

Tesis para optar el grado de
Licenciado en Ciencias del Ambiente

**INDICADORES DE
CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA
EN EL ESTUARIO DEL RÍO NEGRO**

Natali Cambuzzi

Director: Dr. Sergio Damian Abate

Co-directora: Dra. Mariza A. Abrameto

UNRN Sede Atlántica

2016



| | |
|--|----|
| RESUMEN | 2 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| HIPÓTESIS | 11 |
| OBJETIVOS | 11 |
| RECURSOS | 12 |
| METODOLOGÍA | 13 |
| ÁREA DE ESTUDIO | 13 |
| Estuario | 13 |
| RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS | 14 |
| PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS | 17 |
| PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS | 17 |
| Método filtración por membrana | 17 |
| Técnica de Tubos Múltiples o método del Número más Probable (NMP): | |
| Coliformes Totales y <i>Escherichia coli</i> | 20 |
| Cepario de <i>Enterococcus</i> | 22 |
| Controles | 24 |
| Análisis estadístico | 24 |
| Niveles guías | 24 |
| RESULTADOS | 25 |
| Indicadores microbiológicos del estuario medio del río Negro, analizados por el test | |
| NMP | 25 |
| Sitios | 25 |
| Estacionalidad | 26 |
| <i>E. coli</i> analizada por el método de filtración por membranas | 26 |
| <i>Enterococcus</i> como indicador de contaminación | 27 |
| Análisis estacional | 27 |
| Comparación entre <i>Enterococcus</i> y <i>E. coli</i> | 30 |
| Indicadores microbiológicos y parámetros fisicoquímicos del agua | 33 |
| Efecto de la marea en el análisis microbiólogo | 33 |
| Cepario de <i>Enterococcus</i> del estuario de río Negro | 36 |
| DISCUSIÓN | 37 |
| CONCLUSIONES | 47 |
| BIBLIOGRAFÍA | 48 |
| ANEXOS | 54 |

RESUMEN

El estuario medio del río Negro es un sistema costero único donde interactúa el ambiente marino y fluvial. Como tal es sensible a cambios del medio natural y especialmente a efectos provenientes de la actividad humana. La mayoría de estos ambientes actúan como colectores de contaminantes, por ello investigar la calidad microbiológica de este estuario cobra importancia al ser un recurso de alto uso para fines recreativos, agrícolas y como fuente de agua para consumo. En esta tesis se evaluaron los parámetros microbiológicos de calidad de aguas empleando el método tradicional de número más probable (NMP) para *E. coli* e incorporando para el género *Enterococcus* el método de filtración por membrana, a fin de realizar una comparación entre ambos métodos. Este indicador ha sido elegido dado que estos microorganismos son capaces de sobrevivir durante períodos mayores en ambientes dinámicos como el estuario. Se estudió el efecto del rango de mareas en los recuentos y se realizó un cepario con aislamientos de *Enterococcus* spp. Se establecieron once sitios de muestreo estudiados en campañas estacionales. Los resultados evidenciaron altas varianzas para la técnica de NMP (muestrales y metodológicas) que no se presentan en el recuento de UFC de *Enterococcus* spp. La presencia y persistencia de *Enterococcus* indicó la eficiencia como indicador para todos los sitios. Se reconoce *E. coli* como un indicador válido para puntos de contaminación reciente y, dada su aplicación histórica, resulta de valor para estudiar fluctuaciones entre largos períodos, ya que no se cuenta con datos históricos de UFC de *Enterococcus* por el método de filtración de membrana.

No se obtuvieron diferencias significativas en la variabilidad de los resultados entre baja y pleamar. Sin embargo, considerando los promedios, hay discrepancias según el sitio de muestreo. Se observaron altos recuentos de ambos indicadores durante el muestreo de invierno, luego de fuertes lluvias en la parte alta de la cuenca.

El conjunto de resultados analizados muestra evidencias de niveles bacterianos que podrían vincularse con efectos antrópicos. Las plantas de tratamientos cloacales de la Comarca Viedma-Carmen de Patagones se encuentran limitadas en su funcionamiento por el crecimiento poblacional; esta situación, sumada al aporte de pluviales que llegan sin previo tratamiento al río, estaría generando una degradación en algunos puntos del

ecosistema estudiado. La información generada podría facilitar las políticas públicas orientadas a la toma de medidas tendientes a limitar el impacto antrópico, evitando que la degradación observada se incremente, con el objeto de preservar una fuente importante para la vida del hombre en la región, y para el mantenimiento de la biodiversidad.

Palabras claves: río Negro, estuario, indicadores de contaminación fecal, *E. coli*, *Enterococcus*, número más probable, filtración por membrana, análisis de agua.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación comenzó gracias a la convocatoria a Becas de Estímulo a las vocaciones científicas EVC-CIN 2013, realizada en el área temática eco-hidrología. Título del Plan de Trabajo: “Relación entre parámetros físicos ambientales e indicadores fecales de contaminación”. Director: Abrameto Mariza, quien puso a disposición el Laboratorio de contaminación ambiental del Campus de la Sede Atlántica; Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente (UNRN). Además, guió y acompañó en todos los muestreos durante un año de trabajo.

Se pudo continuar gracias al Laboratorio Patagónico de diagnóstico Agroalimentario, dirigido por el Dr. Sergio D. Abate, quien facilitó materiales y equipos fundamentales para la investigación. En ese sentido, debo agradecer a la Funbapa, organización a la que pertenece dicho laboratorio.

Aguas Rionegrinas: la jefa de laboratorio, bioquímica Gabriela Bovo, quien proporcionó para cada muestreo un equipo de filtración.

Por otro lado, al Sr. Jorge Rodríguez propietario de chacra “La Carreta” quien permitió establecer un sitio de muestreo en su propiedad.

La Lic. Marina Winter colaboró en la elaboración de las figuras de los sitios de muestreo.

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural indispensable para el desarrollo de la vida y uno de los principales reguladores de los ecosistemas naturales. Es el componente más abundante e importante de nuestro planeta; el hecho de que todos los seres vivos dependan de la existencia del agua reafirma su importancia vital que, enmarcada en el contexto social, económico y natural o ecológico, es definida como valor económico del ecosistema (O'Higgins *et al.*, 2010). Es relativamente escaso: de los casi 1.4 billardos de km³ de agua del planeta, sólo el 2,6 % (36 millones de km³) corresponden a las reservas de agua dulce. Del total de agua dulce, el 75 % está en los casquetes polares y glaciares, el 24,6 % en los acuíferos profundos y superficiales, el 0,3 % en lagos, el 0,6 % constituye la humedad del suelo y el 0,03 %, escurrimiento superficial (Delgado-Ramos, G. C., 2006). El agua dulce es un recurso frágil y agotable: el uso inadecuado compromete su disponibilidad, y su degradación puede ser irreversible. Se ha afirmado que su “distribución y calidad comienzan a tener cambios importantes debido a los despilfarradores consumos de ciertos asentamientos humanos y modos de producción; ello viene reflejado en una escasez del líquido, por su contaminación en muchos casos de modo irreversible” (Delgado-Ramos, G. C., 2006). Se estima que en la actualidad, 1.8 billones de personas usan como fuente de bebida agua contaminada con materia fecal (Bain *et al.*, 2014).

Los sistemas acuáticos continentales más importantes son los ríos, que transportan al mar el exceso de agua de fuentes naturales (lluvias, nevadas) así como residuos líquidos de origen antrópico. Los estuarios son aguas costeras que se extienden hasta el límite efectivo de la influencia de las mareas, donde el agua de mar ingresa por una o más conexiones con el mar abierto o cualquier otro cuerpo costero de agua salina. Puede sustentar especies biológicas eurihalinas, durante la totalidad o una parte de su ciclo de vida (Piccolo & Perillo, 1997). Estos ecosistemas comenzaron a estudiarse globalmente desde hace relativamente poco tiempo, como cuerpos de agua protegidos, colectores y concentradores de nutrientes (Piccolo & Perillo, 1997). Sus alrededores están bajo rápida modificación debido a la escalada de población costera y su rápido desarrollo (Couillette & Noble, 2008). Sus recursos brindan diversos beneficios económicos, como actividades turísticas y producción de alimentos mediante pesca o piscicultura. Además ofrecen beneficios culturales como recreación, conocimiento científico y valor estético (USEPA, 2012). A su vez, entre los beneficios ecológicos se destaca la oferta

de una gran variedad de hábitat y refugios para la fauna acuática y terrestre. Estos ambientes cumplen la función de trampa para los sedimentos finos, modificando los tiempos de residencia del agua, con influencia sobre los ciclos biogeoquímicos y funcionando como reservorio temporal de nutrientes, contaminantes y sedimentos (Perillo, 2013). Son fácilmente afectados por contaminantes de origen antrópico; la creciente preocupación sobre este punto ha dado lugar a gran número de estudios en el mundo, por ejemplo los estuarios desde el noreste hasta la costa sur de Portugal incluyendo el estuario Ria de Aveiro, Tagus, Sado y Ría Formosa son contaminados por metales de origen antrópico (Reis *et al.*, 2013). En el caso particular del estuario Sado, aunque tiene la designación de reserva natural, su ubicación cerca de zonas industriales y urbanas ha llevado a conflictos políticos entre la conservación y el desarrollo (Moreira, 2010). Existen reportes de fuentes no puntuales de modificación del equilibrio agua-sedimento, como ciertos eventos climáticos, lluvias, erosión, etcétera. En el estuario del río Newport, Carolina (USA), se ha observado el aumento en la concentración de bacterias fecales por encima de valores límites aceptables, desencadenando la clausura de sitios balnearios y de pesca. En este caso, como consecuencia de la disminución del régimen de lluvias, se ha planteado que una población reservorio de bacterias fecales proveniente de los sedimentos se movilizó hacia la fase acuosa del ecosistema (Couillette & Noble, 2008). Lo contrario se dio en el estuario del río Baracoa, Cuba, donde se registraron valores críticos en meses de fuertes y constantes precipitaciones, situación que puede generar la movilización de microorganismos del sedimento o bien el influjo de poblaciones microbianas mediante colectas pluviales contaminadas (Cobas *et al.*, 2010).

Generalmente se reconocen como principales causas de estas modificaciones al incremento poblacional y desarrollo costero creciente: en el estuario de Bahía Blanca se publicaron estudios de calidad de agua desde 1997, y a partir del 2001 se realizaron estudios integrales en aguas y sedimentos (IADO, 2008). La principal fuente de aporte de contaminantes no fue industrial sino urbana. En este estuario se procedió al cierre del balneario Maldonado al no poder asegurar la calidad higiénico-sanitaria de sus aguas: Streitenberger y Baldini (2010) demostraron que el mal funcionamiento de la planta de tratamiento de líquidos cloacales de la Tercera Cuenca habría sido la fuente de contaminación en este balneario. En la ciudad de Río Cuarto, provincia de Córdoba, cuya población supera los 160.000 habitantes, el río Chocancharava sufre cambios

importantes al recibir aportes de descarga cloacal sin tratamiento adecuado, a unos seis kilómetros aguas abajo de la ciudad de Río Cuarto. Con fuertes precipitaciones pluviales ha aumentado entre seis y diez veces el promedio geométrico del número de bacterias, con relación a lo registrado en condiciones estables del sistema (Rodríguez *et al.*, 2002).

Por otro lado, un reto importante consiste en estudiar la reserva genética de ciertas poblaciones microbianas de interés ambiental, tendiente a garantizar la biodiversidad ante variaciones generadas por el cambio climático así como por eventuales acciones antrópicas o naturales que modifiquen los nichos ecológicos donde estos microorganismos habitan, poniendo en riesgo su supervivencia (Sosa *et al.*, 2004; Elsie *et al.*, 2009). En este marco, resulta de interés estratégico contar con cepas de origen local, regional, y nacional, que puedan constituir material de referencia, con la potencialidad de agregar información al uso de las cepas de referencia importadas (INTI, 2015).

La contaminación fecal de las aguas superficiales que sirven como fuente de abastecimiento es uno de los problemas prioritarios para la salud humana y ambiental (Arcos Pulido *et al.*, 2005). La gestión inapropiada de las aguas residuales urbanas ha constituido la causa principal de contaminación microbiológica en la mayoría de las fuentes de agua superficial, situación que se ha vinculado al incremento del riesgo de múltiples enfermedades, por lo que se ha optado por el estudio de microorganismos indicadores de contaminación fecal, como la especie *Escherichia coli*, los Coliformes Totales (CT) que comprende los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, y los Coliformes Fecales (CF), un subgrupo de los CT que por su termotolerancia se asume poseen un origen intestinal (Larrea Murrell *et al.*, 2013). Actualmente su utilidad como únicos indicadores está siendo cuestionada ya que algunas especies de Coliformes son habitantes de otros ambientes naturales tales como suelo, madera húmeda, etcétera. En el caso de Coliformes Fecales son más específicos, pero pueden incluir géneros como *Klebsiella*, *Enterococcus* y *Clostridios* (Larrea Murrell *et al.*, 2013); por otro lado existen coliformes de origen fecal que carecen de capacidad de termotolerancia por lo tanto su identificación y recuento es imposible si se considera solo el grupo de los CF en estudios ambientales.

Tanto los CF como los CT se suelen investigar mediante el método de dilución en serie de tubos o número más probable (NMP) siguiendo métodos estandarizados (Standard

Methods, 2012 o equivalentes) que incluyen la descripción precisa del medio de cultivo y las condiciones de incubación. Este método no realiza el recuento de la totalidad de coliformes en la muestra, sino que realiza una inferencia estadística con un porcentaje de certeza, mediante la estimación de un intervalo de confianza. Para mejorar la precisión del método, se ha sugerido la conveniencia del uso del método de recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante la filtración por membrana de 100 ml de muestra (Standard Methods, 2012). No obstante, la posibilidad de realizarlo y el tipo de medio de cultivo a emplear se encuentran en estrecha dependencia con las características del agua a estudiar, por lo que no se encuentran estandarizados a nivel global.

Por esta razón, hace algunos años se está revisando la utilidad de las enterobacterias (CT y CF) como indicadores de contaminación fecal, sugiriendo la incorporación de otros géneros como los *Enterococcus*, que habitan el intestino, sobreviven más tiempo en el ambiente en relación a los coliformes y en su mayoría no son habitantes ambientales normales (Suarez 2002; Murrel *et. al.*, 2013). Los *Enterococcus* pueden estudiarse utilizando métodos estandarizados de filtración de membrana en el caso de evaluar agua de consumo humano (ISO 7899-2) así como de origen ambiental (Standard Methods, 2012). Si bien no se cuenta con una estandarización a nivel global para uso en aguas ambientales, los medios de cultivo utilizados son lo suficientemente selectivos como para asegurar la inhibición de la microbiota acompañante de la muestra que podría interferir con el recuento de colonias del microorganismo estudiado.

En los balnearios (cuerpos de agua con creciente demanda social y económica), para asegurar la calidad de agua recreacional tanto de contacto primario (natación) como secundario (canotaje, pesca) es tradicional el estudio de la concentración de *E. coli* y Coliformes Fecales como bacterias indicadoras de contaminación fecal (Folabella *et al.*, 2006). El análisis de *Enterococcus* ha sido recomendado como indicador de contaminación fecal en aguas recreacionales, con diversos grados de salinización y de diverso origen, por la U.S. Environmental Protection Agency-E.P.A.(Messer *et al.*, 1998) ya que son microorganismos resistentes a las condiciones de estas aguas (mayor rango de temperaturas, fuerza osmótica): al tener mayor sobrevivencia que los coliformes en aguas con características extremas, ser más resistentes a la desecación y a la cloración, constituirían indicadores capaces de identificar contaminaciones intermitentes. Esta recomendación se basó en la demostración de una relación directa

entre un incremento de la cantidad de *Enterococcus* en agua y el aumento de enfermedades asociadas a la natación en ambientes de agua marina (Vergaray *et al.*, 2007; Levesque & Gauvin, 2007; Rodríguez, 2011).

Entre las cuencas de la Patagonia argentina, el río Negro es una de las más estudiadas, no sólo por su extensa área de 140.000 km², sino por las actividades antrópicas que se desarrollan en sus valles (Alto, Medio e Inferior), que a través de diversas escorrentías generarían las presumibles fuentes de contaminación (Abrameto *et al.*, 2004).

En el Valle Inferior, el área urbana de mayor densidad de población está comprendida principalmente por el conurbano de Viedma y Carmen de Patagones, aunque también deben considerarse localidades de menor densidad poblacional como San Javier y Guardia Mitre, capaces de influir en las características de sus aguas mediante sus descargas de aguas residuales.

En la margen sur del río Negro, a dos mil metros de la ciudad de Viedma corriente abajo, se encuentra la planta de tratamientos cloacales de esta localidad (Lat. 40°50'21.91"S; Log. 62°56'45.81"O), que actualmente vierte al río Negro el agua residual cumpliendo parcialmente con los parámetros permisibles de vuelco (Fernandez *et al.*, 2013). La carga orgánica de ingreso a la planta presumiblemente sobrepasaría la capacidad de depuración, ya que dicha planta habría sido diseñada para una población de 50.000 habitantes, que ha incrementado en un 6,5 % en los últimos años (INDEC, 2010; Patagonia ambiental, 2008; Ecocomarca, 2008). Esta situación genera procesos anaeróbicos con emisiones gaseosas, que alcanzan barrios del sudeste de la ciudad. Como parte del estudio de relocalización de plantas de tratamiento, la AIC realizó a partir del año 2009 la evaluación de impacto ambiental del proyecto ejecutivo (AIC-SGA 2011) y el Departamento Provincial de Aguas (DPA) contrató en el año 2010 un trabajo de consultoría con el objeto de proponer un modelo teórico de producción agrícola para utilizar aguas residuales (Fernandez *et al.*, 2013). Además, en la margen norte del río Negro, en la provincia de Buenos Aires, está localizada la planta de tratamientos residuales de la ciudad de Carmen de Patagones (Lat.40°49'21" Log.62°57'22") que vierte residuos en el río en proximidad a la comarca Viedma-Carmen de Patagones (Marigual, 2015). Dicha planta cuenta con el mismo inconveniente que el de la provincia de río Negro mencionado anteriormente, ya que no se ha adecuado al crecimiento poblacional experimentado en las últimas décadas.

Los habitantes de la comarca Viedma-Patagones acceden a las aguas del río Negro mediante contacto primario y secundario. Para el primer caso, es destacable el incremento del uso acuático con fines deportivos, recreativos y culturales. Un ejemplo lo constituye la competencia de High Diving, que se realizó por primera vez en Sudamérica, denominada Un Salto al Fin del Mundo (TyC Sports, 2015; La Nación, 2015) y tiene alcance internacional. Otro evento de semejantes características es el festival acuático y competencia internacional de natación de aguas abiertas “La Patagones-Viedma”

Constituyen ejemplos de eventos que propician contacto de tipo secundario, actividades deportivas-recreativas en diferentes clubes náuticos que se emplazan en ambos márgenes del río en la comarca Viedma-Patagones, competencias tanto de alcance internacional como la “Regata del Río Negro”, y de alcance nacional como la competencia “Gran Prix Nacional de Clase Nacional Pampero”.

Por otro lado, se ha observado un creciente uso de agua cruda de río para riego en espacios públicos, (plazas, boulevares, etcétera) y los correspondientes a la urbanización río arriba y río abajo, hacia ambos extremos de la Comarca.

En los últimos años las iniciativas generadas le dan a este recurso mayor trascendencia, concientizando sobre la conservación de un ecosistema sano para el bienestar humano, abordando los desafíos en la gestión del recurso, dando mayor importancia a la calidad del agua y exhortando a gobiernos, organizaciones, comunidades y personas para que adopten medidas y realicen actividades de prevención y concientización (ONU, 2012).

Por estas razones, cobra importancia la necesidad de contar con investigaciones independientes, actualizadas, dirigidas a conocer la prevalencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal en el estuario medio del río Negro, lo que constituirá una línea de base frente al futuro desarrollo de la región.

HIPÓTESIS

El estuario del río Negro está atravesando un proceso de degradación microbiológica de origen urbano.

OBJETIVOS

- 1) Investigar parámetros microbiológicos de calidad de agua del estuario de río Negro.**
 - a) Mediante la prueba de NMP investigar los valores de Coliformes Totales y *E. coli*.

- 2) Evaluar alternativas al método de NMP de *E. coli* en la investigación de la contaminación fecal en aguas del estuario de río Negro.**
 - a) Estudiar el desempeño del método de filtración por membrana para cuantificar Coliformes Totales, *E. coli* y *Enterococcus*.
 - b) Evaluar el desempeño del recuento de miembros del género *Enterococcus* como indicador de contaminación fecal.

- 3) Evaluar el efecto de la marea en el recuento de indicadores de contaminación fecal.**
 - a) Evaluar el efecto de la marea en los resultados cuantitativos de análisis microbiológicos de indicadores de contaminación fecal en el estuario interno del río Negro.

- 4) Construcción de un cepario con aislamientos de *Enterococcus* provenientes del estuario de río Negro.**

RECURSOS

Laboratorios de contaminación ambiental del Campus de la Sede Atlántica; Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente, (UNRN): cuenta con infraestructura y equipamiento para trabajo de campo, laboratorio y gabinete. Equipado con heladeras, freezer, conservadoras, equipos de vacío, droguero, material de vidrio, micropipetas y botellas dispensadoras de líquidos, destilador de agua, campana extractora, mechero, pHmetro, estufa de secado, balanza analítica digital, balanza platillo horizontal. El gabinete cuenta con computadora, acceso a internet y biblioteca electrónica de Ciencia y Tecnología de la Nación, software estadístico Infostat, 2014. La UNRN posee aprobación por el RENPRE para la adquisición y manejo de drogas controladas por el Registro Nacional de Precursores Químicos (RENPRE).

Laboratorio Patagónico de Diagnóstico Agroalimentario de la Funbapa: cuenta con equipamiento calibrado y certificado para el trabajo microbiológico de laboratorio, ya que opera bajo un sistema de gestión de la calidad basado en la norma ISO 17025. Cuenta con estufas de incubación a diferentes temperaturas, cabina de microbiología con mecheros aprobados por autoridad reglamentaria y cabina de bioseguridad con flujo laminar vertical tipo AII, material de vidrio calibrado, microondas, baño termostático, autoclave conforme exigencias de ART, balanza analítica y juego de pesas patrón calibrado, heladeras, diversos freezers, equipo medidor de pH y conductividad para garantía de calidad del agua destilada como insumo de laboratorio. Todos los equipos se encuentran calibrados, y se cuenta con sistema de trazabilidad para garantía de mediciones.

Fuentes de financiamiento:

*Proyecto de investigación Acreditado por la UNRN, “Hidro geoquímica de la interacción agua superficial-agua subterránea en el valle inferior del río Negro” (PI 40-C-155-2011-2015, UNRN-Sede Atlántica) dirigido por la Dra. Mariza A. Abrameto.

*Beca EVC-CIN convocatoria 2013: Área temática: Eco-hidrología. Res: P. N° 230/13.

Título del Plan de Trabajo: “Relación entre parámetros físicos ambientales e indicadores fecales de contaminación”. Director: Abrameto Mariza.

*Laboratorio Patagónico de Diagnóstico Agroalimentario, DT Dr. Sergio Abate.

METODOLOGÍA

ÁREA DE ESTUDIO

En el norte de la región Patagónica se encuentra situada la cuenca de los ríos Limay, Neuquén y Negro. Drena una superficie de 140.000 Km² y constituye el sistema hidrográfico más importante de todos los que se extienden íntegramente en el territorio de la nación Argentina (AIC, 2016). En este trabajo se seleccionó como área de estudio el estuario del río Negro.

Estuario

El estuario está localizado al noreste de la Patagonia, en el departamento de Adolfo Alsina, entre las provincias de Río Negro, y Buenos Aires, Argentina. Se encuentra en un antiguo valle fluvial, planicie costera que se extiende desde la desembocadura hasta primera angostura, en un recorrido aproximado de 70 km, para alcanzar la zona netamente fluvial en Guardia Mitre. Su delta de reflujo exporta sedimento fino del sistema, formando bancos alineados de arena en paralelo: dos flujos continuos ingresan sedimento fino y lo acumulan como parte del ciclo en la zona inferior del estuario. Varias islas se ubican entre la parte más alta hacia la más baja del estuario. Se caracteriza por un rango de mareas de 6 horas, que genera fluctuaciones de nivel tan notorias como 4,4 metros (pleamar) a 0,71 metros (bajamar), por lo que es clasificado como macromareal (Píccolo & Perillo, 1997).

El área de estudio comprendió un sector del estuario medio del río Negro, ubicado entre la primera descarga de excedentes de riego conocida como “El Molino” y Punta Médanos en la zona conocida como “El Pescadero” (Figura 1). El clima es árido a semiárido, de tipo mesotermal con poco o ningún exceso de agua. La temperatura media anual es de 16°C. La precipitación media anual es de 350 mm. Los vientos predominan del oeste y son más intensos en verano (Abrameto *et al.*, 2013).

RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS

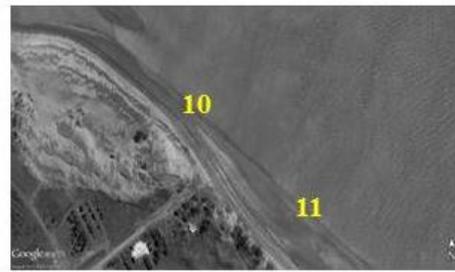
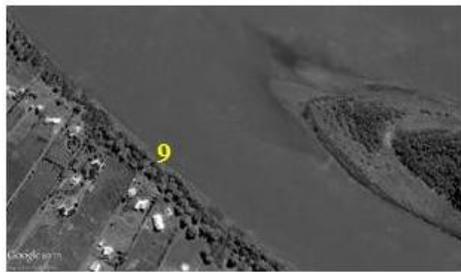
Durante un período de un año se desarrolló una campaña de muestreo trimestral a partir de febrero de 2014. Se seleccionaron nueve sitios de muestreo elegidos de acuerdo a la importancia relativa de cada uno por el uso del recurso hídrico (Tabla 1). Los trimestres coincidieron con las diferentes estaciones del año, por lo que se realizó un análisis de características microbiológicas del agua en función de las cuatro estaciones y las características climáticas de cada una. Se procedió a la recolección de muestras durante marea baja para desprestigiar el efecto de dilución que podría generar la acumulación de agua durante la creciente. La toma de muestras se realizó en forma directa o manual, empleando recipientes estériles de un litro, siempre contra corriente, a una profundidad promedio de 0,5 metros desde la superficie, a una distancia de la costa que garantizara una profundidad del punto de muestreo de 1,2 metros, de manera que la muestra sea tomada entre el fondo y la superficie del río. Desde el momento de la toma hasta su procesamiento en el laboratorio antes de cumplir las dos horas, las muestras se mantuvieron refrigeradas (Standard Methods, 2012).

A fines de observar el efecto de la marea se seleccionaron tres puntos de muestreo: sitios 6, 7 y 8 (Figura 1). El criterio de selección de los mismos se basó en que constituyen estaciones de alto uso recreacional y contacto directo con la población de la región. En cada uno de estos puntos se tomaron muestras por triplicado, en alta y baja, en un período de 24 hs.

Tabla 1: Localización geográfica de los sitios de muestreo y clasificación por tipo de usos.

| Sitios de muestreo | Coordenadas | Usos |
|----------------------------|--------------------------------|------------|
| 1. Dren el molino (Izq*) | 40°47'51.14"S 63°01'39.69"O | Secundario |
| 2. Dren el molino (Der.**) | 40°47'51.31"S 63°01'39.19"O | Secundario |
| 3. Toma de agua (Izq) | 40°48'03.33"S 63°00'37.12"O | Primario |
| 4. Toma de agua (Der) | 40°48'03.16"S 63°00'36.62"O | Primario |
| 5. Barco hundido | 40°47'59.01"S 62°59'49.60"O | Primario |
| 6. Salida pluvial | 40°47'59.62"S 62°59'47.34"O | Primario |
| 7. Balneario | 40°48'01.28"S 62°59'43.99"O | Primario |
| 8.Nautico | 40°49'01.60"S 62°58'27.68"O | Primario |
| 9. La Carreta | 40°52'19.74"S 62°55'04.02"O | Secundario |
| 10.Pescadero (Izq) | 41°01'15.37"S 62°47'49.69"O | Secundario |
| 11.Pescadero (Der) | 41°01'20.33"S 62°47'44.55"O | Secundario |

"Elaboración propia" *: Izquierda; **: Derecha



Referencias: 1. Dren el molino (Izq); 2. Dren el molino (Der); 3. Toma de agua (Izq); 4. Toma de agua (Der); 5. Barco hundido; 6. Salida pluvial; 7. Balneario; 8. Náutico; 9. La carreta; 10. Pescadero (Izq); 11. Pescadero (Der).

Figura 1: Sitios de muestreo en el estuario del río Negro.

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

In situ el parámetro analizado fue el pH con multímetro digital ADWA210. La conductividad eléctrica se midió *ex situ*, en laboratorio, empleando conductímetro digital Consort C562.

PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

Método filtración por membrana

Se utilizó un equipo de filtración para vacío de acero inoxidable y mechero a gas para mantener el sistema en condiciones de esterilidad. La muestra se filtró usando membranas estériles reticuladas, de acetato de celulosa de 0,45 μm (Gamafil).



Figura 2: Equipo de filtración al vacío utilizado en metodología de filtración por membranas.

Enterococcus:

Para su determinación se empleó Agar selectivo Slanetz y Bartley (Biokar^R), ver anexo. Una vez finalizada la filtración de 100 mL de la muestra, las membranas se depositaron sobre las placas de agar, que fueron incubadas durante 48 hs a 35 ± 2 °C. Para realizar el recuento se consideraron colonias de color rojo- rosados, las cuales constituyeron la primera lectura de colonias sospechosas (Figura 3). Para la confirmación del resultado se transfirió cada membrana a otra placa con medio Agar Bilis Esculina Azida (Britania^R)

que se incubó 3 hs a 44 C°. En este medio se contaron las colonias capaces de hidrolizar la esculina dando lugar a una coloración oscura en el agar, entre marrón a negro (Figura 4). Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonia (UFC) en 100 mL de la muestra (Couillette & Noble, 2008).

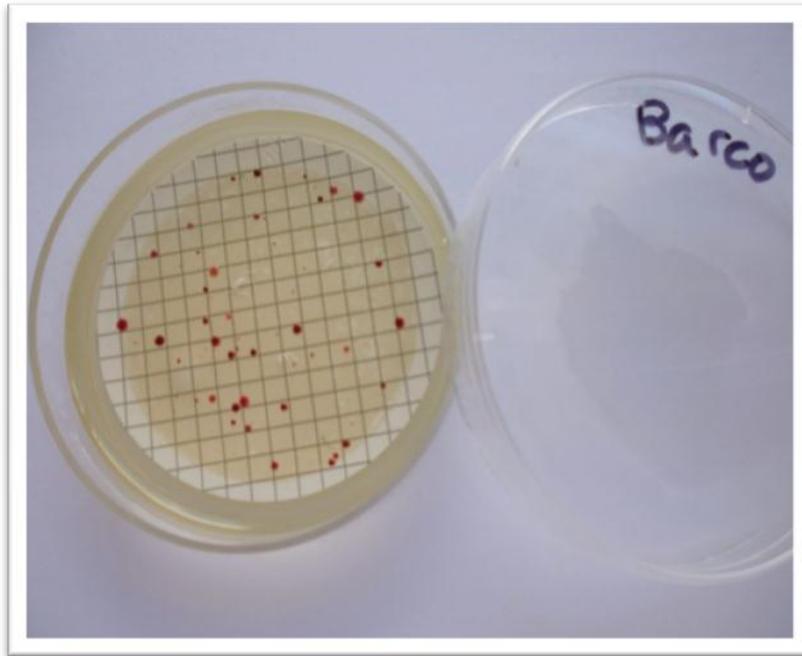


Figura 3: Colonias sospechosas de *Enterococcus*, en Slanetz y Bart ley.

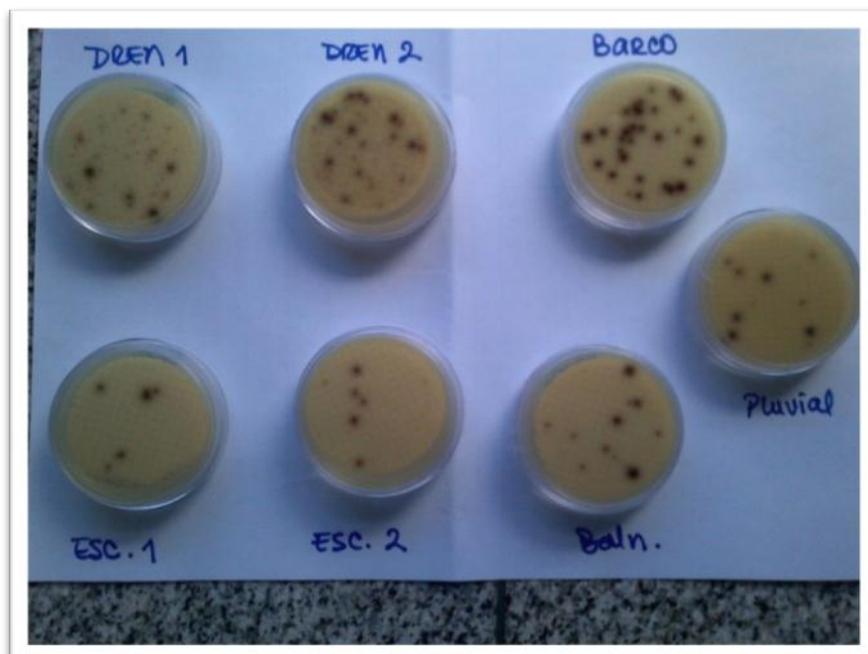


Figura 4: Colonias de *Enterococcus* de muestras provenientes de diferentes puntos de muestreo.

E. coli y Coliformes:

Para la determinación de Coliformes Totales y *E. coli* se realizó una dilución de cada muestra con un factor 1/100 (1mL de muestra en 99 mL de agua estéril), con el fin de disminuir la cantidad de microorganismos contaminantes habitantes normales del agua capaces de crecer en el medio de cultivo seleccionado (Part 9000B Standard Methods, 2012). El medio de cultivo escogido en esta tesis para estudiar Coliformes y *E. coli* (Tergitol Agar TTC - Biokar^R) refuerza la necesidad de la dilución anteriormente planteada, dado que el mismo carece de capacidad inhibitoria y por el contrario está diseñado para recuperar con mayor eficiencia bacterias en estado “viable no cultivable” por estrés físico químico. La dilución se pasó por la membrana filtrante Gamafil, para luego transferirla a una placa con medio de cultivo Tergitol Agar TTC. Las placas con este medio se incubaron durante 48 hs a 35 ± 2 °C, y luego se realizó la lectura, expresando los resultados como unidades formadoras de colonia (UFC) de coliformes en 100 mL de muestra. Para identificar las colonias de coliformes se siguieron las indicaciones estandarizadas (ISO 9308): selección de colonias con un halo amarillo en el agar, consecuencia de la disminución de pH por la utilización de lactosa (Figura 5), inversión de placa, selección de aquellas con un centro más oscuro y realización de las siguientes pruebas metabólicas confirmatorias: oxidasa, producción de Indol y presencia de β glucuronidasa mediante la degradación del sustrato MUG manifestando fluorescencia en presencia de luz ultravioleta.

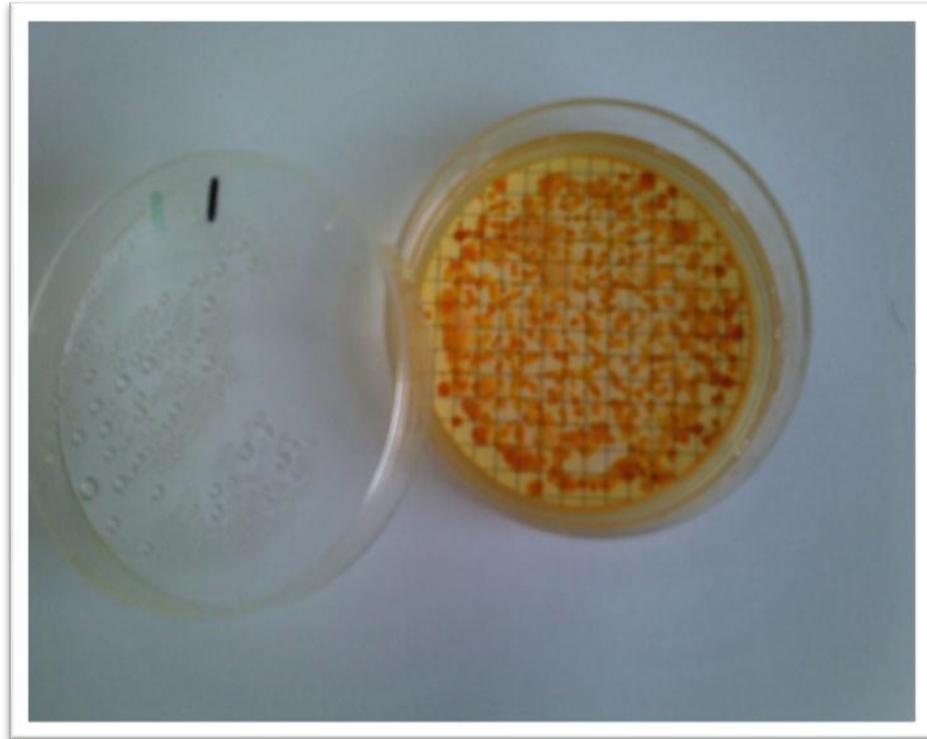


Figura 5: Colonias positivas de *E. coli* en TTC. Se muestra la escasa capacidad de selección, y el crecimiento confluyente que dificulta el aislamiento y recuento de colonias sospechosas al evaluar el agua sin diluciones previas, proveniente de los sitios seleccionados.

Técnica de Tubos Múltiples o método del Número más Probable (NMP): Coliformes Totales y *Escherichia coli*

Para el recuento por el NMP se realizaron diluciones seriadas en base 1/10. Para ello se inocularon los medios de cultivo por triplicado con los siguientes volúmenes: 10, 1 y 0,1 mL (De Man, 1983) . Se utilizó caldo Fluorocult, Lauryl Sulfate Broth (Merck[®]). Luego de la siembra se incubó durante 48 hs a 35 ± 2 °C y se realizó la primera lectura para coliformes totales, identificados por turbiedad y producción de gas (Figura 6). Para confirmar la presencia de *E. coli* se realizó la evaluación de fluorescencia por liberación de fluorocromo tras la acción de la enzima β -glucuronidasa (Figura 7), y la producción de Indol en aquellos tubos fluorescentes (Figura 8). La interpretación de los resultados se realizó usando una tabla de tubos múltiples estandarizada para muestras de 100 ml, con una confianza del 95% (De Man, 1983).

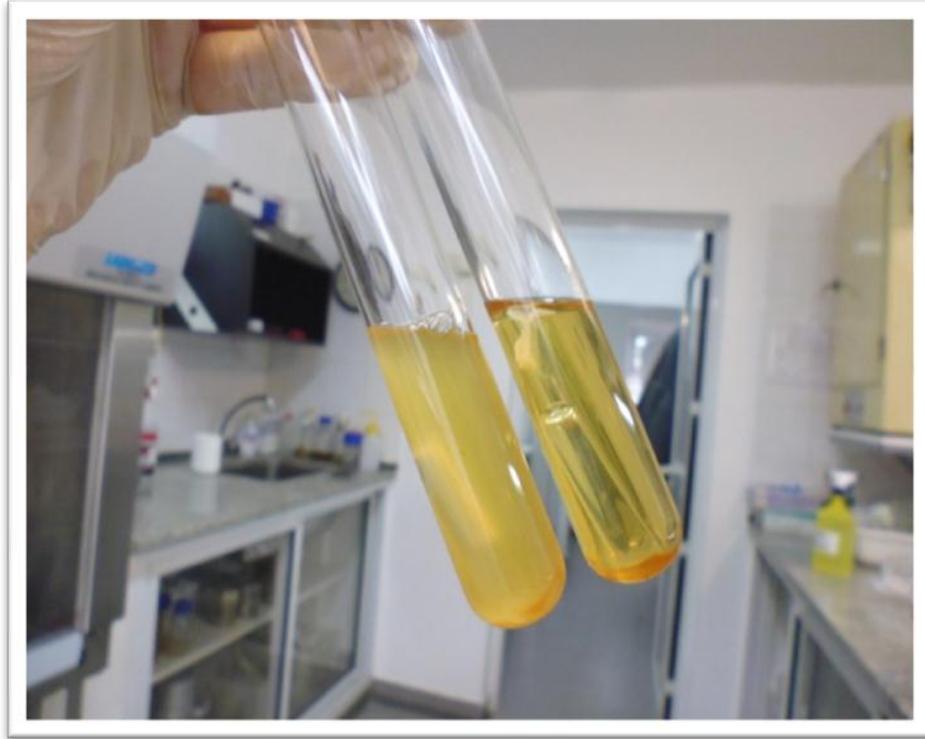


Figura 6: Tubos Coliformes Totales positivo (turbiedad y producción de gas), y control negativo en medio Fluorocult.

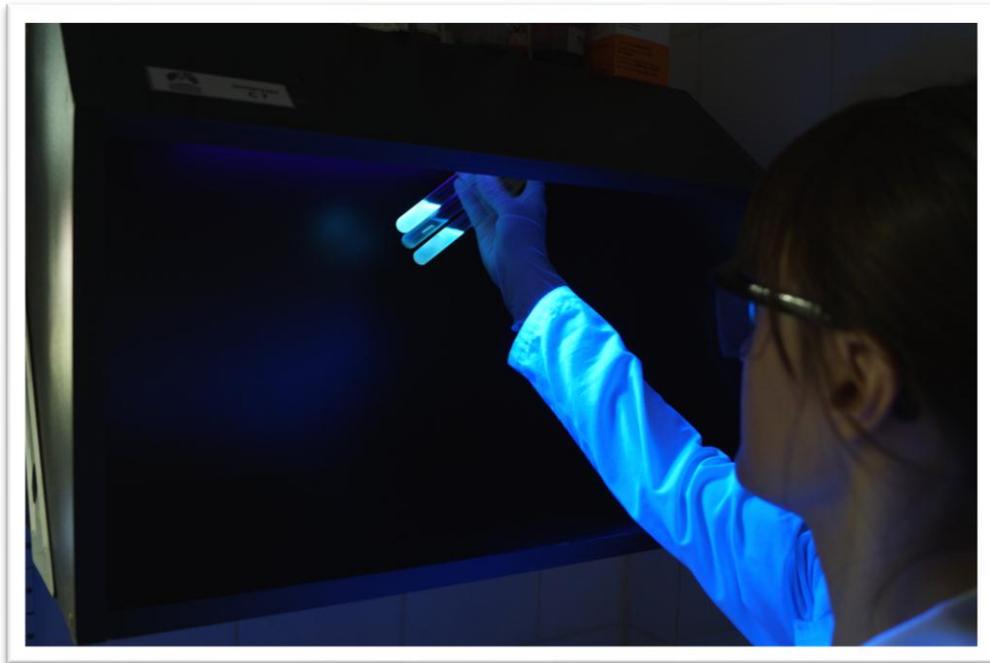


Figura 7: Acción de enzima β - glucuronidasa de *E. coli* positivas.

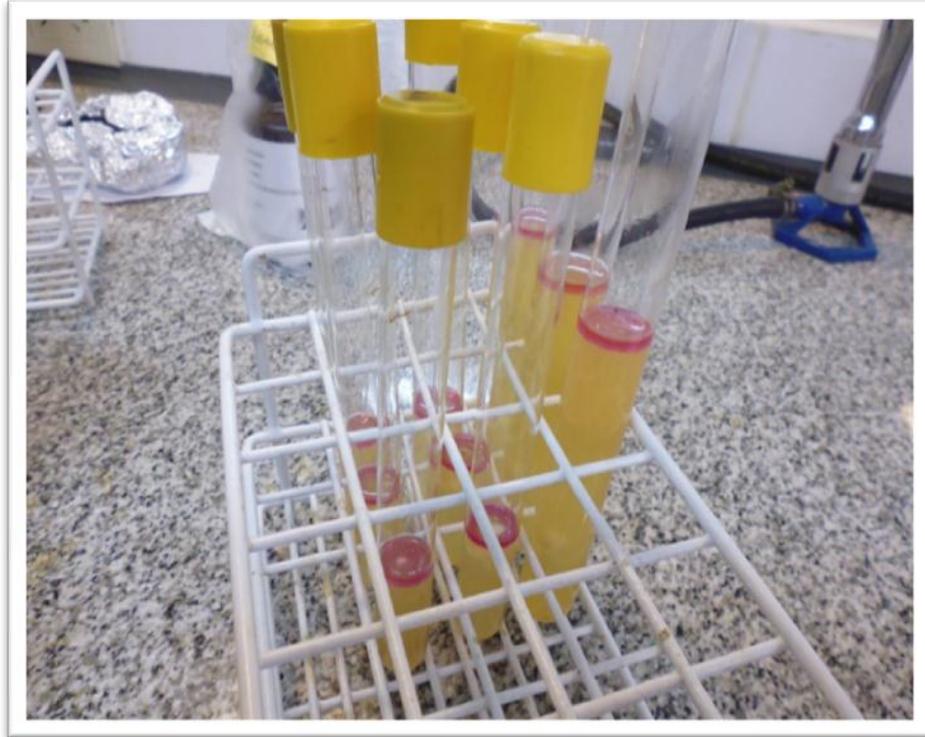


Figura 8: Tubos Indol Kovaks positivos para *E. coli*

Cepario de *Enterococcus*

A partir de cultivos positivos en medio selectivo/diferencial, Slanetz y Bartley (Biokar^R) se trasladó la membrana a una placa con medio Agar Bilis Esculina Azida (Britania^R). Para asegurar el grado de pureza de la colonia elegida, las colonias positivas a ambas pruebas se repicaron en agar nutritivo e incubaron 48 hs a 35°C. En aquellos casos que se observaron diferencias en la morfología de la colonia en una misma placa, se realizó un nuevo repique en Agar Nutritivo por 24 hs a 35°C. Al obtener las colonias puras (observación de rasgo de colonias iguales) se confirmó por tinción de Gram y observación microscópica de características celulares (forma cocoide agrupada en cadenas) así como mediante la prueba de catalasa (Figura 9). Las cepas confirmadas se preservaron por congelamiento con agentes crioprotectores (García López & Uruburu Fernández, 2000). Para ello, cultivos frescos se colocaron en crioviales con caldo Tripteina Soya y glicerol al 20% estériles, e inmediatamente fueron congeladas a -20°C en freezer (Figura 10).

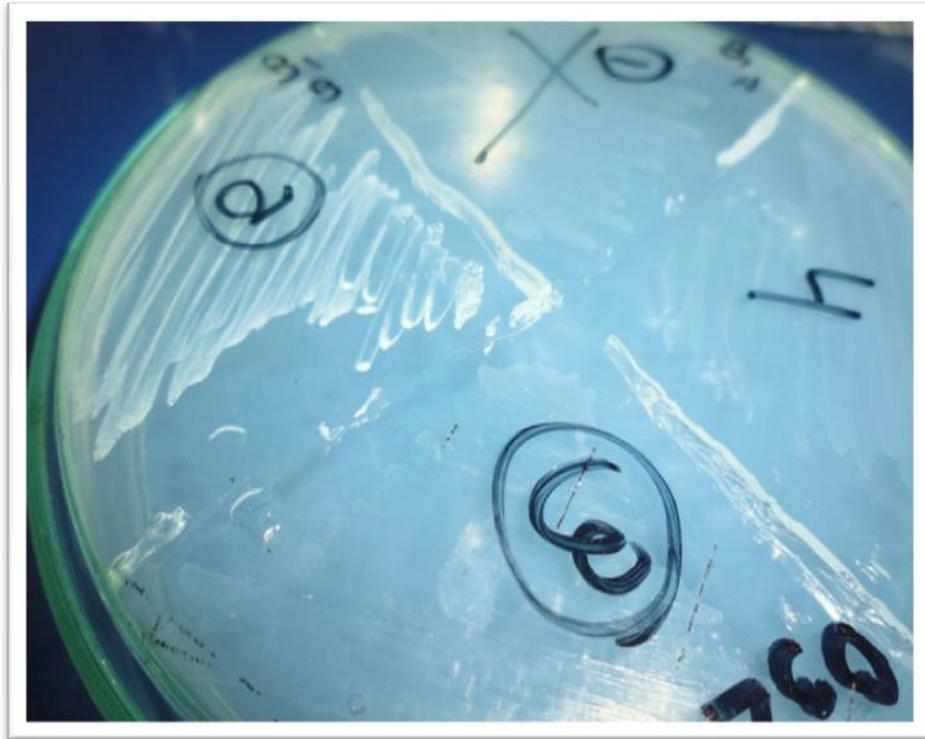


Figura 9: Desarrollo de *Enterococcus* en medio nutritivo.



Figura 10: Colección de *Enterococcus* obtenidos en el estuario medio del río Negro en el año 2014-2015.

Controles

En cada campaña de muestreo se utilizaron cepas de referencia durante las actividades de laboratorio. Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 25922 de *E. coli* y como control negativo una cepa de campo de *Pseudomonas aeruginosa*. Para evaluar los medios de cultivo y reacciones de identificación de *Enterococcus*, se utilizó como referencia la cepa de *Enterococcus* ATCC 29212. Ambas cepas ATCC fueron cedidas gentilmente por el Dr. Sergio Abate, DT del laboratorio Patagónico de Diagnostico Agroalimentario de la Funbapa.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron espacial y temporalmente empleando estadística descriptiva, análisis de componentes principales, Anova de dos factores y prueba T para muestras independientes, empleando software INFOSTAT 2014.

Niveles guías

Para la determinación de aptitud en las aguas del estuario se utilizaron los niveles guías nacionales de calidad de agua ambiente de la Sub Secretaria de Recursos Hídricos de la Nación.

Los límites corresponden a muestras únicas y para agua destinada a uso recreacional.

Para verano se tomó un límite de confianza superior de 75% para uso altamente frecuente con valores de 61 para *Enterococcus* y 235 para *E. coli* en 100 mL. Para el resto del año se tomó un límite de confianza superior de 82 % para uso moderadamente frecuente que tiene valores de 77 para *Enterococcus* y 293 para *E. coli* en 100 mL.

RESULTADOS

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DEL ESTUARIO MEDIO DEL RÍO NEGRO, ANALIZADOS POR EL TEST NMP

Sitios

En este trabajo se analizaron un total de 51 muestras recolectadas durante el periodo febrero de 2014 a febrero de 2015.

Los resultados obtenidos por la prueba de NMP se estudiaron por Análisis de Componentes Principales (ACP) ya que es una técnica que permite reducir la cantidad de datos cuando está presente la correlación a fin de reducir la dimensionalidad y revelar conglomerados. Hubo correlación entre *E. coli* y Coliformes Totales altamente significativa ($< 0,0001$). La primera componente, recoge la mayor parte de la variación que hay en el conjunto de datos explicando el 83% de la variabilidad y el resto está dado por el CP2 siendo del 17% (Figura 11).

El ACP de los datos obtenidos permite identificar al sitio 7 como aquel con niveles más altos de *E. coli*, y los sitios 8 y 9 como aquellos con niveles mayores de coliformes. En cuanto los valores más altos de Coliformes Totales y *E. coli* se dieron en el sitio 9. El resto de los sitios forman un grupo que comparte la característica de bajos valores de variabilidad para ambos componentes estudiados.

Estacionalidad

Con respecto a este aspecto, los números más altos de *E. coli* fueron en primavera mientras que en verano los valores más altos fueron para CT. El sitio 6 muestra un comportamiento similar en invierno de *E. coli* y CT y la estación 7 en invierno muestra niveles más altos que las medias en cuanto a las *E. coli*.

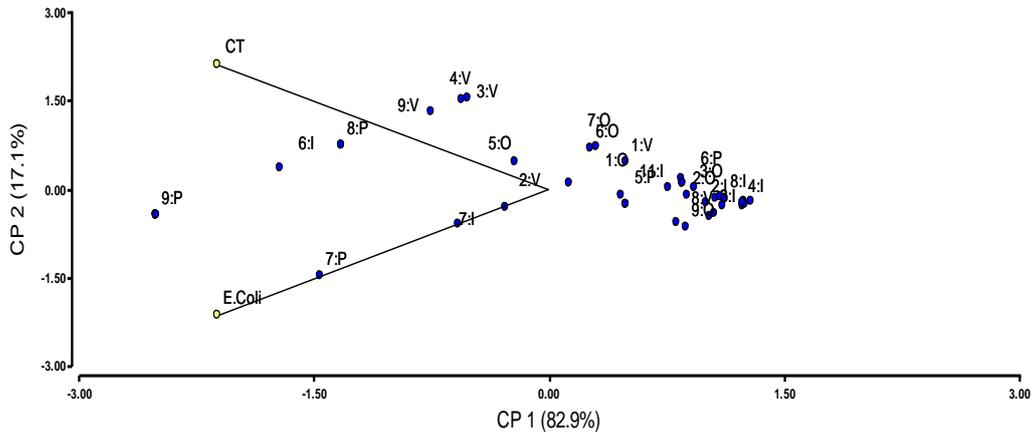


Figura 11: Biplot de los datos obtenidos en el estuario medio del río Negro por el NMP.

E. coli ANALIZADA POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANAS

La técnica filtración por membrana para *E. coli* arrojó resultados poco satisfactorios en las condiciones de trabajo en la que fue utilizada. No se pudo determinar el recuento de UFC de coliformes y *E. coli* por este método, debido al crecimiento confluyente de colonias, a pesar de haber realizado las diluciones sugeridas por el Standard (Standard Methods, 2012).

ENTEROCOCCUS COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN

Análisis estacional

Los valores de UFC de *Enterococcus* manifestaron diferencias tanto entre los sitios de muestreo como entre los diferentes momentos del año.

En verano (la estación del año de mayor actividad recreacional), la concentración de *Enterococcus* superó ampliamente el límite guía para uso seguro del agua (61 UFC/100ml) en cuatro sitios de estudio: en el caso de los puntos de muestreo 1 y 2 los recuentos alcanzaron casi las 100 UFC/100 mL; para el caso de los sitios 5 y 7 los valores fueron superiores a 70 UFC/100 mL. (Figura 12).

En otoño, todos los recuentos de *Enterococcus* resultaron inferiores al límite guía para muestras únicas de agua destinadas a uso recreacional (77 UFC/100 ml).

Durante la primavera, únicamente la muestra correspondiente a uno de los sitios estudiados (el punto de muestreo 9) superó el límite guía, con un recuento superior a las 90 UFC/100 mL. (Figura 14)

En invierno, los *Enterococcus* superaron el valor guía de 77 UFC/100 mL en los sitios distribuidos entre los puntos de muestreo del 5 al 11, con excepción del punto 8. En estos puntos de muestreo, los resultados de UFC *Enterococcus*/100 mL fueron significativamente altos para esta época del año, con valores que oscilaron entre 100 y mayores a 300 UFC/100 mL (Figura 15).

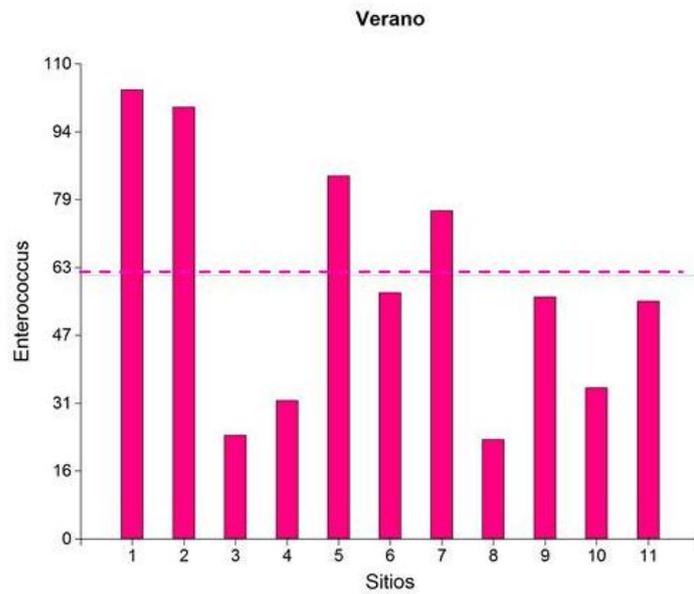


Figura 12: Distribución de *Enterococcus* en verano. La línea rosa representa el límite de confianza superior para muestras aisladas (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente *Escherichia coli* / *Enterococcus*; 2003).

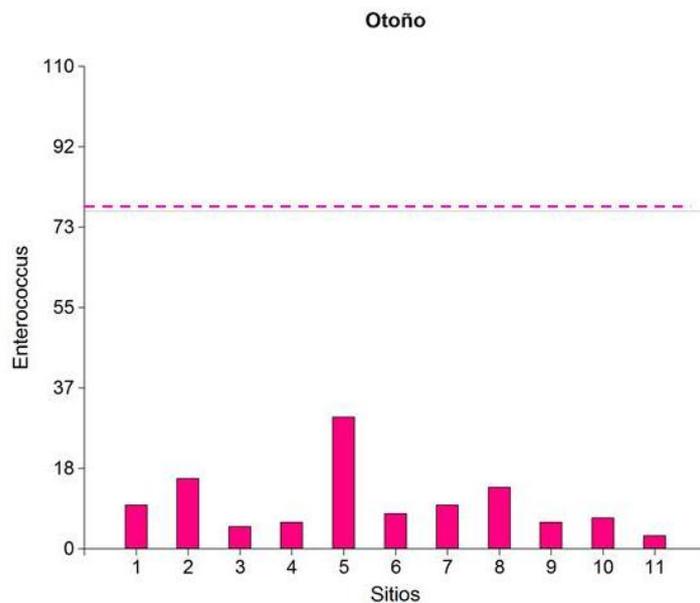


Figura 13: Distribución de *Enterococcus* en otoño. La línea rosa representa el límite de confianza superior para muestras aisladas (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente *Escherichia coli* / *Enterococcus*; 2003).

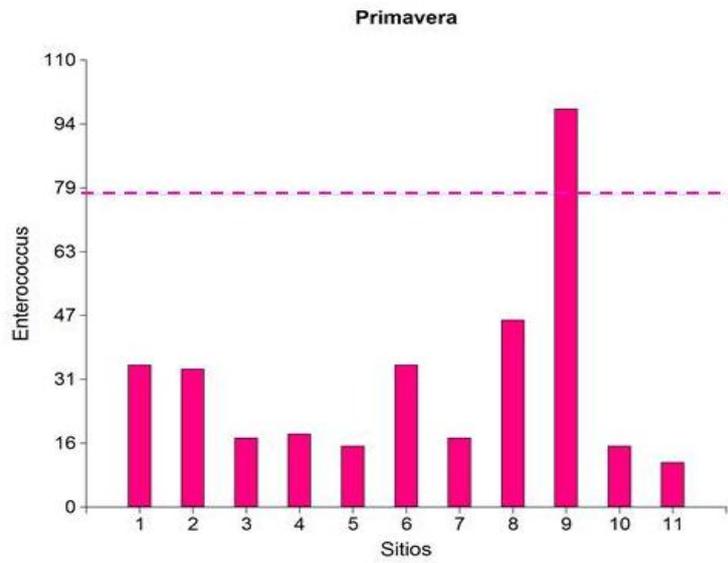


Figura 14: Distribución de *Enterococcus* en primavera. La línea rosa representa el límite de confianza superior para muestras aisladas (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente *Escherichia coli* / *Enterococcus*; 2003).

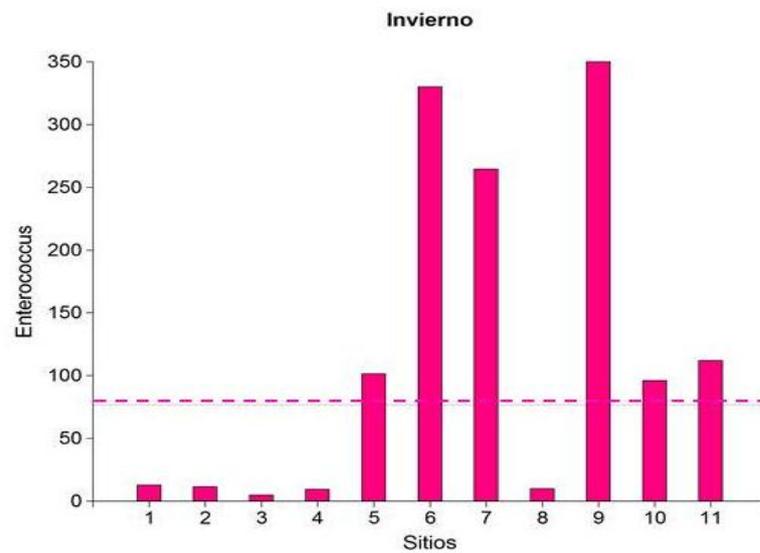


Figura 15: Distribución de *Enterococcus* en invierno. La línea rosa representa el límite de confianza superior para muestras aisladas (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente *Escherichia coli* / *Enterococcus*; 2003).

Comparación entre *Enterococcus* y *E. coli*

En la estación estival se utilizó como valor de corte el límite de confianza superior para agua de uso altamente frecuente. Los resultados de *E. coli* superaron los valores guía en los sitios 1, 2, 5, 6, 7 y 10. Para los puntos 6, 7 y 10 los resultados de NMP de *E. coli* fueron mayores a 1100/100 mL agua. Entre estos puntos, los *Enterococcus* se manifestaron por encima de los valores guía solamente en el sitio 7; en los sitios 6 y 10 los recuentos de UFC *Enterococcus*/100 mL de agua fueron inferiores al límite guía, aunque para el primer caso estuvieron cercanos a dichos valores guías.

Por otro lado, en los sitios 1, 2 y 5 los resultados de *E. coli* también estuvieron por encima del valor guía (valores de NMP *E. coli* superiores a 450/100 mL). La caracterización de estos puntos resulta comparable a lo observado con *Enterococcus*, cuyos valores de UFC/ 100 mL arrojaron recuentos que superaron los valores guía.

El sitio 8 manifestó estimaciones del NMP de *E. coli* en el límite del valor guía, a diferencia de *Enterococcus* que manifestó valores de UFC por debajo de niveles respectivos para este indicador microbiológico.

Los restantes puntos de muestreo analizados en verano demostraron valores cuantitativos por debajo de los niveles guía, considerando ambos indicadores microbiológicos: *E. coli* y *Enterococcus*. (Figura 16)

En otoño, el valor de corte para uso moderadamente frecuente de agua recreativa no fue superado por ninguno de los indicadores en los 11 sitios. No obstante ello, se observa que los puntos 1, 5, 8 y 9 manifiestan valores de NMP de *E. coli* superiores al resto de los puntos para dicha estación del año (Figura 17).

En invierno, se observó que ambos indicadores microbiológicos (*Enterococcus* y *E. coli*) superaron los respectivos valores guía en los sitios de muestreo 6, 7, 9 y 10. A su vez, en los puntos de muestreo 5 y 11 solamente los recuentos de UFC de *Enterococcus* manifestaron impacto ambiental mientras que los resultados de NMP de *E. coli* estuvieron por debajo de los límites de uso seguro del agua para estos sitios (Figura 18).

En primavera, los resultados de *E. coli* superaron el valor guía en los sitios de muestreo 7, 8 y 9, mientras que los *Enterococcus* solo se manifestaron por encima de los valores guía en el sitio 9, sin poder detectar inconvenientes en el resto de los sitios de muestreo (Figura 19).

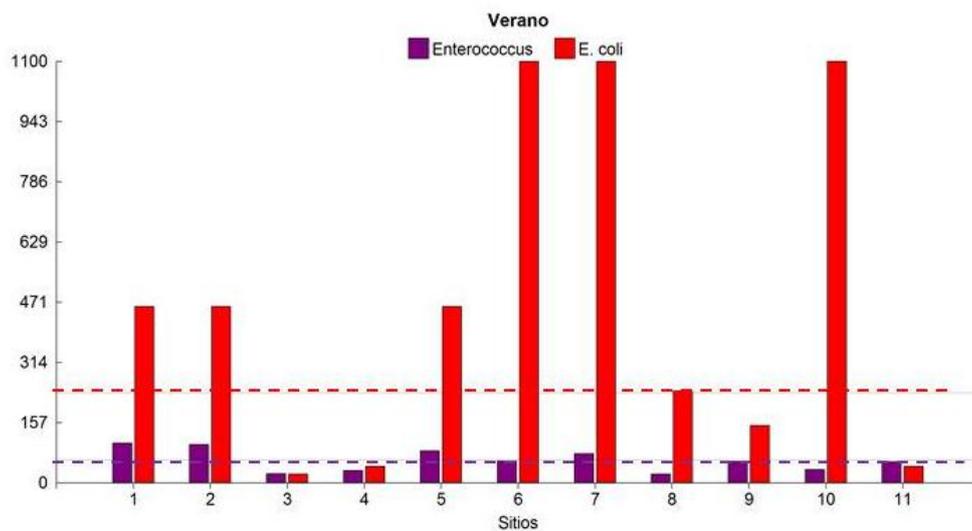


Figura 16: comparación de medias entre *Enterococcus* y *E. coli*, para verano. Los valores guía para *E. coli* se muestran en línea interrumpida color rojo, y aquellos de *Enterococcus* en línea interrumpida violeta.

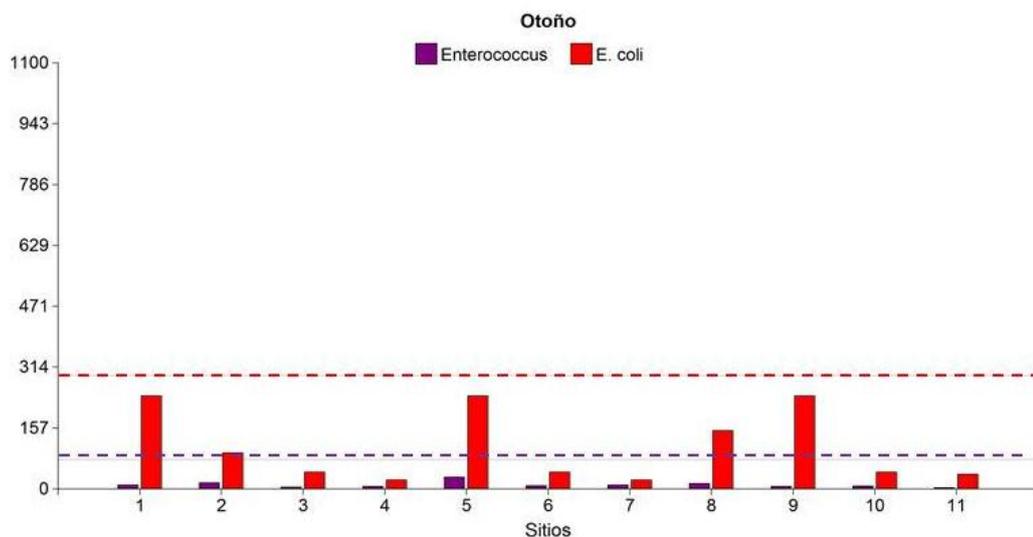


Figura 17: comparación de medias entre *Enterococcus* y *E. coli*, para otoño. Los valores guía para *E. coli* se muestran en línea interrumpida color rojo, y aquellos de *Enterococcus* en línea interrumpida violeta.

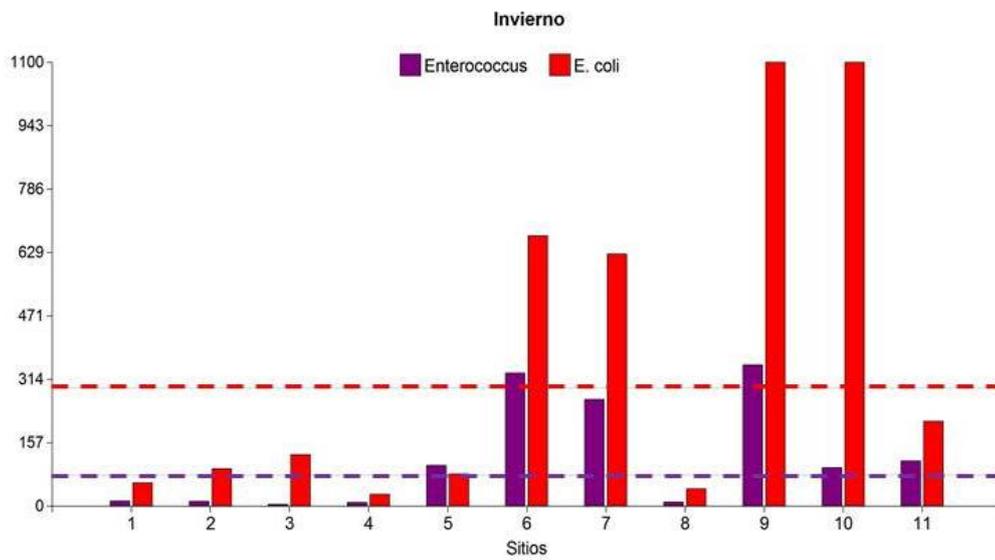


Figura 18: comparación de medias entre *Enterococcus* y *E. coli*, para invierno. Los valores guía para *E. coli* se muestran en línea interrumpida color rojo, y aquellos de *Enterococcus* en línea interrumpida violeta.

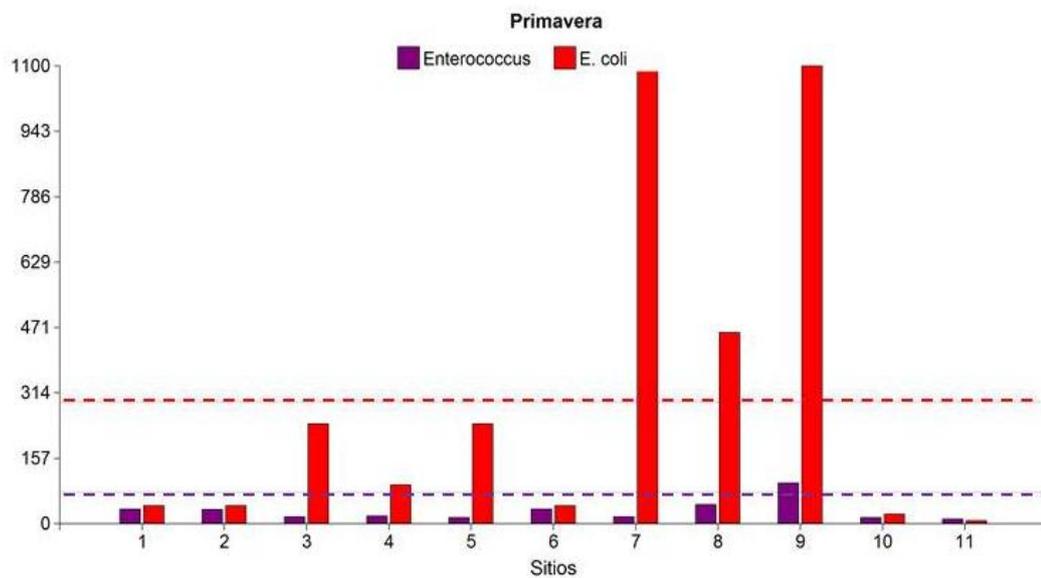


Figura 19: comparación de medias entre *Enterococcus* y *E. coli*, para primavera. Los valores guía para *E. coli* se muestran en línea interrumpida color rojo, y aquellos de *Enterococcus* en línea interrumpida violeta.

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS Y PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DEL AGUA

El análisis multivariado de parámetros fisicoquímicos medidos en el agua superficial al momento de recolección de las muestras, reveló cuatro grupos. El primer grupo, sitios 1 y 2, presenta los valores más altos de Conductividad Eléctrica. El segundo, pH ligeramente alcalino, para los sitios 3, 4 y 8. El tercero, más numeroso en bacterias, conformado por los sitios 6,7 y 9. Por último el cuarto grupo, con el sitio 5 y con características diferenciales, caracterizado por valores medios para todos los parámetros anteriormente mencionados (Figura 20).

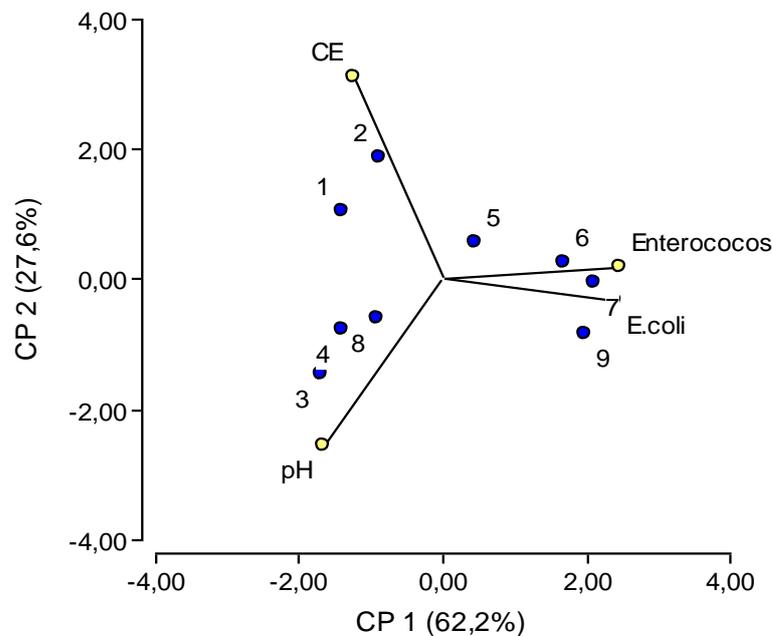


Figura 20: Biplot de parámetros fisicoquímicos del agua e indicadores microbiológicos de contaminación fecal en el estuario medio (sin sitio Pescadero).

EFFECTO DE LA MAREA EN EL ANÁLISIS MICROBIÓLOGO

El análisis por la prueba T, para el muestreo entre baja mar y pleamar, arrojó diferencias significativas entre las medias de las estimaciones cuantitativas solamente para el sitio 8 ($p=0,0194$) y únicamente para el género *Enterococcus*.

Para el resto de los sitios las diferencias entre las medias fueron no significativas tanto para *Enterococcus* como para *E. coli*. En pleamar, las medias fueron mas altas en el punto de muestreo 6 para *Enterococcus* y en el punto 7 para *E. coli*, aunque con diferencias estadísticamente no significativas (Tabla 2).

Tabla 2: análisis de bacterias entre mareas, por prueba T para muestras independientes.

| Sitio | Clasificacion | Variable | Grupo 1 | Grupo 2 | n(1) | n(2) | Media (1) | Media (2) | p-Valor |
|-------|---------------|---------------------|---------|---------|------|------|-----------|-----------|---------|
| 6 | marea | <i>Enterococcus</i> | Alta | Baja | 3 | 3 | 33,33 | 31,33 | 0,7449 |
| 6 | marea | <i>E. coli</i> | Alta | Baja | 3 | 3 | 37,00 | 95,33 | 0,1376 |
| 7 | marea | <i>Enterococcus</i> | Alta | Baja | 3 | 3 | 31,00 | 33,00 | 0,6896 |
| 7 | marea | <i>E. coli</i> | Alta | Baja | 3 | 3 | 600,00 | 526,67 | 0,8584 |
| 8 | marea | <i>Enterococcus</i> | Alta | Baja | 3 | 3 | 22,00 | 41,33 | 0,01194 |
| 8 | marea | <i>E. coli</i> | Alta | Baja | 3 | 3 | 29,67 | 264,33 | 0,1592 |

“Elaboración propia”

Al comparar los desvíos entre el método NMP de *E. coli* y el recuento de UFC de *Enterococcus* por filtración de membrana, se observó que el NMP posee desvíos superiores al método de recuento de colonias.

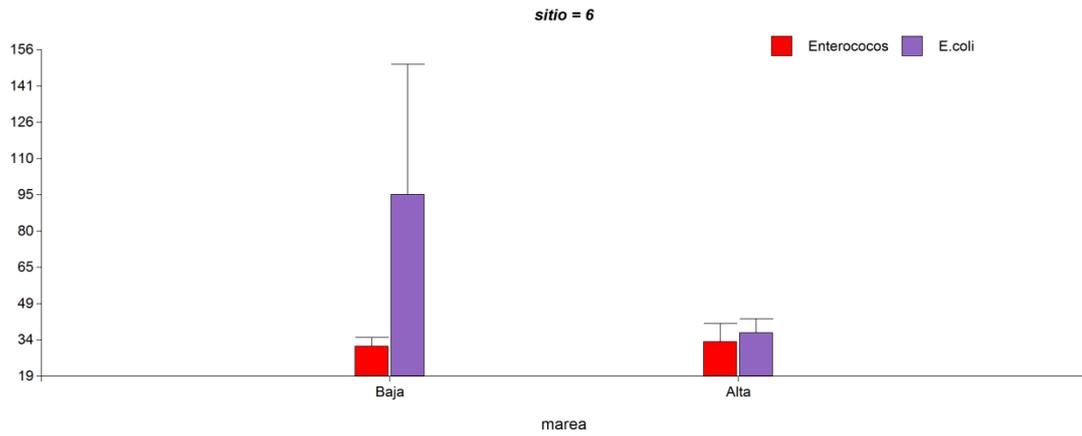


Figura 21: Promedios y desvíos de estimaciones de UFC/100 ml de *Enterococcus* y NMP/100 ml de *E. coli*, en baja y pleamar, para el sitio 6.

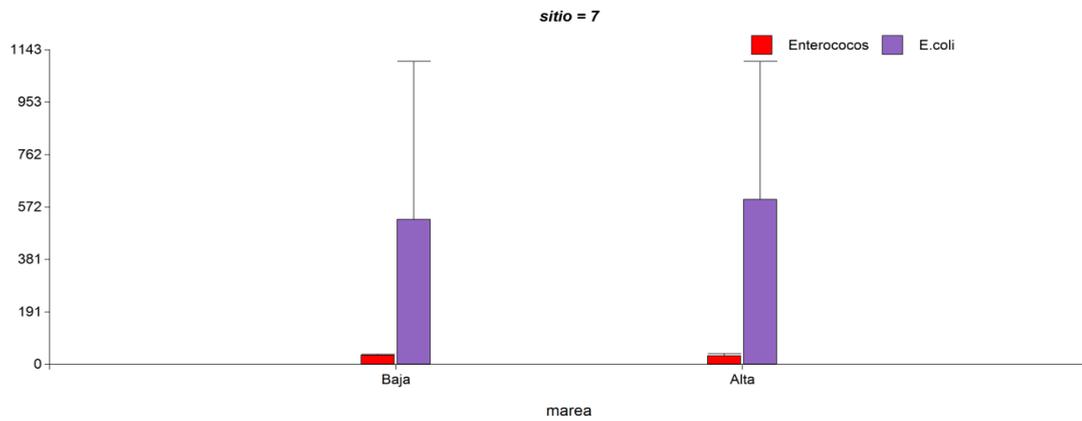


Figura 22: Promedios y desvíos de estimaciones de UFC/100 ml de *Enterococcus* y NMP/100 ml de *E. coli*, en baja y pleamar, para el sitio 7.

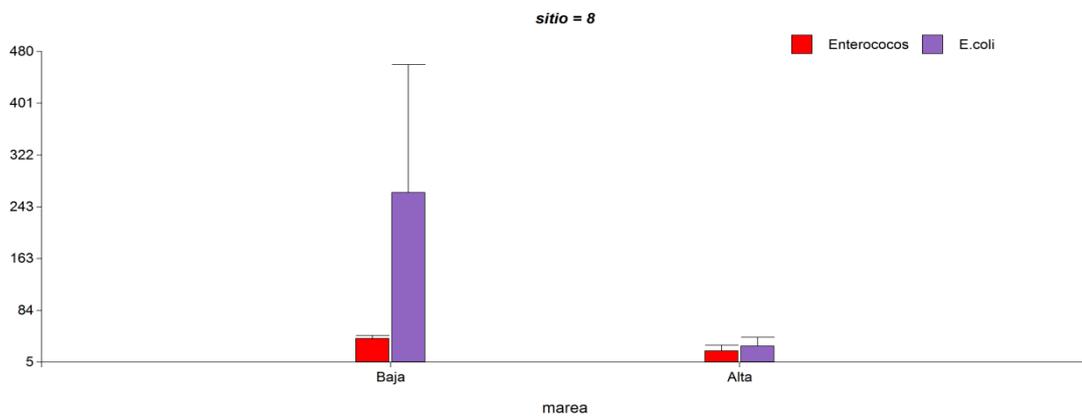


Figura 23: Promedios y desvíos de estimaciones de UFC/100 ml de *Enterococcus* y NMP/100 ml de *E. coli*, en baja y pleamar, para el sitio 8.

CEPARIO DE ENTEROCOCCUS DEL ESTUARIO DE RIO NEGRO

Los integrantes del género *Enterococcus* son bacterias cocoides, positivos a la tinción de Gram, no formadores de esporas, típicamente catalasa negativa e inmóviles, con variables requerimientos nutricionales según la especie. En este trabajo se aislaron 15 cepas de *Enterococcus* (Tabla 3). En el 80% de los casos las cepas presentaron las propiedades bioquímicas esperadas para el género, mientras que en un 20 % restante (cepas 2, 6 y 12) se observó un biotipo atípico, caracterizado por la reacción positiva a la enzima catalasa.

Tabla 3: Características Bioquímicas de las bacterias del genero *Enterococcus* aisladas del estuario del río Negro.

| Cepas aisladas | Morfología | Tinción de Gram | Catalasa |
|----------------|------------|-----------------|----------|
| 1 | Cocos | + | - |
| 2 | Cocos | + | + |
| 3 | Cocos | + | - |
| 4 | Cocos | + | - |
| 5 | Cocos | + | - |
| 6 | Cocos | + | + |
| 7 | Cocos | + | - |
| 8 | Cocos | + | - |
| 9 | Cocos | + | - |
| 10 | Cocos | + | - |
| 11 | Cocos | + | - |
| 12 | Cocos | + | + |
| 13 | Cocos | + | - |
| 14 | Cocos | + | - |
| 15 | Cocos | + | - |

DISCUSIÓN

Las intervenciones antrópicas en los estuarios producen cambios en sus aspectos hidrogeoquímicos y biológicos, alteran su capacidad de recuperación y afectan su biodiversidad original. Los cambios en la calidad del recurso hídrico del estuario del río Negro son inminentes, por lo tanto determinar la prevalencia de bacterias indicadoras es fundamental para contar con datos que constituyan una confiable y actualizada línea de base útil para posteriores investigaciones de impacto ambiental, conocer el grado de deterioro ambiental, y estimar riesgos de infecciones por microorganismos patógenos en aguas de uso recreativo, así como para conocer el origen de dicha contaminación y el momento del año en que se genera la misma.

Esta investigación se orientó a conocer algunos parámetros microbiológicos e indicadores adecuados para la zona de estudio. Por otro lado, también fue de interés identificar el efecto de las mareas en los resultados cuantitativos de los análisis de indicadores microbiológicos de degradación. Se concluyó con un Cepario de *Enterococcus* originario del estuario medio del río Negro, que incluye cepas interesantes dado que presentan una reacción atípica para la reacción de catalasa.

La discusión de este trabajo se ordena de la siguiente manera: por un lado se tratarán los resultados obtenidos mediante el análisis de componentes principales, para lo cual se incluyeron resultados de Coliformes totales y *Escherichia coli*. Posteriormente se discuten los resultados obtenidos al comparar el desempeño de los indicadores *E. coli* y *Enterococcus* cuando son utilizados con los medios de cultivo Agar Tergitol (TTC) y Slanetz y Bartley respectivamente. Mas adelante se discuten los resultados obtenidos al realizar la comparación estacional entre sitios seleccionados de muestreo, utilizando el método tradicionalmente aplicado por autoridad competente en la cuenca del río Negro (NMP para *E. coli*) con el método de FM para *Enterococcus*. Luego se discute el efecto del momento de muestreo en relación a la marea en los resultados de análisis microbiológicos cuantitativos tanto para *E. coli* como para *Enterococcus*. El enfoque microbiológico de esta tesis termina con la descripción del cepario de *Enterococcus*. Para culminar este apartado, se discuten los resultados de análisis fisicoquímicos de agua.

Análisis de Componentes Principales

De los datos obtenidos se confirma la hipótesis de este trabajo. Los resultados del análisis de componentes principales, tanto para NMP de coliformes como NMP de *E. coli*, revelan la importancia del punto geográfico de origen de la muestra en el nivel de estas bacterias. El comportamiento anual de los coliformes es elevado en casi la totalidad de los sitios. El balneario de la ciudad de Viedma identificado como sitio 7 en esta investigación, arrojó valores de NMP de *E. coli* significativamente superiores al resto de los puntos de muestreo (Figura 11). Al analizar solamente la influencia del componente “coliforme”, el sitio más afectado fue el 6 durante el período de invierno (Figura 11). Lo observado en los puntos 6 y 7, distanciados apenas en 10 metros, puede ser interpretado en función de los posibles orígenes de descarga microbiana en cercanía de estos puntos. Se identificó que una alternativa puede encontrarse en la descarga pluvial cercana a los puntos 6 y 7. El pluvial constituiría una fuente de coliformes (de origen fecal tanto como ambiental).

Al analizar el efecto de dos componentes simultáneos (coliformes y *E. coli*), en el punto de muestreo 9 se revelaron los valores más altos del NMP de coliformes totales y *E. coli* (Figura 11). Una explicación de estos elevados niveles de enterobacterias, que incluyen las *E. coli* de origen francamente fecal, podría encontrarse en que dicho sitio se encuentra en cercanía y aguas abajo de las descargas de líquidos cloacales tanto de la planta de tratamientos de localidad de Viedma (provincia de Río Negro) como la correspondiente a Carmen de Patagones (provincia de Buenos Aires).

Cuantitativamente, el segundo punto con elevados NMP de coliformes y *E. coli* es el número 8 en primavera. El aporte del componente *E. coli* podría explicarse en el efecto del refluo de ambas plantas de tratamiento que presentan mayor descarga en meses cálidos. Debido a que en este punto del Biplot el componente coliforme tiene mayor incidencia que *E. coli*, debería buscarse una fuente de coliformes no tan dependiente del origen fecal, o bien una combinación de microorganismos fecales con coliformes ambientales. En este sentido, podría pensarse en una combinación del mencionado refluo de la descarga cloacal (que aportaría el componente *E. coli*) con la acumulación de coliformes ambientales provenientes de aguas arriba, dado que el sitio 8 se caracteriza por un menor movimiento de agua en relación al resto de los puntos de muestreo. Los demás sitios forman un grupo de valores similares en las diferentes estaciones.

Comparación FM *E. coli* vs *Enterococcus*:

Se pudo identificar y contar el número de colonias de *Enterococcus* sin interferencia de microorganismos acompañantes en la mayoría de los sitios, aun filtrando para cada caso la totalidad de los 100 mL de la muestra. Por ello se puede asumir que para las características microbiológicas y físicas actuales del estuario, resulta de utilidad la técnica de FM utilizando como medio de cultivo el agar Slanetz y Bartley para el indicador *Enterococcus*. Este medio de cultivo se caracteriza por su capacidad inhibitoria de los microorganismos acompañantes, basada en el efecto de Azida de sodio, un desinfectante con efecto biocida para el cual los enterococos son resistentes (ver Anexo I). Estos resultados son de interés, debido a que los *Enterococcus* están siendo utilizados en los últimos años como indicadores de contaminación fecal en diversos ambientes alrededor del mundo. Los *Enterococcus* son microorganismos con determinadas características fisiológicas, metabólicas y morfológicas, que los posicionan entre los indicadores de contaminación fecal mejor dotados para subsistir fuera del intestino: son gram positivos, con una gruesa pared bacteriana y forma esférica tipo coco, que le aporta gran resistencia a fuerzas físicas incluyendo la variación en la presión osmótica del medio externo, por lo que poseen una mayor persistencia en ambientes acuáticos al compararlos con los coliformes en general.

En comparación a lo observado con los *Enterococcus*, el método de FM para coliformes y *E. coli* no fue conveniente utilizando el medio de cultivo Agar Tergitol (TTC). Esta conclusión se basa en que tanto al filtrar la totalidad de la muestra como al filtrar diluciones 1/100, resultó imposible la obtención de colonias aisladas que permitan identificar, cuantificar y confirmar colonias compatibles con enterobacterias. Esto se debe a que el medio de cultivo utilizado permitió el crecimiento de un elevado número de microorganismos acompañantes, generando confluencia de colonias. Esta limitación metodológica puede explicarse en base al escaso poder selectivo del medio de cultivo Agar Tergitol (TTC), diseñado para el aislamiento y recuperación de bacterias coliformes estresadas al encontrarse en medios adversos. Por esta razón, su capacidad selectiva es nula ya que carece de inhibidores que limiten el crecimiento de microorganismos acompañantes diferentes de las enterobacterias deseadas (Ver anexo I). Aunque existen reportes sobre el uso del medio de cultivo Agar Tergitol (TTC) para los indicadores Coliformes y *E. coli* en agua ambiental (Romeu-Àlvarez *et al.*, 2012), nuestros resultados indican que las condiciones microbiológicas actuales de los puntos

seleccionados del estuario demandan la utilización de medios de cultivo con capacidad selectiva, como el utilizado para el indicador *Enterococcus*, para el procesamiento de 100 mL de muestra.

Comparación estacional entre sitios seleccionados de muestreo:

Para considerar un sitio altamente impactado, el criterio asumido fue la identificación de al menos dos muestreos con resultados por encima de los valores guías. Con este criterio, los *Enterococcus* tuvieron un comportamiento diferencial a lo largo del año, los sitios más impactados según este indicador fueron el número 5 en cercanía a la descarga del pluvial, el 7 donde funciona el balneario municipal y el 9 ubicado cerca de la descarga de aguas tratadas.

En verano, los sitios 1 y 2 (identificados como “dren el molino”) mostraron incrementos significativos en los recuentos de *Enterococcus*, superando los valores guías. Una de las razones podría ser el aumento en la producción agrícola local dependiente de la temporada estival, que genera un incremento en el nivel de arrastre de microorganismos en los drenes. Considerando además el efecto de la temperatura ambiente sobre los microorganismos, durante el verano se pueden generar mayores índices de crecimiento microbiano y/o índice de supervivencia ambiental en respuesta a la mayor temperatura promedio diaria. Teniendo en cuenta el efecto de la temperatura sobre la matriz donde se encuentran los microorganismos, las altas temperaturas del verano (máximas diarias y mayor cantidad de horas/día expuesta a los efectos del sol) aportan al aumento de la evaporación, concentrándose las bacterias por disminución del caudal del río. A lo anterior mencionado se le suma la disminución de los aportes de agua por condiciones ambientales que dependen de la baja estival de los niveles de lluvias y ausencia de agua proveniente de deshielo.

En invierno, los puntos 6, 7 y 10 superaron los valores límites para agua recreacional. Existe consenso en la disminución de la concentración microbiana en aguas superficiales cuando las condiciones climáticas imponen bajas temperaturas; esta afirmación coincide con lo observado en otoño para el indicador *Enterococcus*, que se mantuvo por debajo de los niveles guías. Debiera encontrarse entonces alguna explicación para el incremento de este indicador microbiano en los puntos 6, 7 y 10 durante el invierno. En este sentido, merece destacarse que 48 hs antes del momento de muestreo de invierno, se registraron precipitaciones de 139,9 mm (datos del DPA, 2016)

en la zona, y el movimiento de aguas que tal nivel repentino de precipitaciones puede generar, se ha vinculado en reportes de otros autores, con un incremento en los niveles de indicadores de contaminación fecal en diversos cursos de agua (Chiroles Rubalcaba *et. al.*, 2007; Cobas *et. al.* ; 2010, Ávila de Navia *et. al.*, 2014; Calvo-Brenes *et al.*, 2015)

Los estudios estacionales comparativos entre estimación de nivel de *Enterococcus* por la técnica de FM y *E. coli* por la técnica de NMP, mostraron sitios en donde *E. coli* no superó los límites guía seleccionados en este trabajo (para agua ambiental, analizada mediante muestreos únicos). En cambio, el recuento del género *Enterococcus* superó dichos límites, lo cual queda claramente reflejado en los sitios 9 y 11 para el verano y en los sitios 5 y 11 para el invierno (Figuras 16 y 18). Esto puede deberse a que *E. coli*, fuera de su hábitat natural y en un ambiente secundario (como el agua ambiental) tiene una supervivencia menor a 24 hs, mientras que *Enterococcus* al ser más resistentes pueden sobrevivir varios días en estos ambientes (Larrea Murrel *et al.*, 2013). Por esta razón, y mas aún en casos de muestreos únicos como es el presente trabajo, valores elevados de *E. coli* solo puede encontrarse en circunstancias de constante arribo de contaminantes, o bien en casos de contaminación intermitente en los que por azar coincida la fecha de muestreo con el momento de vertido de contaminantes. Contrariamente, los *Enterococcus* permiten identificar situaciones de contaminación reciente así como aquellos casos de vertido de contaminantes de forma intermitente de días anteriores a muestreos. Por esta razón, podemos asumir (con las limitaciones del caso de muestreos únicos), que en los sitios 9 y 11 de verano y 5 y 11 de invierno, se han puesto de manifiesto contaminaciones intermitentes no detectables por el análisis de muestras únicas cuando se considera únicamente a *E. coli* como indicador.

Los resultados estacionales obtenidos del periodo investigado (febrero 2014 a febrero 2015) permiten diferenciar aquellos sitios que permanecen en condiciones satisfactorias para la recreación durante todo el año, de los que no cumplen con estos requisitos en al menos alguna de las estaciones. Estos últimos resultados, se encuentran dentro del rango de concentraciones de bacterias fecales obtenidos en otras aguas superficiales de nuestro país y América Latina. En el embalse San Roque de la Pcia de Córdoba, Argentina, los valores de *E. coli* en época estival superaron en varios casos los 200/100 ml (Playas Club Instituto, Bahía Los Mimbres y Bahía el Gitano); en el caso de los

Coliformes Totales superaron los valores locales (Nadal *et al.*, 2012). El río Chocancharava (río Cuarto) en playa Bonita, Km 579 y Paso Del Durazno en primavera verano los valores de coliformes y *E. coli* superaron los 1100/100 mL. En Paso del Durazno los *Enterococcus* se mantuvieron bajos en primavera y verano, aumentando significativamente en invierno a 137 UFC (Rodríguez *et al.*, 2002). En la provincia de Buenos Aires, se describió en la Laguna de los Padres que las medias de *Enterococcus* alcanzaron los 981/100 mL y en otros sitios 27 /100 mL, pero con máximos que llegaban a los 450/100 mL (Folabella *et al.*, 2006), valores similares a los obtenidos en este estudio, aunque se hayan aplicado diferentes métodos ya que en este trabajo se optó por el método de filtración por membrana y en el estudio citado el método de diluciones en series de tubos.

En otros ambientes de Latinoamérica algunos autores describieron que el factor climático prevaleció sobre los urbanos: en el Estuario del Río Baracoa en La Habana, Cuba, los valores más altos de CT se registraron en el mes de octubre, momento en que se presentan las mayores precipitaciones, alcanzando los 900/100 mL, siendo para *Enterococcus* el número más alto de 240/100 mL (Cobas *et al.*, 2010). En Bogotá, Colombia, el Humedal Jaboque en época de lluvias los valores de UFC aumentaron de significativamente, tanto para *E. coli* y como para *Enterococcus* (Ávila de Navia *et al.*, 2014). El estudio de Ávila de Navia ha servido para comparar los valores con los históricos: al identificar un incremento significativo, y teniendo en cuenta la importancia del humedal considerado, las autoridades intervinieron mediante una serie de medidas que lograron disminuir los recuentos de indicadores de contaminación hasta llegar a los históricos para los mismos sitios de muestreo. Las investigaciones llevadas a cabo en ocho playas costeras de Lima en verano e invierno evidenciaron un aumento significativo en los meses estivales, donde se alcanzaron valores de NMP medios de 4.448/100 mL para CT, 428/100 mL para *E. coli*, así como valores de UFC medios de 136/100 mL para *Enterococcus*. En invierno los valores fueron relativamente más bajos, pero indican persistencias de *Enterococcus*, por lo que confirman la utilidad de este género como indicador de contaminación fecal para aguas recreacionales de contacto primario, sometidas a vertidos intermitentes, cuyas características dificulten la supervivencia de CT y *E. coli* (Vergaray *et al.*, 2007), así como en situaciones en que solo se puedan realizar análisis de muestreos únicos por diversos factores limitantes.

Como se mencionó anteriormente, y en relación a los eventos climáticos, las lluvias promedio registradas 48 hs antes del muestreo de invierno fueron de 139,9 mm (datos del DPA, 2016). Los resultados de este muestreo manifestaron valores de NMP superiores a 1100/100 mL para *E. coli* y valores de UFC para *Enterococcus* superiores a 350/100 mL. Estos resultados permiten observar cierto incremento en los valores cuantitativos de indicadores microbiológicos de contaminación luego del mencionado evento climático, aunque para realizar una afirmación con significancia estadística debiera realizarse un estudio que demande varios ciclos así como muestreos por triplicado o quintuplicado (para anular desvíos en los resultados debidos a causas fortuitas). Los resultados obtenidos justifican profundizar en este tipo de estudios, considerando que la zona más impactada por estos efectos es aquella donde la comunidad de la localidad de Viedma (una ciudad de más de 50.000 habitantes) toma contacto directo e indirecto con el agua del río.

Las variación en los indicadores, para un mismo sitio de estudio, fueron elevadas para *E. coli* por el método NMP. Por el contrario, en el caso de *Enterococcus* las diferencias son menores al comparar resultados de diferentes momentos del año para un mismo sitio de muestreo. La técnica de filtración por membrana presenta varias ventajas en comparación con el método de diluciones seriadas en tubo (NMP): demanda poco tiempo operativo, es exacta y confiable ya que permite cuantificar el número de microorganismos de interés en la totalidad de los 100 mL de muestra estudiada, por lo que es repetible y arroja menos diferencias entre repeticiones. En cambio el método de NMP demanda más tiempo de trabajo en laboratorio, y los resultados obtenidos se basan en una estimación a partir del procesamiento de una alícuota de 33,3 mL de la muestra infiriendo el resultado en 100 mL totales. Además, el método de NMP se basa en la premisa de una plena homogeneización de la muestra analizada, lo que significa un supuesto teórico, ideal, pero inalcanzable desde el punto de partida que los microorganismos son partículas incapaces de generar una disolución perfecta en el agua ya que se toma una porción pequeña de la misma, lo que puede contribuir a la variabilidad de resultados obtenidos con este método.

Por esta razón, en una misma muestra, los resultados mediante el método de filtración por membranas tienden a ser más repetibles que aquellos obtenidos con el método de NMP, para cualquier microorganismo en general, con mayores diferencias entre ambos

métodos en función de la capacidad de los microorganismos estudiados de agruparse mediante las uniones de sus paredes celulares constituyendo cadenas.

Efecto de la marea en análisis microbiológico cuantitativo:

El sistema estudiado es un ambiente dinámico, colector, con tiempo de residencia alto, macromareal, influenciado por mareas de 4 a 6 metros. Es lógico pensar que este rango generaría una dilución en sus gradientes, lo cual podría manifestarse en los resultados del muestreo en baja y pleamar, sobre todo en estudios basados en muestreos únicos. Esta situación debe conocerse para la zona de estudio, para facilitar la comparación de resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación, incluyendo los grupos oficiales de control responsables de la vigilancia del nivel de degradación del río, así como aquellos contratados *ad hoc* para tal fin o para resolver conflicto de intereses por autoridades gubernamentales. Habiendo demostrado que el momento de muestreo (dependiente de la marea) es capaz de influir en resultados de estudios microbiológicos cuantitativos, todos los grupos deberían muestrear en el mismo momento (pleamar o bajamar), y ese momento debería ser aquel en el cual los resultados obtenidos sean los representativos del nivel de degradación del río.

Según el análisis de prueba T para muestras independientes, se observó que la mayoría de los valores de indicadores microbiológicos (tanto NMP de CT y *E. coli* como UFC de *Enterococcus*) obtenidos en momento de bajamar, superan a los obtenidos durante muestreos de pleamar (Tabla 2). En el sitio 8, el indicador UFC de *Enterococcus*/100 mL de agua manifiesta una diferencia entre baja y pleamar estadísticamente significativa. Posiblemente la mayor diferencia se ha observado en este sitio de muestreo en relación a los restantes, porque el punto 8 se caracteriza por un flujo de agua más lento, que además se encuentra próximo al punto de descarga pluvial (tan solo 480 metros). Para asegurar que en el resto de los sitios de muestreo no existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de indicadores bacterianos de contaminación fecal presente en momentos de baja y altamar, deberían realizarse estudios por triplicado o quintuplicado; recién entonces podrían compararse resultados de grupos de trabajo que realicen muestreos en momentos diferentes para el mismo sitio de estudio.

En función de lo mencionado en el párrafo anterior, es importante destacar que las guías Canadienses de Calidad de Agua sumado a otras fuentes como el Standard Methods,

destacan la necesidad de realizar de tres a cinco repeticiones de muestreo para alcanzar un valor representativo correspondiente a un momento determinado, pudiendo así promediar los resultados y anular el efecto de desvíos de resultados por causas fortuitas así como eventuales resultados atípicos (outlier). En el ambiente estudiado (flujos turbulento con ciclos de mareas de seis horas, etcétera) el estudio de indicadores microbiológicos de contaminación antrópica genera grandes varianzas entre resultados (Abrameto *et. al.*, 2013), motivo por el cual se reconoce la conveniencia de incluir un mayor número de muestras en los sitios de mayor impacto a fin de asegurar el resultado y disminuir la varianza.

Cepario:

La colección de cepas de origen ambiental local constituye una herramienta fundamental que permitirá estudiar el posible rol del río como fuente y/o reservorio de cepas vinculadas a infecciones en humanos, así como vía de transmisión entre animales y el ser humano. Las cepas obtenidas permitirán nuevos estudios de impacto ambiental basados en la frecuencia relativa de cada una de ellas en función de variables ambientales naturales (cambio climático), efecto poblacional de modificación por aguas residuales, acciones agropecuarias, etc. Se podrá, a su vez, estudiar aquellos patovares predominantes, considerando por ejemplo la sensibilidad a los antimicrobianos (Weng Alemán *et al.*, 2003; 2005; Malik y Claus, 2013). La disponibilidad de aislamientos de *Enterococcus* autóctonos permitirá realizar estudios de microcosmos en los que se pueda conocer el efecto de la interacción de estos microorganismos con parte de los habitantes microbianos del río, en análisis de NMP y UFC.

El cepario construido contiene alrededor de un 20 % de cepas atípicas de Enterococos, caracterizadas por la reacción positiva a la prueba de la catalasa. Existen reportes sobre la eventual asociación entre la capacidad de síntesis de catalasa en el género *Enterococcus* (típicamente negativo para esta enzima), con incremento en su virulencia. Esto podría explicarse en que esta enzima capacitaría a dichos microorganismos para utilizar la respiración aeróbica como vía metabólica energética, neutralizando los radicales libres tóxicos que se generan en presencia de oxígeno (Frankenberg, L *et al.*, 2002). Estas cepas atípicas podrían estudiarse con grupos de investigación de otros centros, para determinar su potencial patógeno de importancia en salud pública, producción pecuaria y salud animal.

Análisis parámetros físicos y químicos

Se tomaron parámetros fisicoquímicos para complementar la investigación. El pH se midió en todos los sitios cada campaña. Se confeccionó un análisis de componentes principales, en el cual se incluyeron como componentes el valor de pH, la conductividad eléctrica, y los resultados de UFC de *Enterococcus* y NMP de *E. coli*. El análisis reveló cuatro grupos; uno de ellos contiene a los sitios de muestreo 6, 7 y 9 caracterizados porque son afectados en mayor importancia que el resto por los componentes *E. coli* y *Enterococcus*. Esto permite suponer que son alcanzados por fuentes de contaminación antrópica, en mayor medida que el resto de los sitios de estudio.

Los sitios 1 y 2 constituyen otro grupos, y poseen valores más altos de Conductividad Eléctrica (CE) lo cual puede deberse a lixiviados agrícolas, captados por el dren, que llegan en forma directa al estuario.

Los sitios 3, 4 y 8, son afectados en mayor medida por el componente pH, constituyendo el tercer grupo derivado de este análisis.

El último grupo corresponde al sitio 5, que se caracteriza por una concentración bacteriana uniforme a lo largo del estudio, y con valores menores a los correspondientes a los sitios de muestreo 1 y 2. Una explicación puede encontrarse en que el sitio 5 está ubicado aguas arriba del desagüe pluvial, y la corriente del cauce del río tendería a arrastrar a los microorganismos y materia orgánica originaria de dicho desagüe, corriente abajo del río, afectando a los sitios de muestreo 6 y 7 mas que al sitio 5.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren la conveniencia de continuar con este tipo de estudios, que permitan contar con triplicados o quintuplicados de cada punto de muestreo para cada momento, para evaluar la dispersión y eliminar datos no representativos. Además se destaca la importancia de la comparación entre recuentos obtenidos en baja y pleamar, para establecer un momento oportuno para el muestreo de manera que los resultados resulten representativos, y puedan compararse las conclusiones de los diferentes grupos de investigadores.

Incluir *Enterococcus* ayudaría a tener una visión más clara de la calidad microbiológica del agua del río, ya que este indicador permite identificar situaciones de contaminación intermitente, a diferencia de la siembra en Agar Tergitol para *E. coli*.

Es necesario continuar estudiando el estuario, sector de gran interés para la población aledaña, generando diferentes iniciativas para darle a este recurso mayor trascendencia, concientizando sobre la conservación de ecosistemas sanos para el bienestar humano y garantía de conservación de la biodiversidad. Esto requiere abordar seriamente la gestión de este recurso, dando mayor importancia a la calidad del agua y exhortando a los diferentes estamentos de la sociedad para adoptar medidas y realizar actividades de prevención y concientización sobre esta problemática (ONU, 2010). Mantener la calidad de estos cuerpos naturales es de importancia ambiental y social, por lo que es esencial el control y la investigación integrada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrameto, M. A. 2004. Tesis Doctoral “Distribución especiación y biodisponibilidad de metales pesados en compartimientos abióticos y biológicos del río Negro” http://catalis.uns.edu.ar/cgi-bin/catalis_pack_demo_devel/wxis?IsisScript=opac/xis/opac.xis&task=BIB-RECORD&db=allbc&curr=1&total=12&cid=/tmp/fileVOkpKN
- Abrameto, M. Dapeña C, Aldalur B, Caro A, Cecchini V, Fernandez C, Szmulewicz M, Travaglio M, Abate S, Molina L. (2013). Marcadores de contaminación urbana y agrícola en agua superficial y subterránea en el Valle inferior del río Negro, Argentina. Libro Aguas subterráneas recurso estratégico tomo IIEdulp. Pag 145-149.
- AIC. (2006). Autoridad Interjurisdiccional de las cuencas de los ríos Limay, Neuquén y Negro. Calidad del agua del Río Negro.
- AIC. (2016). <http://www.aic.gob.ar/aic/lacuena.aspx>. (05/09/2016)
- Arcos Pulido, M. P., Avila de Navia, S. L., Msc., Estupiñan Torres, S. M., Gómez Prieto, A. C. (2005). “Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua”. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Nova-Publicación Científica ISSN: 1794-2470 Vol.3.
- Ávila Navia1., S., Estupiñán-Torres., M. S., Estupiñán-Torres, D. M. (2013). Indicadores de calidad bacteriológica del agua en unidades odontológicas. Bacteriological quality indicators of water in dental units. Rev. Fac. Med. 2014 Vol. 62 No. 1: 111-117. Bogota. Colombia.
- Bain, R., Cronk, R., Hossain, R., Bonjour, S., Onda, K., Wright J., Yang, H., Slaymaker, S., Hunter, P., Prüss-Ustün, N., Bartram, J. (2014). Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. Tropical Medicine and International Health. volume 19 no 8 pp 917–927.
- <http://canchallena.lanacion.com.ar/1768176-el-impresionante-salto-de-superman-checo-desde-una-plataforma-de-27-metros>.

- http://www.bolsonweb.com/diariobolson/detalle.php?id_noticia=11337#content
(Consulta: 10/2014).
- <http://www.tycsports.com/noticias/Los-mejores-clavadistas-del-mundo-compiten-entre-Viedma-y-Carmen-de-Patagones-20150212-0011.html>.
- Calbo-Brenes, G; Mora-Molina, J. (2015). “Evaluación de calidad de agua de los ríos Tigre y Rincón de la península de Osa en dos periodos de tiempos distintos”. Tecnología en marcha. Vol. 28, N° 3, julio-septiembre. Pág. 55-63. Centro de investigación y protección ambiental (CIPA). Costa Rica.
- Cobas, L. S., Perigó, E., Piñeiro., Duthit, R. (2010). “Contaminación en el estuario del río Baracoa. La Habana. Cuba”. La Habana. Cuba.
- Couillette A.D; Noble R.T. (2008). Impacts of rainfall on the water quality of the Newport River Estuary (Eastern North Carolina, USA). Journal of water and health. IWA Publishing.
- Chiroles Rubalcaba, S; González González, M. I; Torres Rojas, T; Valdés Àguila, M; Domínguez Martínez, I. (2007). “Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba)”. *Hig. Sanid. Ambient.* **7**: 222-227. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, Centro Habana, Cuba.
- Delgado-Ramos, G. C. (2006). Agua: usos y Abusos.
- Delgado-Ramos, G. C. (2006). Problemática Ambiental y Recurso Agua.
- De Man, J. C. (1983). MPN tables, corrected. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 17(5), 301-305.
- DPA (2010). Departamento Provincial del agua- Provincia de Rio Negro. Calidad del agua del río Negro 2007-2010.
- DPA (2012). Departamento Provincial de agua- Provincia de Rio Negro. Calidad de agua del río Negro 2007-2012.
- DPA (2014). Informe de resultados del año en curso aun no publicados.
- DPA-AIC. (2013). Estudio, Evaluación y Lineamientos generales para aplicaciones de las aguas residuales tratadas en San Carlos de Bariloche.

- Folabella A. M., Escalante A. H., Deza A., PerezGuzzi I., Zamora A. S. (2006). “Indicadores bacterianos de calidad de agua recreacional en la Laguna de Los Padres (Buenos Aires, Argentina)”. Córdoba, Argentina.
- Frankenberg, L; Brugna, M; Hederstedt, L. (2002). “*Enterococcus faecalis* Heme-Dependent Catalase”. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 2002, p. 6351–6356. Vol. 184, No. 22. American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Department of Cell and Organism Biology, Lund University, SE-223 62 Lund, Sweden.
- [http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/salud_ambiente/File/FOLABELLA\(1\).pdf](http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/salud_ambiente/File/FOLABELLA(1).pdf) (Consulta: 11/2014).
- <http://www.patagoniambiental.com/Nota74/tabid/1444/language/es-CO/Default.aspx> (Consulta: 10/2014).
- García, M. D.; Uruburu, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM*, vol. 30, p. 12-6.
- IADO. (2008). Programa de monitoreo de la calidad ambiental de la zona interior del estuario de Bahía Blanca. Informe Final, Instituto Argentino de Oceanografía: 103 pp.
- INDEC. (2012). Instituto Nacional de Estadística y Censos, Argentina. <http://www.indec.gov.ar>. Censo 2010. (Consulta: 06/ 2012).
- INTI. (2015). <http://www.inti.gov.ar/noticiero/2015/noticiero433.htm>. (Consulta: 07/2015)
- ISO 7899-2:2000: Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 2: Membrane filtration method
- Larrea Murrell, J, A., Rojas Badía, M, M.,Romeu Álvarez, B.,Rojas Hernández, N, M., Heydrich Pérez, M. (2013).Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. Volumen 44. N° 3. CENIC Ciencias Biologicas. Versión electrónica. ISSN: 2221-2450.
- Lévesque, B and Gauvin, D. (2007). Microbiological guideline values for recreational bathing in Canada: Time for change? *Canadian Journal Infection Dis Med Microbiology* ;18(2):153-157.

- Malik, K, A; Claus, D. (2013). *Bacterial Cultura Collections: They importance to Biotechnology and Microbiology*. Teylor& Francis.
- Messer, J., Dufour. (1998). “A Rapid, Specific membrane Filtration Procedure for Enumeration of Enterococci in recreational Water.” *Appl. Environ. Microbiol* 1998; 64: 678-80.
- Marigual, G. (2015). Informe sobre calidad de agua del río Negro en la zona de Viedma. URESA Salud Pública. Rio Negro.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid.
- Natale, O. (1998). Criterios para evaluar la problemática de calidad de aguas. Pp. 33-49 en: A Fernández Cirelli (ed). *Agua “Problemática regional”. Enfoques y perspectivas en el aprovechamiento de recursos hídricos*. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Nadal, F., Ruiz, M., Rodríguez M. I., Halac, S., Olivera, P. (2012). Evaluación de la calidad de agua para uso recreativo del embalse San Roque, Córdoba, Argentina. Instituto Nacional del Agua-Centro de la Región Semiárida. Córdoba.
- O'Higgins, T. G., S. P. Ferraro, D. D. Dantin, S. J. Jordan, and M. M. Chintala. (2010). Habitats calemapping of fisheries ecosystem servicevalues in estuaries. *Ecology and Society* 15 (4): 7. [online] URL: <http://www.ecologyandsociety.org/vol15/iss4/art7/>.
- ONU. (2012). “Status Reporton the application of integrate dapproaches towaterresourcesmanagement 2012”.Informe de evaluación, Informe global, Resultados de encuesta.
- Perillo, G.M.E., (2013). Fluvial influence on estuaries and coastal wetlands.En: Murillo Muñoz, R.E. (Ed.) *Riverflow 2012*. Vol. 1, pp. 17-25 Taylor & Francis Group, Londres.
- Piccolo, M. C., Perillo, G. M. E. (1997). “Geomorfología y Hidrografía de Estuarios”. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. Mar del Plata. Argentina.

- Puerto, C. A., Iglesias, E., Morales, T., Baños, N., Nocedo, M. D., Carnota, G., Martínez, R. (2009). “Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay.
- Reis, P. A., Guilhermino, L., Antunes, C., Sousa, R., (2013). “Assessment of the ecological quality of the Minho estuary (Northwest Iberian Peninsula) based on metal concentrations in sediments and in *Corbiculafluminea*”. Asociación Ibérica de Limnología, Madrid. Limnetica, 33 (1): 161-174.
- República Argentina Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente *Escherichia coli/ Enterococcus* (2003). Desarrollos de niveles guías nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a *Escherichia coli/Enterococcus*.
- Rivero Moreira, M. A. (2010). “Assessing the balance between biodiversity conservation and coastal and estuarine management of the Sado Estuary Natural Reserve, Portugal, using BIO-SAFE”.Facultad de Ciencia y Tecnocologia. Lisboa.
- Rodríguez Cuitiva D.E. (2011). “Distribución de Enterococos como indicadores de contaminación fecal en aguas de la Bahía de Tumaco, Pacífico colombiano”. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología 50(2): 136-148.
- Rodríguez, C., Mancini, M., Prosperi, C., Weyers, A., Alcantú, G & Ferrero, S. (2012). “Variaciones estacionales de la calidad del agua del río Chocancharava (río Cuarto), Córdoba, Argentina”. Asociación Argentina de Ecología. Ecología Austral 12:65-72.
- Romeo-Àlvarez, B; Larrea-Murrel, J; Lugo-Moya, D; Rojas-Hernandes, N; Heydrich-Perez, M. (2012). “Calidad Microbiológica de las Aguas del río Luyanó, La Habana, Cuba”. Revista CENIC ciencias biológicas, vol 43, NO 3, septiembre-diciembre. Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Cuba.
- Salibian, A., Ferrari, A. L. (2006). Calidad del agua del Río Reconquista, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Ingeniería Sanitaria y Ambiental 87: 65-71.

- Standard methods for examination of water and waste water. 21 ed. Washington D.C: APHA; 2000. American Public Health Association, American Water Works Association. Water Environment Federation.
- Sosa, V., Camevall Fernandez-Concha, G., León de la Luz, J. L., León Cortés, J. (2004). "Colecciones Biológicas de los centros de Investigación CONACYT". C.P. 03940, México, D. F. ISBN 968-823-260-2.
- Streitenberger M.D., Baldini M.E. (2010). "Deterioro de un área recreacional por efectos del volcado de líquidos cloacales". Informe breve. Revista Argentina de Microbiología. ISSN 0325-7541 307; Vol .42 No 4: 307-310.
- Suárez Pita, M. (2002). Tendencia actual del estreptococo como indicador de contaminación fecal. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, vol. 40, núm. 1, 2002, pp. 38-43. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Ciudad de La Habana, Cuba.
- U.S.E.P.A (2012). United States Environmental Protection Agency. Water Estuaries and Coastal Watersheds. <http://water.epa.gov/type/oceb/nep/about1.cfm>. (Consulta: 06/2012).
- Vergaray, G., Mendez, C. R., Morante, H. Y., Heredia, V. I., Béjar, V. R. (2007). "Enterococcus y Escherichia coli como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima". Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG. Vol.10. N° 2082-86. ISSN: 1561-0888.
- Weng Alemán, Z; Junco Díaz, R, A; Díaz Rosa, O, E; Álvarez Molina, I; Beltrán Díaz, J. R; Rodríguez Salazar, M. C. (2005). Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología versión On-line ISSN 1561-3003.
- Weng Alemán, Z; Junco Díaz, R. A; Díaz Rosa, O, E. (2003). Colección de cultivos microbianos. Apuntes sobre su desarrollo. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología versión On-line ISSN 1561-3003.
- <http://healthycanadians.gc.ca/publications/healthy-living-vie-saine/water-recreational-recreative-eau/index-eng.php?page=9#a411>. (Consulta: 11-04-2016).

ANEXOS

ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO.

AGAR LACTOSA TTC CON TERGITOL®7

Composición

| | |
|----------------------|---------|
| Lactosa | 20,0 gr |
| Peptona | 10,0 gr |
| Extracto de levadura | 6,00 gr |
| Extracto de carne | 5,00 gr |
| Azul de bromotimol | 0,05 gr |
| Agar | 12,7 gr |
| Tergitol®7 | 0,10 gr |

Preparación

Disolver 53,9 g en 1 litro de agua destilada y tratar en autoclave (15 min. A $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$). Enfriar el medio en un baño de agua hasta $45-50^{\circ}\text{C}$. Añadir 5 ml de una solución acuosa al 0.125% de TTC, esterilizada por filtración a 100 ml del medio de cultivo y mezclar homogéneamente. Verter el medio de cultivo en placas de petri con un espesor de capa mínimo a 5 mm.

pH final $7,2 \pm 0,2$ a 25°C .

BACTIDENT® OXIDASE

Reactivos utilizados:

Discos de oxidasa: Diclorhidrato de tetrametil-p-fenildiamona 0,1 gr.

*Procedimientos:

En tubo: a partir de un cultivo puro, hacer una suspensión densa en 1,2ml de agua destilada y agregar un disco oxidasa. Esperar unos segundos a temperatura ambiente e interpretar los resultados

En porta objeto: humedecer el disco de oxidasa con una gota de agua y luego colocar sobre él la colonia en estudio (opción útil cuando no se dispone de mucha carga bacteriana).

***Interpretación de Resultados:**

Positivo: observación de un color oscuro (rojo-fucsia o azul según formulación comercial) en el disco y/o solución.

Negativo: el disco permanece sin cambio de color.

En ambos procedimientos la reacción positiva se da en menos de 1 minuto. Si el cambio de color ocurre después de los 3 minutos, se debe considerar como reacción negativa por falso positivo.

INDOLE REAGENT

Reactivo del Indol: n-Butanol; Acido Clorhidrico; 4-dimetilaminobenzaldehido

Este reactivo se encuentra disponible comercialmente El reactivo muestra una coloración amarilla luminosa a marrón, algunas muestras de alcohol amilico son insatisfactorios, y da un color negro con el aldehído.

Procedimiento:

Inocular tubos de Caldo Triptona o Agua peptonada a partir de los cultivos puros.

Incubar a 44°C durante 24 horas.

Una vez concluido el tiempo de incubación, agregar 0,5ml (5 gotas) del Reactivo de KOVÁC.

Homogeneizar suavemente el tubo y observar.

***Interpretación de Resultados:**

El desarrollo de un anillo de color rosa en la superficie del caldo indica una reacción positiva. Si se mantiene el color original del reactivo, (amarillo o ámbar) la prueba es negativa. Un color naranja indica probable presencia de escatol, un producto de la degradación del indol.

MEDIO SLANETZ Y BARTLEY

Composición:

| | |
|-------------------------------------|---------|
| Triptosa | 20,0 gr |
| Extracto de levadura | 5,00 gr |
| D (+) glucosa | 2,00 gr |
| Hidrogeno Fosfato di-potasico | 4,00 gr |
| Azida de sodio | 0.40 gr |
| 2,3,5-Cloruro de trifeniltetrazolio | 0,10 gr |
| Agar | 10,0 gr |

Preparación:

Disolver 41,5 gr en 1 litro de agua desmineralizada calentando en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor (por ej. Autoclave sin sobre presión). ¡No tratar en autoclave! Verter sobre placas.

pH final $7,2 \pm 0,2$ a 25°C .

Dicho medio se comercializa en dos presentaciones, esto es con o sin trifeniltetrazolio incorporado al producto deshidratado. En el segundo caso, es necesario suplementar con solución TTC 1% o TTC 50 mg la cantidad necesaria hasta alcanzar una concentración final de 0,1 g por litro de medio-.

Dicho medio se comercializa en dos presentaciones, con y sin trifeniltetrazolio. Si se trabajara con medio sin el compuesto incluido en la formulación madre, se deberá adicionar con solución de TTC.

AGAR BILIS ESCULINA AZIDA

Composición:

| | |
|----------------------------|---------|
| Azida sódica | 0,15 gr |
| Bilis de buey | 10,0 gr |
| Citrato de hierro y amonio | 0.50 gr |
| Cloruro de sodio | 5,00 gr |
| Esculina | 1,00 gr |
| Extracto de carne | 5,00 gr |
| Proteosa peptona N° 3 | 3,00 gr |
| Tripteina | 17,0 gr |
| Agar | 15,0 gr |

Preparación:

Suspender 65,5 gr del medio en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta informar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos 121°C.

pH final 7,1±0,2 a25°C

FLUOROCULT® LAURYL SULFATE BROTH-LST-MUG MEDIUM

Composición:

| | |
|------------------------------|---------|
| Triptosa | 20,0 gr |
| Lactosa | 5,0 gr |
| Cloruro de sodio | 5,0 gr |
| Lauril Sulfato de Sodio | 0,1 gr |
| Di-potasio hidrogeno fosfato | 2,75 gr |
| Potasio di-hidrógeno fosfato | 2,75 gr |

| | |
|-------------------------------------|--------|
| L-triptófano | 1,0 gr |
| 4-methylumbeliferil-b-D-glucuronide | 0,1 gr |

Preparación:

Suspender 36.5 gr del medio en un litro de agua destilada. Rellenar los tubos de ensayo equipados con campanas de Durham; llevar a autoclave (15 min a 121 ° C). pH: 6,8 ± 0,2 a 25 ° C. El caldo preparado es claro y de color marrón amarillento.

ANEXO 2: TRABAJOS PRESENTADOS ANTES DE ENTREGA DE TESIS

VI Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida, Catamarca noviembre 2014

INDICADORES BACTERIANOS DE CONTAMINACIÓN EN UN ESTUARIO PATAGÓNICO

Cambruzzi, N¹, Abrameto, M¹

¹ *Sede Atlántica, (UNRN), Rotonda Cooperación y ruta provincial 1, Viedma (8500) Río Negro, Argentina.*

n.cambruzzi@hotmail.com

El río Negro es uno de los más importantes de Argentina no solo por su longitud, a 720 km, y caudal (450 a 750 m³/s), sino por las diversas actividades antrópicas que se desarrollan en sus riberas y utilizan el río como recurso prioritario para el desarrollo de la región. El estuario se extiende aproximadamente 66 km, desde la desembocadura hasta la Primer Angostura, para alcanzar la zona fluvial en Guardia Mitre. A lo largo de este se pueden identificar diferentes usos, que revelan los beneficios económicos y culturales del estuario. También se destacan los ecológicos, siendo ecosistemas únicos, con gran variedad de hábitat y refugios para la fauna acuática y terrestre. Dichos ambientes estarían cumpliendo la función de reservorio temporal de contaminantes. Por lo que investigar la calidad microbiológica del agua superficial en la zona correspondiente al sector estuarino del río es prioritario y constituye el objetivo general del presente estudio. Los indicadores microbiológicos de contaminación fueron analizados por el método de Filtración por Membranas y paralelamente por la tradicional técnica de Tubos Múltiples. Identificamos presencia y persistencia de Coliformes Totales, *Escherichia coli* y *Enterococcus*, entre los meses de Marzo y Julio del corriente año. En el 64% de los sitios investigados veinte días posteriores al evento climático más importante del año; intensas lluvias y vientos, se registró alta persistencia de *Escherichia coli* con NMP superior a 1100/100ml. Por ambas pruebas se comprueba, que los sitios que indican alta incidencia de todas las bacterias estudiadas, corresponden a vertidos de origen urbano.

INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL EN EL ESTUARIO DEL RÍO NEGRO: COMPARACIÓN ENTRE *ESCHERICHIA COLI* Y ENTEROCOCOS

Cambruzzi. N^{1,2}, Abrameto. M², Abate. S^{1,2}

¹Laboratorio Patagónico de Diagnostico Agroalimentario (Funbapa), Viedma, Río Negro, ARGENTINA

²Universidad Nac. de Río Negro–Sede Atlántica–Viedma–Río Negro, ARGENTINA

e-mail:n.cambruzzi@email.com

Palabras Clave: río Negro, Estuario, *E. coli*, *Enterococcus*, contaminación fecal

El río Negro es uno de los más importantes de Argentina por su magnitud y las actividades desarrolladas en sus riberas. Su estuario recorre 60 km; la salinidad se encuentra altamente influenciada por las mareas diarias. Los diferentes usos del agua revelan los beneficios económicos y culturales del estuario, como también los ecológicos por constituir sistemas de aguas únicas con gran variedad de hábitat que permiten el desarrollo de numerosas especies garantizando la biodiversidad, y funcionando como reservorio temporal de nutrientes, contaminantes y sedimentos.

Existe una relación directa entre la población y agua del río Negro, por lo que es relevante estudiar continua y sistemáticamente su situación microbiológica. Esta actividad la realizan actualmente diversas autoridades utilizando el método de número más probable (NMP) de *E. coli* y adoptando criterios de Guías Canadienses de Calidad de Agua. Se comparó el método de NMP de *E. coli* con el recuento de unidad formadora de colonia (UFC) de *Enterococcus* por filtración de membrana (FM) adoptando puntos de corte recomendados por OMS: se seleccionó el balneario de la ciudad de Viedma como sitio de estudio, tomándose muestras mensuales durante un año, procesándolas inmediatamente por ambos métodos. En algunos muestreos se observó que el recuento de UFC de *Enterococcus* por FM identificó riesgo para la salud pública por contaminación fecal, contrariamente al método NMP de *E. coli*.

Estos resultados sugieren que sería conveniente continuar con ambos métodos en paralelo, hasta contar con mayor número de datos que permitan una interpretación estadísticamente significativa. Por otro lado, alertan sobre el estado del balneario del río

Negro que estaría impactado por la contaminación fecal de origen antrópica, originada potencialmente por plantas de tratamientos cloacales regionales disfuncionales como por la contaminación cruzada entre aguas cloacales y desagües pluviales, siendo crucial intensificar los controles armonizando los métodos de muestreo y de análisis.

Este trabajo participa en el “Concurso Jóvenes Investigadores, E-ICES 11”

V JORNADAS DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN DEL CURZA II SIMPOSIO
DE JÓVENES CIENTÍFICOS DEL CURZA

“La transformación del conocimiento en la sociedad actual. Aportes desde la
Universidad”.

**VARIABLES QUE AFECTAN RESULTADOS EN EL CONTROL DE
CONTAMINACIÓN DEL ESTUARIO DEL RIO NEGRO**

Cambruzzi. N^{1,2}, Abrameto. M², Abate. S^{1,2}.

¹Laboratorio Patagónico de Diagnostico Agroalimentario, Viedma, Río Negro, ARGENTINA

²Universidad Nac. de Río Negro–Sede Atlantica–Viedma–Río Negro, ARGENTINA

Palabras Claves: estuario río Negro, control microbiológico ambiental, *E. coli*, *Enterococcus*.

Los estuarios son importantes en el crecimiento económico mundial, constituyendo cuerpos de agua que debieran estar protegidos por colectar y concentrar nutrientes, y estar habitados por diversas especies únicas garantizando la biodiversidad. El río Negro es el más importante en Patagonia; su estuario se extiende 66 km desde la desembocadura hasta la Primer Angostura (Guardia Mitre). En sus riberas se desarrollan actividades antrópicas que destacan al recurso como prioritario para el desarrollo de la región, revelando la importancia de su control microbiológico dado su posible riesgo para la Salud Pública.

El estudio de este ambiente dinámico puede estar influenciado por el rango de mareas diarias, generándose en pleamar un efecto de dilución que afecte resultados de control microbiológico. Se realizó un muestreo único en tres sitios de la localidad de Viedma,

comparando estimaciones de *E. coli* (NMP/100ml) y recuentos de *Enterococcus* (UFC por FM/100ml) entre baja y pleamar en un periodo de 24 hs.

Se observaron diferencias entre ambos momentos de muestreo, así como entre los indicadores: *Enterococcus* manifestó menor variabilidad que *E. coli*.

Estos resultados indican la necesidad de continuar investigando, para identificar las fuentes de variabilidad, permitiendo que los resultados de diferentes grupos de investigación sean comparables.

ANEXO 3: TECNICAS ANALITICAS

Técnica de Catalasa: la mayoría de las bacterias aerobias poseen la enzima catalasa, y generan descomposición de peróxido de hidrogeno, en agua y oxígeno. Para esta prueba sobre colonias puras se colocó una gota de agua oxigenada y se observó la formación de burbujas, indicador de prueba positivas.

Tinción de Gram: esta técnica permite visualizar bacterias en microscopio. Así se puede identificar morfología y generar una diferenciación bacteriana considerando bacterias gram positivas a las que se visualizan de color morado y gram negativas a las de color rosa.

Para realizar la técnica de gram en las colonias puras se procedió a colocar una pequeña gota de agua destilada en un portaobjetos y se re-suspendió muestra sobre la gota. Se secó flameando con el mechero Bunsen. Luego se colocó cristal violeta sobre toda la muestra por 1 min y se lavó con agua destilada. Se le agrego Lugol cubriendo toda la muestra por 1 min y posteriormente se cubrió con alcohol acetona para que se descolore por un tiempo de 15 seg y se lavó con abundante agua destilada. Por último se agregó safranina para teñir las bacterias que perdieron el cristal violeta por 15 seg. Finalmente se secó y llevo a microscopio.