. Vicente Méndez 515. Chillán, Chile (mclaret@inia.cl).

### ABSTRACT

In a rural watershed in Chile, the scarce groundwater available represents almost the only water source both for agriculture and domestic use. This water has microbiological quality problems, which result in an agricultural and local economic development constraint. Contamination can come from punctual or diffuse sources. Characterizing the microbiological quality of groundwater allows both to identify sources from the point of view of whether they are point or non point —thus facilitating their reduction or elimination— and to determine health hazards likely to affect the population in the area under study. This study aimed to improve the state of knowledge on the microbiological quality of groundwater at a rural watershed. Forty two wells were seasonally analyzed over a one-year period. The indicators microorganisms —total coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci— were quantified. The study of the probable origin of the indicators was undertaken using the fecal coliform to fecal streptococci ratio, biochemical identification of enteric bacteria, and somatic coliphages detection as presence of human enteric virus indicator. Temporal contamination dynamics was determined with statistical analysis of indicator organism concentration. Results suggest that the main source of fecal contamination is of animal origin, a diffuse one. Concentrations of bacterial indicators have a temporal basis showing variable levels among seasons, with a higher concentration in the rainy one. All analyzed wells contain opportunistic pathogens.

**Key words:** Fecal coliforms, fecal streptococci, groundwater, microbiological contamination, total coliforms.

### INTRODUCTION

Groundwater supply is generally perceived as less vulnerable to contamination than surface water, due to the natural filtering ability of the subsurface environment and the distance

### RESUMEN

En una cuenca rural en Chile, la escasa agua subterránea disponible representa casi la única fuente de agua para uso agrícola y doméstico. Esta agua tiene problemas de calidad microbiológica, que resultan en una restricción agrícola y de desarrollo económico local. La contaminación puede provenir de fuentes puntuales o difusas. La caracterización de la calidad microbiológica del agua subterránea permite tanto identificar las fuentes del punto de vista de si son puntuales o no puntuales —lo que facilitaría su reducción o eliminación— como para determinar riesgos a la salud que puedan afectar a la población del área estudiada. El objetivo de este estudio fue mejorar el estado del conocimiento acerca de la calidad microbiológica del agua subterránea en una cuenca rural. Por temporada se analizaron 42 pozos en un periodo de un año. Los microorganismos indicadores —total de coliformes, coliformes fecal y estreptococos fecales— fueron cuantificados. Para el estudio del probable origen de los indicadores, se usó la proporción de coliformes fecales a estreptococos fecales, identificación bioquímica de bacteria entérica, y la detección de colifagos somáticos como indicadores de la presencia del virus entérico humano. Se determinó la dinámica de contaminación temporal con un análisis estadístico de la concentración de organismos indicadores. Los resultados sugieren que la fuente principal de contaminación fecal es de origen animal, una fuente difusa. Las concentraciones de indicadores bacterianos tienen una base temporal, lo que conlleva a diferentes niveles entre temporadas, con una mayor concentración en la temporada lluviosa. Todos los pozos contienen patógenos oportunistas.

**Palabras clave:** Coliformes fecales, estreptococos fecales, agua subterránea, contaminación microbiológica, coliformes totales.

### INTRODUCCIÓN

En términos generales, el agua subterránea es percibida como menos vulnerable a la contaminación que el agua superficial, debido a la capacidad de filtración natural del ambiente de la subsuperficie y la distancia que los microorganismos tendrían que recorrer para alcanzar la fuente

\*Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: Febrero, 2008. Aproved: Enero, 2009.

Published as ARTÍCULO in *Agrociencia* 43: 437-446. 2009.

microorganisms would have to travel in order to reach the groundwater source. However, household wells in rural areas are susceptible to contamination because they are shallow, may be less carefully maintained, and can be located in close proximity to areas with loading of human or animal feces. This fecal contamination comes from different sources, livestock being the most frequent one, which creates a diffuse source (Tian *et al.*, 2002), and inadequate on-site human waste disposal systems, which contributes to fecal contamination of watersheds as a point source. This fecal material is of high risk because of the possible presence of human pathogens (Tallon *et al.*, 2005). The fact that contamination can come from various possible sources, makes the origin of contamination usually unknown. Therefore, knowing the origin of fecal contamination is crucial for determining associated risks; it is also vital for determining the actions needed to remediate it (Graves *et al.*, 2002). Although quantitative methods exist, no one identifies the sources of fecal contamination in a fast and accurate manner (Bernhard and Field, 2000), nor are they always useful by themselves to make valid inferences. This occurs because this type of entries are disperse and sporadic, making their detection difficult. Indeed, fecal source identification is particularly difficult for contaminated groundwater.

Fecal coliforms and fecal streptococci are considered to originate in the digestive tract of humans and warm-blooded animals. Historically, coliform bacteria have been used as water quality indicators, due to their association with the intestinal tract and with pathogenic bacteria (Conboy and Goss, 2001). Animal feces can contain pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp. (Avery *et al.*, 2004), *Shigella* sp. (Leclerc *et al.*, 2002) and *Vibrio* sp. However, indicator bacteria do not correlate well with the presence of viruses (Grabow, 2001). In some cases, testing of bacteriophages, mainly somatic coliphages (SOMCPH), provides additional information about fecal microorganisms reaching groundwater (Lucena *et al.*, 2006). A coliphage is a virus that specifically infects and replicates in *Escherichia coli* bacteria. In terms of composition, structure and morphology, phages share many fundamental properties with human viruses. Since human enteric viruses are released into the environment almost exclusively from the gastrointestinal tract, phages which infect typical enteric bacteria such as *E. coli*, resemble human viruses with regard to origin and release into the environment (Grabow, 2001). In this sense, SOMCPH provide original information by tracking fecal pollution longer

subterránea. Sin embargo, los pozos domésticos en áreas rurales son susceptibles a la contaminación, debido a su poca profundidad, quizás con menor mantenimiento, y pueden estar cerca de áreas con cargas de heces humanas o animales. Esta contaminación fecal proviene de fuentes diferentes, aunque la más frecuente es el ganado, el cual crea una fuente difusa (Tian *et al.*, 2002), y un sistema inadecuado de tratado de residuos, los cuales contribuyen a la contaminación fecal de cuencas como fuente puntual. Este material fecal es de alto riesgo debido a la posible presencia de patógenos humanos (Tallon *et al.*, 2005). El hecho de que la contaminación pueda provenir de varias posibles fuentes, suele provocar que el origen de la contaminación sea desconocido. Por tanto, conocer el origen de la contaminación fecal es fundamental para determinar los riesgos asociados; es también vital para establecer las acciones necesarias para enfrentarlos (Graves *et al.*, 2002). Si bien existen métodos cuantitativos, nadie identifica las fuentes de contaminación fecal de forma rápida y certera (Bernhard y Field, 2000), ni son útiles éstos métodos por sí solos para hacer deducciones válidas. Esto ocurre porque este tipo de entrada es disperso y esporádico, lo cual dificulta su detección. Efectivamente, la identificación de fuente fecales es especialmente difícil para el agua subterránea contaminada.

Se considera que los coliformes y estreptococos fecales se originan en el tubo digestivo de humanos y animales de sangre caliente. Históricamente, las bacterias coliformes han sido usadas como indicadoras de la calidad del agua, debido a su relación con el tubo intestinal y con bacterias patogénicas (Conboy y Goss, 2001). Las heces animales pueden contener bacterias, incluyendo *Escherichia coli* O157, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp. (Avery *et al.*, 2004), *Shigella* sp. (Leclerc *et al.*, 2002) y *Vibrio* sp. Sin embargo, las bacterias indicadoras no se correlacionan bien con la presencia de virus (Grabow, 2001). En algunos casos, la prueba de bacteriófagos, principalmente los colífagos somáticos (SOMCPH), brinda información adicional acerca del alcance de los microorganismos fecales hasta el agua subterránea (Lucena *et al.*, 2006). Un colífago es un virus que específicamente infecta y se replica en bacterias *Escherichia coli*. En cuanto a composición, estructura y morfología, los fagos comparten muchas propiedades fundamentales con los virus humanos. Ya que los virus entéricos humanos son expulsados al medio ambiente de forma casi exclusiva desde el tubo gastrointestinal, los fagos que infectan a las típicas bacterias entéricas como *E. coli*, se parecen a los virus humanos en cuanto a su origen y expulsión hacia el ambiente

and further than bacterial ones (Skraber *et al.*, 2004). Evidence of virus presence in groundwater is a concern, since viruses have a low infectious dose, and enteric viruses are the human pathogens most likely to contaminate groundwater.

In Chilean drylands, there are serious problems of water supply both for human consumption and for agricultural activities. In some watersheds, farmers obtain small amounts of water from private wells. They use groundwater sources to obtain drinking water, and for other domestic purposes, orchards, greenhouses and livestock production. Most of these farmers use water directly without any treatment and can be, therefore, exposed to a variety of water-related diseases. Improving the quality of groundwater resources is an important environmental issue for the gradual improvement of rural communities' quality of life.

The purpose of this work was to characterize the microbiological quality of groundwater and to identify potential sources of contamination. The results will advance the understanding of dominant sources of fecal microorganisms in Chilean dryland rural watersheds, and will contribute to improve water quality.

## MATERIALS AND METHODS

### Study area

The small rural San José Creek Watershed (SJCW), in Chile, has an area of 10.77 km<sup>2</sup>, and a population of approximately 60 families (Figure 1). The catchment area is diversely inhabited by families who use traditional agriculture. There is a low domestic animal density. Agricultural production consists mainly of wheat (*Triticum aestivum*) and lentils (*Lens culinaris*). The SJCW is characterized by a Mediterranean climate with a long dry season leading, consequently, to water shortage, and a short wet season. The San José Creek, which drains the watershed, has a longitude of 5.44 km with an intermittent regime. The moisture accumulation period occurs between April and June, when rains begin. Between July and October the soil is saturated, so almost all precipitation is lost as run off. From November to March precipitation is scarce and evapotranspiration is high, so soils get dry, with almost no base flow in the watershed. The average slope is 17 %, and more than half of the surface has a slope greater than 15 %. The groundwater level varies throughout the year, and wells are recharged by rain infiltration. The wells are very variable, and have an average depth of 7.0 m; a median of 5.8 m; a minimum of 1.0 m and a maximum of 19.9 m. The median domestic well yield is 1.1 L min<sup>-1</sup>.

### Water sample collection

Considering the temporal dynamics of groundwater in the area, four monitoring campaigns were carried out in a year. Groundwater

(Grabow, 2001). En este sentido, la información que brindan los SOMCPH es original, ya que rastrean la contaminación fecal por mayor tiempo y distancia que los bacterianos (Skraber *et al.*, 2004). La evidencia de la presencia de virus en el agua subterránea es una preocupación, ya que éstos tienen una dosis infecciosa baja y los virus entéricos son los patógenos humanos con mayores probabilidades de contaminar el agua subterránea.

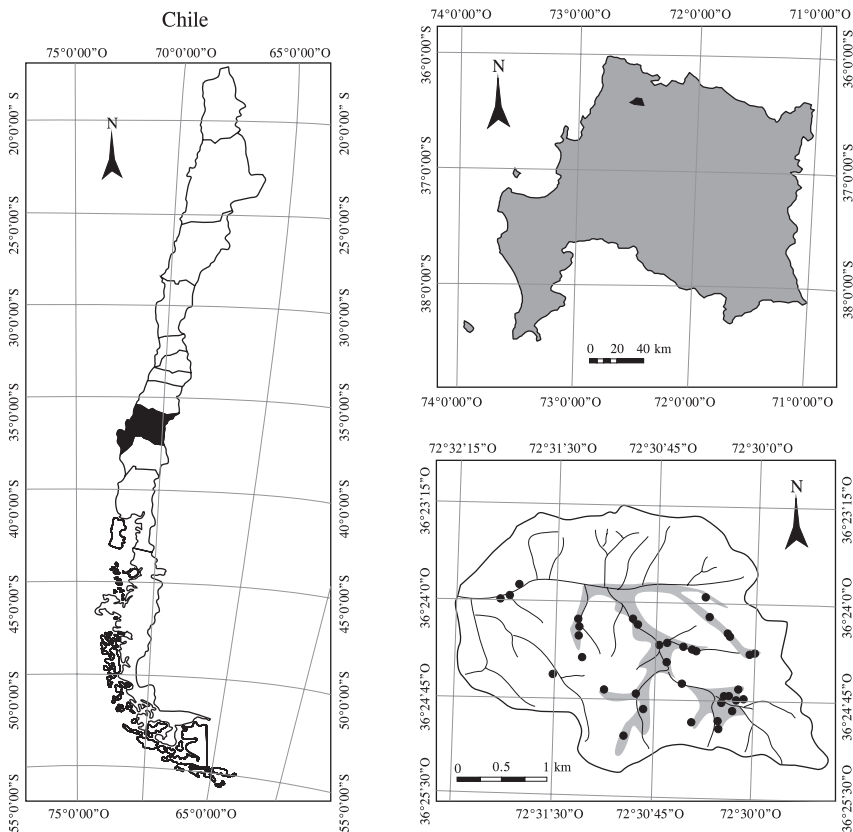
En los secanos chilenos existen serios problemas de suministros de agua para el consumo humano y para actividades agrícolas. En algunas cuencas, los campesinos obtienen pequeñas cantidades de agua de pozos privados. Usan fuentes subterráneas para extraer agua potable y para otros usos domésticos, huertos, invernaderos y producción pecuaria. La mayoría de estos campesinos usan agua sin tratamiento alguno y podrían, por tanto, estar expuestos a una variedad de enfermedades relacionadas con el agua. La mejora de la calidad del agua subterránea es un importante tema ambiental para la mejora gradual de la calidad de vida de comunidades rurales.

El propósito de este trabajo fue caracterizar la calidad microbiológica del agua subterránea e identificar potenciales fuentes de contaminación. Los resultados mejorarán la comprensión de fuentes predominantes de microorganismos fecales en cuencas de secanos rurales chilenos, y contribuirán a mejorar la calidad del agua.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

La pequeña cuenca del arroyo San José (CASJ), en Chile, tiene un área de 10.77 km<sup>2</sup>, y una población de aproximadamente 60 familias (Figura 1). El área de captación está habitada por familias que practican la agricultura tradicional. Hay una baja densidad de animales domésticos. La producción agrícola consiste, en su mayoría, de trigo (*Triticum aestivum*) y lentejas (*Lens culinaris*). La CASJ se caracteriza por un clima mediterráneo con una temporada seca muy prolongada, lo que lleva, en consecuencia, a la escasez de agua y a una temporada húmeda muy breve. El arroyo San José, que riega la cuenca, tiene una longitud de 5.44 km con un régimen intermitente. El periodo de acumulación de humedad transcurre entre abril y junio, cuando comienzan las lluvias. De julio a octubre el suelo está saturado, por lo que casi toda la precipitación se pierde en forma de escorrentía. De noviembre a marzo, la precipitación es escasa y la evaporación, alta, por lo cual los suelos se secan, casi sin flujo de base en la cuenca. La pendiente promedio es 17 %, y más de la mitad de la superficie tiene una pendiente mayor a 15 %. El nivel del agua subterránea varía a lo largo del año y los pozos son rellenados por la infiltración de las lluvias. Los pozos son muy variables y tienen una profundidad



**Figure 1. Map of the San José Creek Watershed, showing the location of sampling sites.**

**Figura 1. Mapa de la Cuenca del arroyo San José, indicando la ubicación de los sitios de muestreo.**

quality was monitored in March, June, September and December, 2005 at 42 wells, and analyzed for microbiological quality. The sampling program was designed to gather as much information as possible in the shortest period of time. This ensured that hydrologic conditions were relatively stable, thus allowing reliable comparison between sites. Site location data were determined using global positioning system (GPS) units. The pH, specific conductance (SC), and water temperature were measured in the field. Well selection was carried out using a stratified random sample (Murray, 2002), where all wells of the watershed were classified in relatively homogeneous strata, based on information of previous monitoring on microbiological indicator level in the SJCW. Then, each stratum was randomly sampled (simple random sampling). Water samples from all sites were collected in 900 mL sterile bottles from approximately 50 cm below the water surface and transported inside coolers to the laboratory and tested within 6 h. In June, two wells could not be sampled because of terrain inaccessibility, and in December three wells could not be accessed, because permission from the well owners was denied.

#### Indicator organisms

The microbiological quality of water resources was determined using indicator organisms that included total coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci. Coliform concentrations were analyzed using the membrane filtration technique, according to standard methods. Aliquots (100, 10 and 1 mL) of each water

promedio de 7.0 m, mediana de 5.8 m, mínima de 1.0 m y máxima de 19.9 m. Un pozo doméstico mediano tiene un rendimiento de 1.1 L min<sup>-1</sup>.

#### Recolección de muestras de agua

Tomando en cuenta la dinámica temporal del agua subterránea del área, se efectuaron cuatro campañas de monitoreo en un año. Se monitoreó la calidad del agua subterránea en marzo, junio, septiembre y diciembre de 2005 en 42 pozos y se analizó la calidad biológica. El programa de muestreo fue diseñado para juntar la mayor cantidad de información posible en el periodo más corto de tiempo. Ello aseguró que las condiciones hidrológicas fueran relativamente estables, permitiendo una comparación confiable entre sitios. Los datos de la ubicación de los sitios fueron determinados usando unidades GPS (Sistema de Posicionamiento Global). En el campo se midieron el pH, la conductancia específica (SC) y la temperatura del agua. La selección de pozos se llevó a cabo mediante una muestra aleatoria estratificada (Murray, 2002), en la que todos los pozos de la cuenca fueron clasificados en estratos relativamente homogéneos, basados en información de monitoreo previo del nivel de indicadores microbiológicos en la CASJ. Entonces, cada estrato fue muestreado aleatoriamente (muestreo aleatorio simple). Se recolectaron muestras de agua de todos los sitios en botellas esterilizadas de 900 mL de aproximadamente 50 cm bajo la superficie del agua, transportadas en hieleras al laboratorio, y analizadas en las siguientes 6 h. En junio no se pudieron

sample were filtered through a 0.45  $\mu$  Millipore membrane filter. After incubation, the number of colonies were enumerated and calculated per 100 mL. All samples were tested in triplicate. Results were reported as Colony Forming Units (CFU 100 mL<sup>-1</sup>). Samples that were overgrown were considered to contain > 1000 CFU 100 mL<sup>-1</sup>. Colonies forming a green metallic sheen were counted as total coliforms on m-Endo agar (Difco®, USA). For fecal coliforms counting, the filter was placed on a petri dish containing m-FC agar (Difco®, USA), which gave the selected colonies a blue color, while the selective count of fecal streptococcus was performed by incubating them in m-enterococcus agar (Difco®, USA).

#### Data analysis

The results for total coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci obtained in four seasons were analyzed using the STATISTICA Statsoft Inc. software. Besides, a ratio of fecal coliforms to fecal streptococci was calculated.

#### Bacterial identification

Thirty water samples from three seasons (March, June and December) were inoculated in MacConkey agar. Between 1 to 6 colonies differing in size, shape, and color were randomly selected from the MacConkey agar and further isolated again on MacConkey agar and incubated at 37 °C for 24 h. Later, Gram staining and the oxidase test were performed. Isolated strains were identified according to their biochemical properties using the RapID NF and RapID ONE systems (REMEL Inc.). Preparation of organism suspensions, inoculation, incubation times and temperatures, interpretation of reactions, and quality control were performed according to the manufacturer's recommendations for each system. Strains were stored in Luria broth with glycerin at -20 °C until use.

#### Somatic coliphages

Somatic coliphages were enumerated by means of the plaque assay method using the double layer technique. If a phage is present in the sample, it attaches to an *E. coli* cell and replicates, causing the death of the cell and cell lysis, until a plaque is visible. Plaques were counted as somatic coliphages on host strain *E. coli* B and expressed as plaque-forming units per 100 ml (pfu/100 ml) (Grabow, 2001).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Indicator organisms

Colimetries in all water samples did not meet the minimum standards for drinking water as established by the Chilean norm (0 CFU 100 mL<sup>-1</sup>). In some wells, plate counts did not comply either with the Chilean standard of 1000 CFU 100 mL<sup>-1</sup> for irrigation

tomar muestras de dos pozos debido a lo inaccesible del terreno y en diciembre, los dueños negaron el acceso a tres pozos.

### Organismos indicadores

Se determinó la calidad microbiológica del agua por medio de organismos indicadores que incluían coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales. Las concentraciones de coliformes fueron analizadas mediante la técnica de filtración de membrana, según métodos estándar. Se filtraron alícuotas (100, 10 and 1 mL) de cada muestra de agua a través de un filtro Millipore de membrana de 0.45  $\mu$ . Después de la incubación, el número de colonias fueron enumeradas y calculadas por 100 mL. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. Se reportaron los resultados como unidades formadoras de colonias (CFU 100 mL<sup>-1</sup>). Se consideró que las muestras que crecían demasiado contenían > 1000 CFU 100 mL<sup>-1</sup>. Las colonias que formaban un brillo verde metálico fueron contadas como coliformes totales con agar m-Endo (Difco®, USA). Para el recuento de los coliformes fecales, se colocó el filtro en una placa de petri con agar m-FC (Difco®, USA), que dio a las colonias elegidas un color azul, mientras que el recuento selectivo de estreptococos fecales se efectuó incubándolos en agar m-enterococcus (Difco®, USA).

### Análisis de datos

Se analizaron los resultados para los coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales obtenidos en cuatro temporadas, usando el programa de STATISTICA Statsoft Inc. Además, se calculó la proporción de coliformes fecales y estreptococos fecales.

### Identificación bacterial

Se inocularon 30 muestras de agua de tres temporadas (marzo, junio y diciembre) en agar MacConkey. Se seleccionaron entre 1 y 6 colonias de diferentes tamaños, formas y colores del agar MacConkey y vuelto a aislar con agar MacConkey e incubado a 37 °C por 24 h. Luego, se llevaron a cabo una tinción de Gram y la prueba de la oxidasa. Se identificaron cepas aisladas, según sus propiedades bioquímicas, con el uso de los sistemas RapID NF y RapID ONE (REMEL Inc.). Se efectuó la preparación de organism suspensions, inoculación, tiempos y temperaturas de incubación, interpretación de reacciones, y control de calidad, según las recomendaciones del fabricante para cada sistema. Las cepas fueron almacenadas en un caldo Luria con glicerina a -20 °C hasta su uso.

### Colifagos somáticos

Los colifagos somáticos fueron enumerados por medio del método plaque Assay, con la técnica de la doble placa. Si un fago se encuentra presente en la muestra, se aferra a una célula de *E. coli* y se replica, lo que causa la muerte de la célula y la lisis celular, hasta que se perciba una placa. Las placas fueron contadas como colifagos

purposes. Based on this criterion, a low percentage of wells cannot be used for irrigation (7.3 % of wells in March, 4.9 % in June, 0 % in September and 2.6 % in December). The most frequent indicator was total coliforms.

Considering the seasonal variations of the level of an indicator organism present in groundwater, contributes to elicit whether the sources are point or diffuse. According to the results obtained in this study, the total coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci load in water samples seems to be seasonally regulated, with the highest concentrations occurring during winter (June), when most precipitation occurs (Figure 2). Therefore, this contamination may come from runoff, where some coliforms are associated with particles (George *et al.*, 2004).

Median concentrations increase again in December. This can be due to an increase in demand from the wells during the later part of the year, combined with minimal water yield. Changes in indicator counts are assumed to reflect changes in the rate of fecal contamination of a water body. Fecal origin bacteria can survive for extended periods of time in a groundwater environment. This long survival of enteric bacteria means that groundwater has the potential to be unsafe for consumption for a long time after contamination has occurred (Conboy and Goss, 2001).

Total coliforms are ubiquitous in nature, so the results obtained may reflect that the wells are receiving allochthonous material from other possible sources like wild animals, organic material falling into the wells and soil borne bacteria, among others.

More than 50 % of the wells had a ratio  $<0.7$ , reaching 83.3 % of the samples in September. On the contrary, the ratio  $>4$  was found to appear in a significantly lower percentage, ranging between 0 in September and 10.3 % in December. A predominantly human source should exhibit an initially high ( $>4$ ) ratio which should then fall, whereas a non-human source should exhibit an initially low ratio ( $<0.7$ ), which should subsequently rise. As used elsewhere (Donderski and Wilk, 2002; Daby *et al.*, 2002; Troussellier *et al.*, 2004), the ratio fecal coliforms/fecal streptococci showed that the source of indicator bacteria is mostly animal, followed by mixed sources (Table 1).

### Bacterial identification

Out of 30 well groundwater samples, a total of 123 strains were isolated. From them, 49 (39.84 %) were identified with the RapID One and RapID NF identification systems. These were considered correct if recurrent patterns of the species were

somáticos en una cepa huésped de *E. coli* B y expresadas como unidades formadoras de placa por 100 ml (pfu/100 ml) (Grabow, 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Organismos indicadores

Las colimetrías en todas las muestras de agua no alcanzaron los estándares mínimos para el agua potable estipulada por la normatividad chilena (0 CFU 100 mL<sup>-1</sup>). En algunos pozos, las cuentas de placas tampoco cumplían con el estándar chileno de 1000 CFU 100 mL<sup>-1</sup> para fines de irrigación. Basados en este criterio, un bajo porcentaje de pozos no pueden ser utilizados para la irrigación (7.3 % de pozos en marzo, 4.9 % en junio, 0 % en septiembre y 2.6 % en diciembre). El indicador más frecuente fue de coliformes.

Tomar en cuenta las variaciones estacionales del nivel de un organismo indicador presente en el agua subterránea ayuda a deducir si las fuentes son puntuales o difusas. Según los resultados obtenidos en este estudio, la carga total de coliformes, coliformes fecales y estreptococos fecales en muestras de agua parece estar regulada por temporadas, con la ocurrencia de concentraciones más altas durante el invierno (junio), cuando hay más precipitación (Figura 2). Esta contaminación puede, por tanto, provenir de la escorrentía en la que algunos coliformes están asociados con partículas (George *et al.*, 2004).

Las concentraciones medianas aumentan de nuevo en diciembre. Esto puede deberse a un incremento en la demanda de los pozos durante la fase final del año, en combinación con contenidos de agua mínimos. Se considera que los cambios en cuentas de indicadores

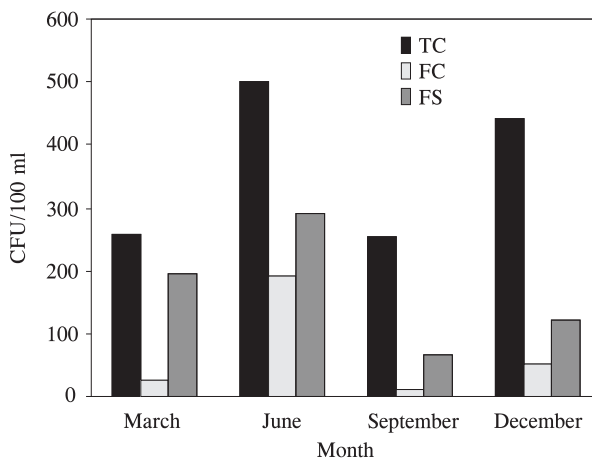


Figure 2. Median indicator concentrations by season.  
Figura 2. Concentraciones indicadoras medianas por temporada.

**Table 1. Ratio: fecal coliform/fecal streptococci (FC/FS).**  
**Cuadro 1. Ratio: coliformes fecales/estreptococos fecales (FC/FS).**

Sample Month	Samples	FC/FS		
		$\leq 0.7^{\dagger}$	$\geq 4^{\ddagger}$	$< 0.7 - > 4^{\S}$
March	41 (100 %)	28 (68.3 %)	1 (2.4 %)	12 (29.3 %)
June	41 (100 %)	23 (56.1 %)	1 (2.4 %)	17 (41.5 %)
September	42 (100 %)	35 (83.3 %)	0 (0 %)	7 (16.7 %)
December	39 (100 %)	25 (64.1 %)	4 (10.3 %)	10 (25.6 %)

<sup>†</sup>Human origin; <sup>‡</sup>Animal origin; <sup>§</sup>Mixed origin.

higher than 95 %. Identified bacteria are listed in Table 2. The majority of these bacteria belong to the Enterobacteriaceae family and are known as coliforms. They include *E. coli*, a permanent member of the intestinal community, whereas the presence of other genera like *Citrobacter*, *Klebsiella* and *Enterobacter*, bears a transient character (Leclerc *et al.*, 2001). In the case of bacteria of the genus *Yersinia*, some have been commonly isolated from the environment, including water supplies of various types. Environmental strains, therefore, should be differentiated from some serotypes of *Y. enterocolitica*, which are the most frequently associated with human infections in several countries. These pathotypes can multiply in fresh waters and could constitute a major hazard to drinking water (Leclerc *et al.*, 2002). The species identified were mainly Pseudomonads and *E. coli*. The Pseudomonadaceae constitute a large fraction of the bacteria found in natural waters. Although these

**Table 2. Bacterial identification of 123 isolated strains of groundwater wells.**

**Cuadro 2. Identificación bacteriana de 123 cepas aisladas de pozos de agua subterránea.**

Species	Number	Origin
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	Fecal and aquatic
<i>Citrobacter freundii</i>	4	Fecal and aquatic
<i>Citrobacter koseri</i>	1	Fecal and aquatic
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	Fecal and aquatic
<i>Escherichia coli</i>	15	Fecal and aquatic
<i>Hafnia alvei</i>	1	Aquatic
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1	Aquatic and opportunistic pathogen
<i>Pantoea agglomerans</i>	2	Aquatic and associated with plants
<i>Proteus vulgaris</i>	1	Aquatic
<i>Pseudomona</i> sp.	15	Aquatic
<i>Serratia odorifera</i>	1	Aquatic
<i>Tatumella ptyseos</i>	1	Clinical isolates
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	Fecal and aquatic
<i>Yersinia intermedia</i>	1	Aquatic
No identified	74	

Based on Farmer III *et al.*, 1985; Ribas *et al.*, 2000 ; Leclerc *et al.*, 2001; Leclerc *et al.*, 2002.

reflejan cambios en la cantidad de contaminación fecal en una masa de agua. La bacteria con origen fecal puede sobrevivir largos períodos de tiempo en un ambiente de agua subterránea. Esta larga supervivencia de bacteria entérica significa que el agua subterránea tiene el potencial de no ser apta para su consumo por un largo tiempo posterior a su contaminación (Conboy y Goss, 2001).

Los coliformes totales son ubicuos en la naturaleza, por lo que los resultados obtenidos pueden reflejar que los pozos reciben material alóctono de otras posibles fuentes como pueden ser animales silvestres, material orgánico que cae dentro de los pozos y bacteria proveniente de los suelos, entre otros.

Más de 50 % de los pozos tenían una proporción  $< 0.7$ , cercana a 83.3 % de las muestras en septiembre. Por el contrario, la proporción  $> 4$  se encontró en menor porcentaje, de 0 % en septiembre y 10.3 % en diciembre. Una fuente de forma predominantemente humana debería presentar una proporción inicialmente alta ( $> 4$ ), que luego debería descender, mientras que una fuente no humana debería presentar una proporción inicialmente baja ( $< 0.7$ ), que debería incrementar posteriormente. De la forma que se usa en otros sitios (Donderski y Wilk, 2002; Daby *et al.*, 2002; Troussellier *et al.*, 2004), la proporción de coliformes fecales/estreptococos fecales demostró que la fuente de la bacteria indicadora es más que nada de origen animal, seguida de fuentes varias (Cuadro 1).

### Identificación bacteriana

De 30 muestras de pozo de agua subterránea, se aislaron 123 cepas. De éstas, 49 (39.84 %) fueron identificadas con los sistemas de identificación RapID One y RapID NF. Fueron consideradas correctas si los patrones recurrentes de las especies eran mayores a 95 %. Las bacterias identificadas están enlistadas en el Cuadro 2. La mayoría de estas bacterias pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceae y se conocen como coliformes. Incluyen *E. coli*, miembro permanente de la comunidad intestinal, mientras que la pre-

microorganisms belong to the natural population of the water, some strains should be considered as opportunistic pathogens (Ribas *et al.*, 2000).

The high percentage of unidentified bacteria is a result of the utilization of RapID systems, which are designed for clinical bacterial identification. From 14 isolated strains (Table 2), 13 can have an aquatic origin. Of these, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica* may also have a fecal origin, while only one, *Tatumella ptyseos*, is neither fecal nor aquatic. The latter result seems very strange because *Tatumella ptyseos* is generally isolated from clinical samples (Farmer III *et al.*, 1985). However, Paradis *et al.* (2005) analyzed the phylogeny of enterobacterial species commonly found in clinical samples, showing, for the first time, a tight phylogenetic affiliation between *Pantoea* and *Tatumella* species.

### Somatic coliphages

SOMCPH were detected in two of the monitored wells for this variable. The positive detections of SOMCPH determined in the three sampling dates were 76 plaques  $100 \text{ mL}^{-1}$  in a well in March, and 1 plaque  $100 \text{ mL}^{-1}$  in a well in December. The SOMCPH limit for a low risk of viral infection is  $1.00\text{E}+01$  pfu  $100 \text{ mL}^{-1}$  (Griesel and Jagals, 2002). Therefore, the results indicate a good viral quality of well groundwater, and a low probability for the origin of fecal contamination to be human. None of these water sources posed any health risk to consumers in terms of this water quality variable. Muniesa and Jofré (2004) indicate that phage and bacteria densities and the bacterial physiological conditions needed for SOMCPH replication are rarely expected to be found in natural water environments. Therefore, it can be assumed that the detected SOMCPH come from an allochthonous source rather than from an *in situ* replication. However, the low level of viral contamination detected can be the result of the limited sample fraction analyzed. The sample with the main concentration of plaques was collected during the summer. However, whether or not SOMCPH occurrences in wells are seasonal, could not be inferred from the small numbers of viral detections.

### CONCLUSIONS

The levels of indicator microorganisms in groundwater and the presence of opportunistic pathogens shows that wells are persistently contaminated and are, therefore, likely to become a

sencia de otros géneros como *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, es más pasajera (Leclerc *et al.*, 2001). En el caso de bacterias del género *Yersinia*, algunas han sido frecuentemente aisladas del ambiente, incluyendo suministros de agua de varias clases. Las cepas ambientales, por tanto, deben ser diferenciadas de algunos serotipos de *Y. enterocolitica*, que son más comúnmente asociados con infecciones humanas en varios países. Estos patotipos se pueden multiplicar en aguas dulces y podrían constituir un riesgo importante para el agua potable (Leclerc *et al.*, 2002). Las especies identificadas fueron, principalmente, Pseudomonadaceae y *E. coli*. Las Pseudomonadaceae constituyen una gran parte de las bacterias que se encuentran en aguas naturales. Si bien estos microorganismos pertenecen a la población natural del agua, algunas cepas deben ser consideradas patógenos oportunistas (Ribas *et al.*, 2000).

El alto porcentaje de bacteria no identificada es resultado de los sistemas RapID, los cuales están diseñados para la identificación de bacterias clínicas. De 14 cepas aisladas (Cuadro 2), 13 pueden ser de origen acuático. De éstas, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica* también pueden ser de origen fecal, mientras que sólo una, *Tatumella ptyseos*, no es ni fecal ni acuática. Este último resultado parece extraño debido a que *T. ptyseos* por lo general se aísla de muestras clínicas (Farmer III *et al.*, 1985). Sin embargo, Paradis *et al.* (2005) analizaron la filogenia de especies enterobacteriales más comúnmente encontradas en muestras clínicas, lo cual demostraba por primera vez, una cercana afiliación filogenética entre las especies de *Pantoea* y *Tatumella* species.

### Colifagos somáticos

Se detectaron SOMCPH en dos de los pozos monitoreados para esta variable. La detección positiva de SOMCPH determinadas en las tres fechas de muestreo fueron 76 placas de  $100 \text{ mL}^{-1}$  en un pozo en marzo y 1 en un pozo en diciembre. El límite de SOMCPH para un bajo riesgo de infección viral es de  $1.00\text{E}+01$  pfu  $100 \text{ mL}^{-1}$  (Griesel y Jagals, 2002). Por tanto, los resultados indican una buena calidad viral del agua de pozo subterránea, así como una baja probabilidad de que el origen de la contaminación fecal sea humano. Ninguna de estas fuentes de agua representa un riesgo a la salud de los consumidores, en términos de la variable de la calidad del agua. Muniesa y Jofré (2004) indican que rara vez se espera que la densidad de fagos y las condiciones fisiológicas bacteriales requeridas para la replicación de SOMCPH se encuentren



health hazard for consumers. Microorganism levels appear to change substantially between seasons, each indicator having a different temporal behaviour that shows an elevated concentration of total coliforms, fecal coliforms and fecal streptococci after run off conditions in the SJCW. This indicates that rain water seems to be the main factor that determines the rate at which bacteria will move away from the source. At first glance, septic facilities were suspect of being the principal contamination sources. However, results suggest that animal sources are the most probable origin, that is, a diffuse one.

Data presented here suggest that the use of different techniques, simple as they may be, are adequate to access effective preliminary information on the microbiological groundwater quality in rural areas and the probable origin of contamination. Furthermore, access to this information can provide further protection of human health.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded in partnership with Japan International Cooperation Agency JICA and carried out within the framework of the "Environmental conservation and participating rural development in mediterranean dryland of Chile" project.

#### LITERATURE CITED

- Avery, S. M., A. Moore, and M. L. Hutchinson. 2004. Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. *Letters Appl. Microbiol.* 38: 355-359.
- Bernhard, A. E., and K. G. Field. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1587-1594.
- Conboy, M. J., and M. J. Goss. 2001. Identification of an assemblage of indicator organisms to assess timing and source of bacterial contamination in groundwater. *Water, Air, and Soil Pollut.* 129: 101-118.
- Daby, D., J. Turner, and C. Jago. 2002. Microbial and nutrient pollution of coastal bathing waters in Mauritius. *Environ. Int.* 27: 555-566.
- Donderski, W., and I. Wilk. 2002. The sanitary state of water in the river Vistula between Wyszogrod and Torun. *Polish J. Environ. Studies* 11: 509-515.
- Farmer III, J.J., B. Davies, W. Hickman-Brenner, A. McWhorter, G. P. Huntley-Carter, M. A. Asbury, C. Riddle, H. G. Wathen-Grady, C. Elias, and G. R. Fanning. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 21: 46-76.
- George, I., A. Anzil, and P. Servais. 2004. Quantification of fecal coliform inputs to aquatic systems through soil leaching. *Water Res.* 38: 611-618.
- Grabow, W. 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA* 27: 251-265.
- Graves, A. K., C. Hagedorn, A. Teetor, M. Mahal, A. M. Booth, and R. B. Reneau. 2002. Antibiotic resistance profiles to determine sources of fecal contamination in a rural Virginia watershed. *J. Environ. Quality* 31: 1300-1308.
- en ambientes acuáticos naturales. Se puede considerar, por tanto, que los SOMCPH detectados provinieron de una fuente alóctona y no de una replicación *in situ*. Sin embargo, el bajo nivel de contaminación viral detectada puede ser el resultado del limitado tamaño de la muestra analizada. La muestra con la mayor cantidad de placas fue tomada durante el verano. No obstante, no se pudo inferir de las pequeñas cantidades de detecciones virales si las ocurrencias de SOMCPH son o no estacionales.

#### CONCLUSIONES

Los niveles de microorganismos indicadores en el agua subterránea y la presencia de patógenos oportunistas demuestran que los pozos están constantemente siendo contaminados, y son, por tanto, propensos a ser un riesgo para la salud de los consumidores. Los niveles de microorganismos parecen cambiar de forma sustancial entre temporadas, con cada indicador presentando un comportamiento estacional diferente, que muestra una elevada concentración de coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales después de condiciones de escorrentía en el CASJ. Ello indica que el agua de lluvia parece ser el factor principal que determina la velocidad a la cual se alejarán las bacterias de su fuente. A primera vista se sospechaba que las instalaciones sépticas eran las principales fuentes de contaminantes. Sin embargo, los resultados sugieren que las fuentes animales son el origen más probable, es decir, una difusa.

Los datos aquí presentados sugieren que el uso de diferentes técnicas, por sencillas que sean, es adecuado para tener acceso a información preliminar sobre la calidad microbiológica del agua subterránea en áreas rurales, así como el probable origen de la contaminación. Asimismo, el acceso a esta información puede brindar una mayor protección a la salud humana.

—Fin de la versión en Español—



- Griesel, M., and P. Jagals. 2002. Faecal indicator organisms in the Renoster Spruit system of the Modder-Riet River catchment and implications for human users of the water. *Water SA* 28: 227-234.
- Leclerc, H., D. A. Mossel, S. C. Edberg, and C. B. Struijk. 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Ann. Rev. Microbiol.* 55: 201-234.
- Leclerc, H., L. Schwartzbrod, and E. Dei-Cas. 2002. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Rev. Microbiol.* 28: 371-409.
- Lucena, F., F. Ribas, A. E. Durán, S. Skraber, C. Gantzer, C. Campos, A. Morón, E. Calderón, and J. Jofré. 2006.

- Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. *J. Appl. Microbiol.* 101: 96-102.
- Muniesa M., and Jofré J. 2004. Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. General Mol. Microbiol.* 86: 65-76.
- Murray, C. J. 2002. Sampling and data analysis for environmental microbiology. *In*: Hurst, C. J., R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, and L. D. Stetzenbach (eds). *Manual of Environmental Microbiology*. Second Edition. ASM Press. Washington DC. pp: 166-178.
- Paradis, S., M. Boissinot, N. Paquette, S. D. Bélanger, E. A. Martel, D. K. Boudreau, F. J. Picard, M. Ouellette, P. H. Roy, and M. G. Bergeron. 2005. Phylogeny of the enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F- ATPase  $\beta$  -subunit. *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiol.* 55: 2013-2025.
- Ribas, F., J. Perramon, A. Terradillos, J. Frias and F. Lucena. 2000. The *Pseudomonas* group as an indicator of potential regrowth in water distribution systems. *J. Appl. Microbiol.* 88: 704-710.
- Skraber, S., B. Gassilloud, and C. Gantzer. 2004. Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3644-3649.
- Tallon, P., B. Magajna, C. Lofranco, and K. T. Leung. 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. *Water, Air, and Soil Pollut.* 166: 139-166.
- Tian, Y. Q., P. Gong, J. D. Radke, and J. Scarborough. 2002. Spatial and temporal modeling of microbial contaminants on grazing farmlands. *J. Environ. Quality* 31: 860-869.
- Troussellier, M., P. Got, M. Bouvy, M. M'Boup, R. Arfi, F. Lebihan, P. Monfort, D. Corbin, and C. Bernard. 2004. Water quality and health status of the Senegal river estuary. *Marine Pollut. Bull.* 48: 852-862.